

TESIS DOCTORAL



**Papel de las proteínas de choque térmico
(*Heat Shock Proteins, HSP*) en la apoptosis**

Ana María Marchena López

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

2019



TESIS DOCTORAL

**Papel de las proteínas de choque térmico
(*Heat Shock Proteins, HSP*) en la apoptosis**

Ana María Marchena López

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR,
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

2019

Conformidad de los directores:

Fdo.: Dr. D. José Antonio Pariente Llanos

Fdo.: Dr. D. Ignacio Bejarano Hernando.



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

Avda. de Elvas s/n
06006 Badajoz (SPAIN)

D. José Antonio Pariente Llanos, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura y D. Ignacio Bejarano Hernando, Profesor Ayudante a Doctor de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Ana María Marchena López, con el título: **“Papel de las proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins, HSP*) en la apoptosis”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y entendiendo reúne todos los requisitos establecidos, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a efectos oportunos, firman el presente documento en Badajoz, a ___ de _____ de 2019.

Fdo. José Antonio Pariente Llanos

Fdo. Ignacio Bejarano Hernando

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de la Junta de Extremadura – Fondo Social Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER, GR18040) y “Asociación Oncológica Esperanza de Vida”. D^a Ana M. Marchena López ha disfrutado de un contrato perteneciente al Programa de Ayudas de Investigación para Jóvenes Investigadores en Cáceres de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (REF: PRE/FT2014-05).

D. Ignacio Bejarano ha disfrutado de una de las Becas de Movilidad al Personal Docente e Investigador de la Universidad de Extremadura y de los Centros Tecnológicos de la Comunidad Autónoma de Extremadura en centros extranjeros de Enseñanza Superior y/o Investigación para el curso 2016/2017 (DOE nº 14 de 20 de enero de 2017). Con esta financiación, se pudieron llevar a cabo parte de los experimentos de esta Tesis Doctoral en el Laboratorio de Biología Aplicada dirigido por la Profesora Lina Ghibelli en la Universidad de Roma 2 “Tor Vergata” (Italia), que cuenta con una amplia y reconocida experiencia en el campo de la apoptosis.



ABREVIATURAS

NO: óxido nítrico

OH: radical hidroxilo

ABD: dominio de unión a ATP

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADN_{mt}: ADN mitocondrial

AIF: factor inductor de la apoptosis

Akt/PKB: proteína quinasa B

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Apaf-1: factor activador de proteasas apoptóticas 1

APO1: antígeno de apoptosis 1

ARNm: ácido ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato

Bad: promotor de muerte asociado a Bcl-2

Bax: proteína x asociada a Bcl-2

Bcl-2: linfoma de células B 2

Bcl-xL: Bcl extra-large

BH: dominio de homología con Bcl-2

Bid: dominio de interacción con Bcl-2

BiP: proteína de unión a inmunoglobulinas

CARD: dominio de reclutamiento de caspasa

Caspasa: cisteinil-aspartato proteasa

CDC37: proteína de control de la división del ciclo celular

dATP: 2'-deoxiadenosina trifosfato

DD: dominio de muerte

DED: dominio efector de muerte

DISC: complejo de señalización de inducción de muerte

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ER: retículo endoplásmico

ERK1: quinasa regulada por señal extracelular

ERN: especies reactivas de nitrógeno

ERO: especies reactivas de oxígeno

FADD: dominios de muerte asociados a Fas

FADH2: hidroquinona de flavín adenina dinucleótido (FAD)

Fas: receptor de muerte

FLICE: caspasa-8

FLIP: proteína inhibitoria de FLICE

GMPc: guanosín de monofosfato cíclico

GRP78: proteína regulada por glucosa de 78kDa

GSH: glutation reducido
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
Her2/ERB2:
HSC70: Heat Shock Cognate 70
HSE: elemento promotor de choque térmico
HSP: proteína/s de choque térmico
IAP: proteína inhibidora de apoptosis
ICAD: inhibidor de desoxirribonucleasa activada por caspasa
IκB: inhibidor NF-κB
IRE1: kinasa 1 dependiente de inositol
JNK: kinasa de c-Jun N-terminal
LOX: lipoxigenasa
MAC: canal mitocondrial inducido por apoptosis
MAPK: proteína kinasa dependiente de mitógenos
MAPKAPK: proteína quinasa activada por MAP quinasas
NAD(P)H: dinucleótido nicotinamida y adenina fosfato
NAD: dinucleótido nicotinamida y adenina
NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de células B
O₂^{·-}: radical superóxido
Omi/htrA2: serina proteasa mitocondrial
ONOO[·]: peroxinitrito
p53: proteína supresora de tumores
PBD: dominio de unión a péptido
PERK: kinasa relacionada con las proteínas kinasa del retículo endoplásmico
PI3K: fosfoinositol kinasa 3
PKA: proteína kinasa A
PKC: proteína kinasa C
PPTm: poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
RAF/Raf-1/cRaf: serina/treonina proteína kinasa
Smac/DIABLO: segundo activador mitocondrial de caspasas/ proteína de unión directa a IAP
SOD: superóxido dismutasa
TNF: factor de necrosis tumoral
TNFR1: receptor 1 de TNF
TRAP1: proteína 1 asociada al receptor de TNF
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
v-Src: gen que codifica para una oncoproteína tirosina kinasa

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	3
I. 2 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	4
I. 2.1 FAMILIAS DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	
I. 2.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE CHOQUE TÉRMICO	
I. 3 APOPTOSIS	22
I. 3.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS	
I. 3.2 CASPASAS	
I. 3.3 VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS	
I. 3.4 APOPTOSIS Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	
I. 3.5 EVASIÓN DE LA APOPTOSIS POR CÉLULAS TUMORALES	
I. 3.6 AGENTES QUIMIOTERAPEÚTICOS	
I. 4 MELATONINA	51
I. 4.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA	
I. 4.2 MELATONINA Y HSP	
I. 4.3 MELATONINA Y APOPTOSIS	
I. 4.4 MELATONINA Y AGENTES QUIMIOTERAPEÚTICOS	
II. OBJETIVOS	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS	67
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
V. DISCUSIÓN GENERAL	119
VI. CONCLUSIONES	125
VII. BIBLIOGRAFÍA	129

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Leucemia, del griego *λευκός* (*leukós*, “blanco”) y *αἷμα* (*haĩma*, "sangre"), hace referencia a un cáncer de la sangre donde hay exceso de leucocitos. La leucemia mieloide aguda (LMA) es un tipo de leucemia que consiste en la proliferación incontrolada y excesiva de glóbulos blancos anómalos en la médula ósea, impidiendo la producción de otros tipos celulares como plaquetas y glóbulos rojos. La LMA puede ser secundaria a otra neoplasia, como consecuencia de haber recibido quimioterapia y/o radioterapia. La LMA representa el 40% de todos los tipos leucemias en el mundo occidental y su incidencia en España se estima en 15 nuevos casos por millón de habitantes y año.

En la LMA se da una proliferación anormal y diferenciación de un clon de células madre mieloides. Alteraciones en el material genético, como mutaciones, translocaciones y reordenamientos cromosómicos, dan como resultado la formación de proteínas quiméricas que alteran el proceso de maduración normal de las células precursoras mieloides [1].

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo un sistema de clasificación, seguido de una versión revisada en 2008 [2]. En 2016 salió una nueva clasificación [3], que se distingue de su predecesora al incorporar información genética y morfológica, definiendo así seis subtipos de la enfermedad: LMA con anomalías genéticas recurrentes; LMA con características relacionadas con la mielodisplasia; LMA relacionada con terapia; AML no específica; Sarcoma mieloide; y, Proliferación mieloide relacionada con el síndrome de Down (Tabla 1) [4].

Tabla 1. Clasificación según la OMS (2016) de la LMA.

Types	Genetic abnormalities
AML with recurrent genetic abnormalities	AML with t(8:21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 APL with PML-RARA AML with t(9:11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A ML with t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1 AML with BCR-ABL1 (provisional entity) AML with mutated NPM1 AML with biallelic mutations of CEBPA AML with mutated RUNX1 (provisional entity)
AML with myelodysplasia-related changes Therapy-related myeloid neoplasms	AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia Pure erythroid leukemia Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma Myeloid proliferations related to Down syndrome	Transient abnormal myelopoiesis ML associated with Down syndrome

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; ML, myeloid leukemia; WHO, World Health Organization.

Fuente: De Kouchkovsky et al. [4] *Blood Cancer Journal* (2016).

I. 2. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

El estrés se considera en la actualidad como una de las grandes epidemias del siglo XXI. Según la OMS, el estrés es el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción, y distingue tres categorías según su origen: estrés ambiental, producido por la temperatura, radiaciones o sustancias químicas; estrés fisiológico, relacionado con cambios en el metabolismo, pH o concentración de oxígeno; y estrés patofisiológico, que puede cursar con la aparición de fiebre, inflamación, infección o cáncer. Las consecuencias pueden manifestarse a varios niveles, pudiendo verse comprometida la integridad de los componentes celulares o ciertas estructuras como el ADN, las proteínas o las membranas lipídicas, pudiendo incluso en última instancia provocar la muerte de la célula.

Para minimizar los daños ocasionados por ciertos tipos de estrés, los seres vivos poseen una compleja maquinaria que detecta, regula y responde a cualquier alteración ambiental que ponga en peligro la homeostasis celular [5]. Entre los sistemas más antiguos y universales de respuesta al estrés se encuentran unas proteínas conocidas como proteínas de choque térmico, proteínas de estrés térmico o HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*, capaz de conferir a la célula un papel citoprotector frente a gran diversidad de situaciones de estrés [6]. Las proteínas de choque térmico, pertenecen a una superfamilia de proteínas altamente conservada en la evolución y cuya secuencia genética es muy similar desde Arqueas hasta el hombre [7].

Las proteínas de choque térmico son esenciales para la supervivencia. Cuanto más se somete una célula a estrés térmico, mayor tolerancia al mismo presenta en un fenómeno conocido como termotolerancia. Sin embargo, no es fácil establecer una respuesta tipo para todos los organismos ya que cada cual presenta una temperatura óptima para desarrollarse y realizar sus funciones [8]. En líneas generales, la respuesta a estrés se desata cuando se produce un ascenso de 10-15 °C por encima de la temperatura óptima de los organismos, siendo el margen de tan solo 5 °C cuando el organismo crece. Mientras la temperatura se mantenga elevada, el organismo seguirá produciendo HSP, y sólo cuando se alcanza la temperatura normal, la síntesis de proteínas se restablece [9].

Ferruccio Ritossa [10], fue el primero en poner de manifiesto la existencia de HSP. En 1962, observó en células de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, que al poco tiempo de incrementar la temperatura ambiental, el cromosoma presentaba engrosamientos en ciertas regiones del ADN. Estos “abultamientos” se correspondían con el aumento en la expresión de genes de ciertas proteínas. Posteriormente, en 1974, Alfred Tissières et al. [11] identificaría estas proteínas como proteínas del choque térmico. De entre todas ellas, sobresalía una de 70.000 daltons que se la denominó como HSP70.

Atendiendo a su peso molecular, las proteínas de choque térmico se clasifican en 6 familias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y sHSP, o familia de proteínas de bajo peso molecular, que incluye proteínas con pesos moleculares entre 15 y 30 kDa [12]. Algunas proteínas de la familia HSP con alto peso molecular pueden expresarse de forma constitutiva, mientras que la expresión de otras es inducida por condiciones estrés. Las HSP de alto peso molecular son chaperonas dependientes de ATP, que van a requerir de co-chaperonas para modular su conformación y unirse al mismo. Por el contrario, las HSP de bajo peso molecular son chaperonas independientes de ATP [13]. Entre las diferentes HSP, HSP27 y HSP70 son las más inducidas ante situaciones de estrés tales como presencia de quimioterapéuticos, presencia de especies reactivas o irradiación, pudiendo suponer hasta el 15-20% del contenido proteico en condiciones de estrés. Tanto HSP27 como HSP70 se expresan abundantemente en células tumorales pudiendo considerarlas como marcadores [14].

A pesar de su nomenclatura, las proteínas de choque térmico, no sólo confieren protección a las células cuando éstas se ven sometidas a distintos tipos de estrés (térmico, radiaciones, diversas drogas, infecciones virales, etc.), sino que desempeñan importantes y muy variadas funciones dentro de la célula [15].

Una de las principales funciones de las HSP es la de actuar como chaperonas moleculares, es decir, colaboran con otras proteínas para la adquisición de la estructura terciaria de proteínas en formación. Estabilizan las formas inestables facilitando el ensamblado, la correcta unión de oligómeros, su transporte a otro compartimento celular o su degradación. También previenen agregaciones entre polipéptidos y participan en la reparación y degradación de proteínas anormales [16, 17].

Las HSP son fundamentales para el control de la temperatura óptima de numerosos procesos. Entre ellos está el funcionamiento de los receptores de hormonas esteroideas [18], la actividad y estabilidad de muchas proteínas esenciales para la célula implicadas en el mantenimiento de la estructura celular [19], en la transducción de señales [20] o en el control del ciclo celular [21, 22].

La acción citoprotectora de las HSP se lleva a cabo mediante numerosos mecanismos, cuando el agente causante de estrés desaparece, la síntesis de HSP desciende y la célula continúa con su metabolismo normal. Sin embargo, cuando el estímulo que provoca el estrés aumenta o se mantiene en el tiempo, la función protectora de las HSP resulta insuficiente, viéndose comprometida la viabilidad celular. En este caso, la síntesis de HSP se detiene y la célula “se suicida”, activando el denominado programa de muerte celular programada o apoptosis [23, 24].

Parece ser que las HSP están relacionadas con el sistema inmune al tener acción inmunogénica, debido a que promueven la ubiquitinación de metabolitos tóxicos para su posterior lisis por el proteosoma. Los productos de degradación del proteosoma van a actuar como ligandos de las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que a su vez serán reconocidos por los linfocitos T. Todo ello conduce a la activación de la inmunidad de las células T citotóxicas, indispensable en la lucha contra infecciones virales y cánceres [25].

I. 2.1 FAMILIAS DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

La superfamilia de HSP se compone de varias familias cuyos miembros se agrupan y nombran según sus pesos moleculares y cuya distribución ocupa los principales compartimentos celulares (Tabla 2).

Tabla 2. Familias de proteínas de choque térmico (HSP).

Familia	Nombre	Localización	Función
Pequeñas HSP	HSP22	Citoplasma, núcleo	Estabilización citoesqueleto
	HSP27	Citoplasma, núcleo	Inhibición actina, termotolerancia
	HSP32	R. endoplásmico, mitocondria, núcleo y membrana plasmática	Citoprotección
HSP40	Hsp40	Citoplasma	Chaperona
	Hsp47	R. endoplásmico	Síntesis colágeno
HSP60	HSP60	Mitocondria	Chaperona
HSP70	HSP70	Citoplasma, núcleo	Chaperonas
	HSP72		
HSP90	HSP90 α	Citoplasma	Ciclo celular, citoprotección
	HSP90 β	Citoplasma	Embriogénesis, transducción señales
HSP100	HSP110	Citoplasma, núcleo	Chaperona

Familia de las pequeñas HSP

Las HSP pequeñas o sHSP, *small Heat Shock Proteins*, constituyen una familia cuyos miembros poseen pesos moleculares comprendidos entre los 15 y los 30 kDa [26]. Estas proteínas comparten muchas secuencias homólogas y van a diferir del resto de familias, ya que su secuencia codificante está menor conservada [24]. Poseen en su estructura un dominio α -cristalino próximo al extremo C-terminal, es una secuencia rica en hojas β , lo que va a favorecer en gran medida la formación de dímeros. El extremo C-terminal está altamente conservado, en comparación con el extremo N-terminal que resulta ser más variable. Posee una región muy flexible y polar responsable de la solubilidad de las sHSP y de la estabilidad de las proteínas y los complejos proteína-sustrato [27].

Las sHSP están asociadas a períodos de elevada reorganización celular, síntesis y degradación proteica, como es el caso de la embriogénesis. La acumulación de proteínas desdobladas induce a las sHSP a formar agregados como señal para el inicio la apoptosis [28].

❖ *HSP22*

HSP22 también se denomina α B-cristalina por ser la proteína estructural más abundante en el cristalino de vertebrados [29]. Asimismo está presente en fibras

musculares estriadas con alta capacidad oxidativa, como el corazón y músculo esquelético, donde se localiza en las bandas z, aunque su localización parece depender de las condiciones fisiológicas [30]. El estrés térmico o la isquemia disparan su translocación al núcleo, la formación de agregados y la interacción con las bandas z de la sarcómera [31].

❖ *HSP27*

HSP27 también se la conoce como HSPB1 o *srp27*, *stress response protein 27*. Es el miembro de la familia sHSP mejor estudiado, y aunque en un inicio se describió como inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, a día de hoy están caracterizadas muchas de las funciones que desempeña [32].

Las células presentan niveles basales de HSP27 en ausencia de estímulo que las estrese. Sin embargo, ante una situación de estrés, presencia de citoquinas o factores de crecimiento, los niveles de HSP27 aumentan, pudiendo permanecer elevados durante horas [33]. Cuando el estímulo cesa, HSP27 vuelve a presentar niveles basales. Dentro de las HSP, ha sido descrita por tener una respuesta lenta al estrés ya que mientras que la mayoría de estas proteínas se acumulan en un corto espacio de tiempo, HSP27 necesita horas para alcanzar niveles similares [14].

El extremo N-terminal resulta esencial para el desarrollo de oligómeros de alto peso molecular [34]. Los oligómeros de HSP27 se forman a partir de dímeros estables que se unen entre sí por los dominios de α -cristalina de dos monómeros vecinos (Figura 1.A). Los dímeros estables se unen para formar tetrámeros para finalmente formar oligómeros inestables de hasta 800 kDa [35]. La oligomerización es un proceso dinámico que depende de la fisiología de las células, el estado de fosforilación de HSP27 y la exposición al estrés, existiendo un equilibrio entre los dímeros estables y los oligómeros inestables [36]. El estrés induce un aumento de la expresión, realizándose una regulación mediante la fosforilación de HSP27 por kinasas MAPKAPK -2 y -3 en 3 residuos de serina (Ser-15, Ser-78 y Ser-83). La fosforilación desempeña un papel importante para la formación de oligómeros en las células (Figura 1.B) que a su vez se relaciona con la actividad chaperona, una alta agregación indicaría gran actividad chaperona [37].

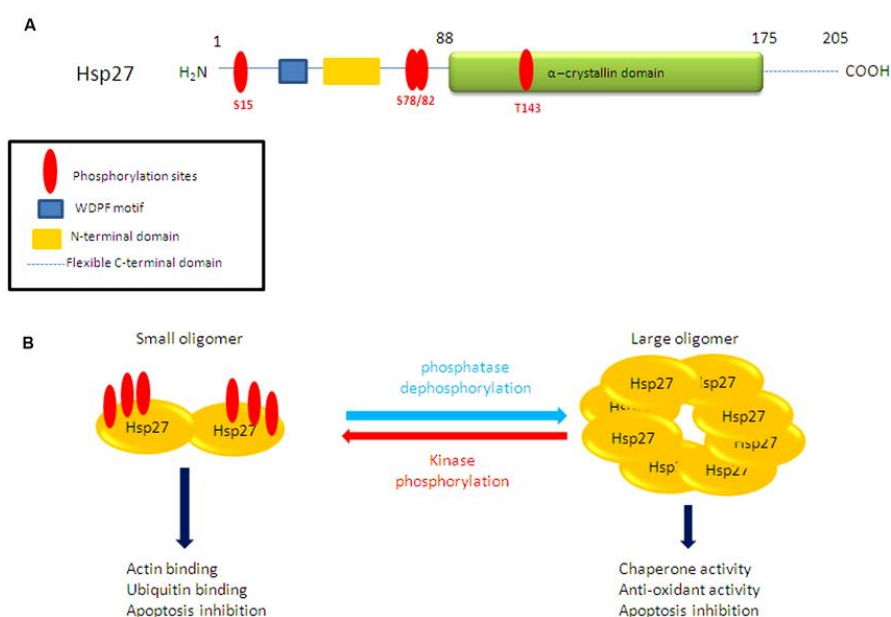


Figura 1. A. Dominios de HSP27. B. Transición de los estados de dimerización y oligomerización de HSP27 regulado por la fosforilación.

Fuente: Katsogiannou et al. [38] *Frontiers in genetics* (2014).

Su función como proteína de respuesta a estrés es evidente, siendo gran responsable de la termotolerancia y la resistencia a drogas [39]. Como se ha mencionado anteriormente, desempeña un importante papel en la dinámica de los filamentos de actina que estabiliza el citoesqueleto en diversos tipos celulares, como células endoteliales o cardiomiocitos [40]. Inhibe la agregación de proteínas [41] y actúa como chaperona, reparando o eliminando proteínas dañadas [42]. Interviene en proliferación y diferenciación celular en células leucémicas, considerándose como un marcador de diferenciación [43, 44]. Inhibe la apoptosis al ser secuestradora de moléculas como citocromo *c*, procaspasa-3 o Akt [13]. También está involucrada en el transporte del receptor de estrógenos, desde el citoplasma al núcleo, por un mecanismo dependiente de actina [45].

❖ HSP32

HSP32 o hemoxigenasa (HO) es una enzima que cataliza la degradación del grupo hemo dando lugar a biliverdina, Fe^{2+} y monóxido de carbono como productos de desecho. Esta proteína de 32 kDa contiene 288 residuos de aminoácidos [46]. Se localiza principalmente en el retículo endoplásmico, aunque también en mitocondria, núcleo y membrana plasmática [47].

Los genes HMOX1, HMOX2 y HMOX3 codifican para las isoformas HO-1, HO-2 y HO-3 respectivamente. La HO-1 es la isoforma más abundante, sobre todo en cardiomiocitos y es inducida por diversos tipos de estrés, como hipoxia, isquemia, peróxido de hidrógeno o metales pesados (selenio, cobalto, cadmio o estaño) [48]. HO-2 comparte una similitud del 47% con la secuencia de aminoácidos de HO-1 debido a que se realizan hasta cinco transcripciones diferentes del mismo gen. A diferencia de la HO-1 que es inducible, la HO-2 se produce de manera constitutiva y se expresa en testículos, células endoteliales y cerebro [49]. La HO-3 es estructuralmente muy parecida a la HO-2, teniendo un 90% de homología con ella y un 50% con la HO-1. Parece ser que es catalíticamente inactiva y que actuaría en la detección o en la unión del grupo hemo. HO-3 se expresa en hígado, próstata y riñones [50].

Familia HSP40

❖ *Hsp40*

HSP40 o chaperona DnaJ, actúa como proteína auxiliar de otras proteínas. También actúa evitando la agregación irreversible de proteínas durante la síntesis o en situaciones de estrés [51].

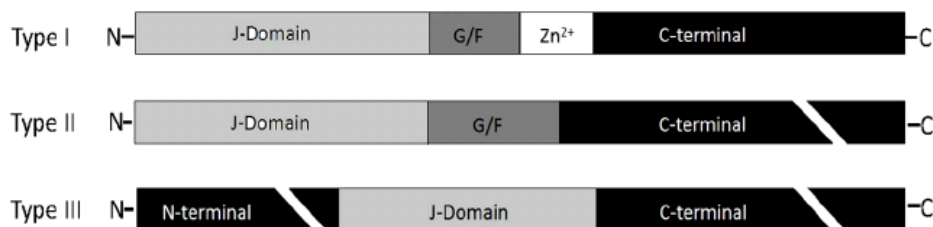


Figura 2. Esquema de los tres subtipos de la familia HSP40.

Fuente: Song et al. [52] *PLoS One* (2014).

Se caracteriza por tener 3 dominios (Figura 2). Un dominio bien definido y altamente conservado de unos 70 aminoácidos, denominado dominio J. El dominio J se localiza próximo al extremo N-terminal y posee 4 hélices con una torsión entre la 2ª y 3ª [53]. Esta región interactúa con Hsp70, desempeñando un papel en la regulación de la actividad ATPasa de Hsp70 (Figura 3) [54]. El dominio central es una región rica en cisteína que se pliega en forma dependiente de zinc. Esta región está implicada en la unión de sustrato, junto con el dominio C-terminal, que actúa como chaperona y es responsable de la dimerización [55].

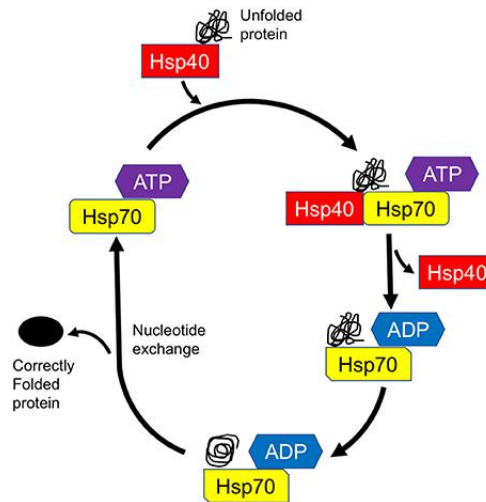


Figura 3. Modelo de plegamiento de proteínas asistido por el complejo HSP70/ HSP40.

Fuente: Hasegawa et al. [56] *Frontiers in Neuroscience* (2018).

❖ HSP47

HSP47, también conocida como serpina H1. Las serpinas, del inglés *serine proteinase inhibitors*, constituyen una superfamilia de inhibidores de serina proteinasa. HSP47 se expresa en el retículo endoplásmico y puede ser inducida tanto por estrés térmico como por estados fisiopatológicos asociados al aumento de la síntesis de colágeno, como la fibrosis hepática [57]. La proteína se une al colágeno, actuando como chaperona involucrada en la maduración del mismo [58].

Los miembros de esta familia poseen una estructura secundaria altamente conservada, formada por un núcleo de tres hojas β alrededor de nueve hélices α . Puede presentar dos estructuras: monómero (~ 45 kDa) o trímero (~ 147 kDa), siendo ambos biológicamente activos.

HSP47 se une a procolágeno en el retículo endoplásmico, formando el complejo procolágeno-HSP47, el complejo se transporta del retículo al complejo de Golgi donde HSP47 se disocia y vuelve al retículo para ser reutilizada (Figura 4) [59].

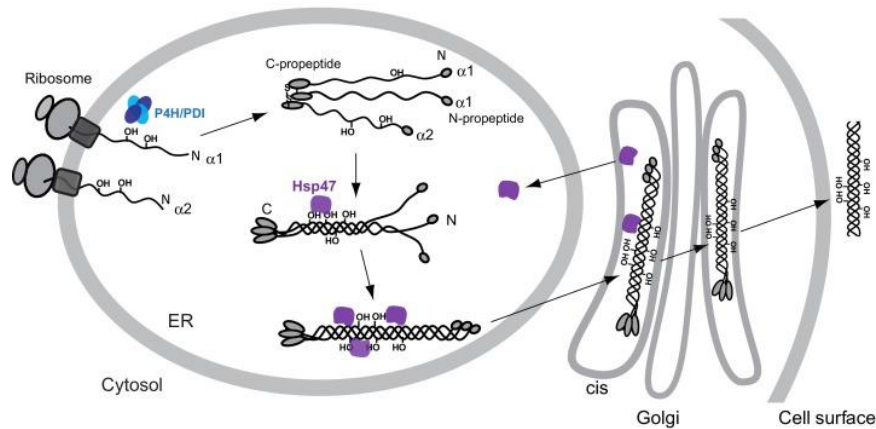


Figura 4. Síntesis y transporte de colágeno asistido por HSP47.
Fuente: Ito et al [59] *Seminars in cell & developmental biology* (2017).

La síntesis de colágeno es fundamental para numerosos procesos en el organismo, sin embargo, un exceso de colágeno puede convertirse en una patología que interfiera en función normal del organismo. El aumento de la expresión de HSP47 se relaciona con enfermedades donde existe una deposición anormal de colágeno como en la arteriosclerosis, infarto de miocardio y fibrosis [60]. Se ha visto en células metastáticas altos niveles de HSP47, lo que sugeriría la posibilidad de usar esta proteína como marcador de la actividad tumoral [61].

Familia HSP60

La familia HSP60 se localiza principalmente en la mitocondria, aunque ciertos autores también la sitúan en el citoplasma [62].

En condiciones fisiológicas normales, HSP60 es un oligómero de 60 kDa. Se compone por monómeros que forman un complejo dispuesto como dos anillos heptaméricos apilados. Esta estructura de doble anillo forma una gran cavidad central donde la proteína desplegada se une mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 5.A) [63]. Cada subunidad de HSP60 tiene tres dominios: el dominio apical, el dominio ecuatorial y el dominio intermedio, que une a los dos anteriores (Figura 5.B). El dominio ecuatorial contiene el sitio de unión para ATP y para el otro anillo heptamérico. El dominio intermedio induce un cambio conformacional cuando se une el ATP [64]. En su forma inactiva la proteína se encuentra en estado hidrofóbico, cuando se une ATP el dominio intermedio experimenta un cambio conformacional que expone

la región hidrofílica, haciendo que la cavidad central se agrande y permita el plegamiento de las proteínas [65].

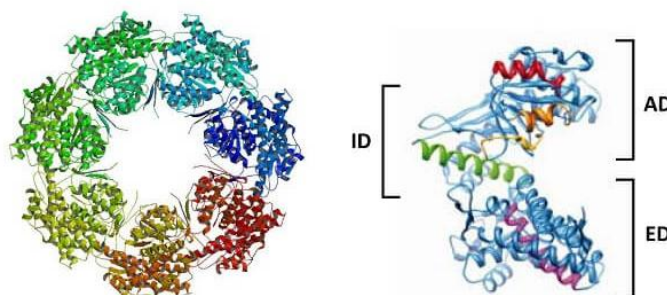


Figura 5. A. Estructura de HSP60. B. AD: dominio apical, ED: dominio ecuatorial, ID: dominio intermedio.

Fuente: editada de <https://hsp60.com> [Internet]

Parece ser que la secuencia codificante de HSP60 que codifica para el extremo N-terminal, difiere entre la proteína citoplásmica y la proteína mitocondrial [66].

HSP60 está implicada en el plegado de proteínas, en la translocación de las mismas a través de membranas y en la aceleración del ensamblado [67].

Familia HSP70

Los miembros de esta familia han sido los más estudiados en células eucarióticas [68]. Incluye proteínas con pesos moleculares comprendidos entre los 66 y 78 kDa codificadas por una familia de 11 genes en humanos. HSP70 está muy conservada evolutivamente, la proteína humana posee un 73% de homología con la de *D. melanogaster* y un 50% con la de *E. coli* [69]. Muchas de ellas se localizan en el citosol, como es el caso de la inducible HSP70 (HSP72) o de la constitutiva Hsc70 (HSP73, *Heat shock cognate 73 kDa*); otras se encuentran en la mitocondria como mtHSP70 o en el retículo como GRP78/BiP, siendo ambas constitutivas.

❖ HSP70

Todas las HSP70 tienen 3 dominios funcionales a destacar (Figura 6) [70]. En el extremo N-terminal, se localiza el dominio de unión a nucleótido (NBD) que posee actividad ATPasa. Consiste en dos lóbulos con una hendidura profunda entre ellos, en

cuya parte inferior de la misma se une a ATP y ADP. Este dominio se une a ATP y lo hidroliza hasta ADP, el intercambio ATP/ADP va a inducir cambios conformacionales en los otros dos dominios [71]. El dominio de unión al sustrato (SBD) está compuesto por un subdominio de hoja β de 15 kDa y un subdominio helicoidal de 10 kDa. El subdominio de la hoja β consiste en hojas β trenzadas dispuesta como un típico barril β capaz de recluir el esqueleto peptídico del sustrato. El SBD tiene afinidad por los residuos de aminoácidos neutros e hidrófobos, y es lo suficientemente largo como para interactuar con péptidos de hasta siete residuos de longitud [72]. El dominio C-terminal posee una estructura rica en α -hélices que actúa como una "tapa" para el SBD. Cuando una proteína HSP70 se une a ATP, la tapa está abierta y los péptidos se unen y liberan con relativa rapidez. Cuando las proteínas Hsp70 están unidas a ADP, la tapa se cierra y los péptidos se unen estrechamente al dominio de unión al sustrato [73].

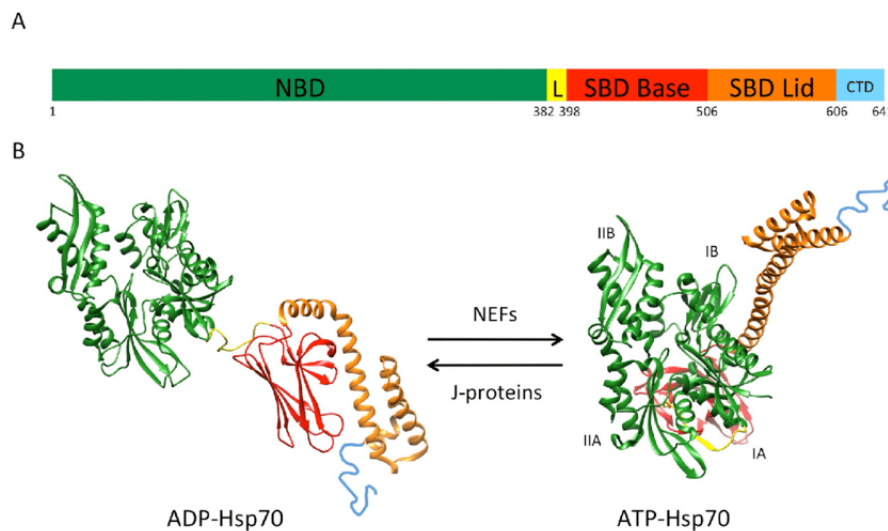


Figura 6. A. Organización de los dominios de HSP70; B. Estructuras de HSP70 cerrada y abierta.

Fuente: Fernández-Fernández et al. [74] *F1000Research* (2018).

El ciclo ATPasa de HSP70 consiste en alternar estados de baja afinidad y cambios rápidos mientras une ATP, y estados de alta afinidad y cambios lentos de sustrato mientras une ADP. Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas normales la concentración citoplasmática de ATP es elevada, la hidrólisis del ATP es el paso limitante del ciclo lo que hace que esté constantemente sujeto a regulación [75].

Se han identificado varias proteínas que actúan como co-chaperonas de HSP70, modulando su actividad mediante la unión a los dominios NBD y SBD. HSP70 y Hsc70, pueden interactuar con la proteína BAG a través de interacciones

electrostáticas, estimulando la disociación de ADP en presencia de fosfato inorgánico [76]. HIP es una proteína de 43 kDa que interactúa con el dominio ATPasa de Hsc70. Actúa estabilizando el estado ADP y estimulando la actividad chaperona [77]. HOP es una proteína de 60 kDa capaz de formar dímeros. Interactúa con el extremo C-terminal de HSP70, también con HSP90, para regular la respuesta al estrés [78]. CHIP es una proteína de 35 kDa que también forma dímeros y compite con HOP por el extremo C-terminal de HSP70 y HSP90. Actúa inhibiendo la actividad chaperona de las HSP cuando se une a ellas, también está relacionada con la degradación de proteínas mediada por ubiquitinación [79].

HSP70 es la proteína más conservada en la evolución. Está presente en numerosos compartimentos celulares, sobre todo citoplasma y núcleo. Durante un estímulo estresante su concentración se intensifica en el núcleo, en el citoplasma se une a polipéptidos recién formados antes de ser liberados por el ribosoma [80]. Los miembros de la familia HSP70 ejercen funciones como ayudar en el plegamiento de algunas proteínas recién sintetizadas [81], translocar proteínas a través de membranas [82], regular la actividad biológica de las proteínas [83], facilitar la degradación de proteínas inestables [84], crecimiento y desarrollo de las células [85], participación en la respuesta inmune [86].

También han sido descritos los efectos protectores de HSP70 cuando es aplicada de forma exógena, en la protección y recuperación celular tras ser sometidas a estrés [87, 88], tratamiento de enfermedades degenerativas [89] o protección contra enfermedades infecciosas [90].

HSP70, al igual que HSP90, tiene la capacidad de preservar la función de proteínas mutadas, como p53 o SOD1, pero ante situaciones como estrés extremo [91], etapas del desarrollo o la presencia de ciertos fármacos [92], las mutaciones son insalvables y la funcionalidad queda comprometida. Cuando ya no es posible recuperar la proteína existe una segunda alternativa que consiste en la ubiquitinación de la proteína para su posterior degradación [93]. Si ambos mecanismos fracasan, las proteínas mutadas pueden acumularse y dar lugar a enfermedades como el cáncer (p53), la esclerosis lateral amiotrófica (SOD1), la enfermedad de Parkinson (α -sinucleína) o de Huntington (huntingtina) (Figura 7).

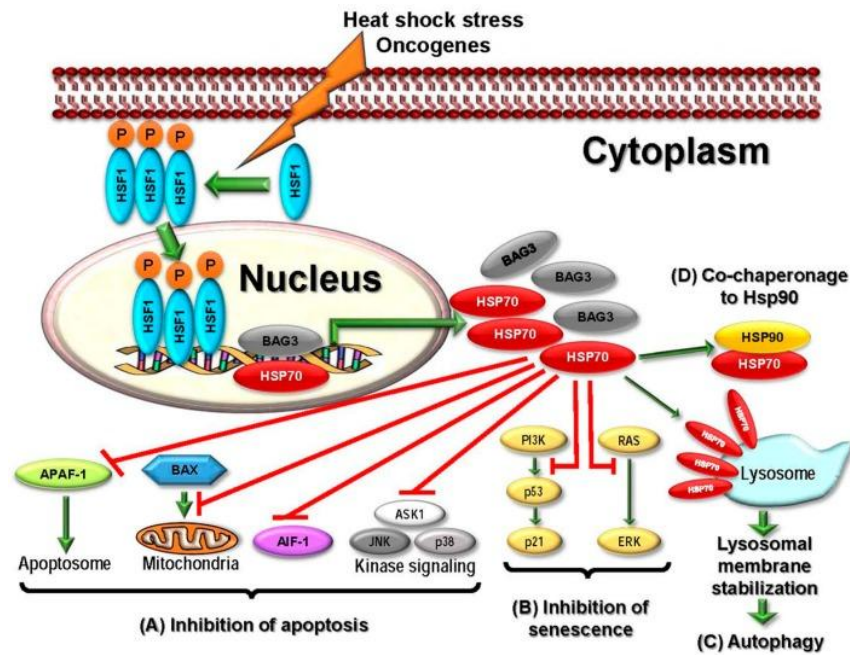


Figura 7. Funciones de HSP70 en respuesta al estrés.

Fuente: Chatterjee et al. [94] *International journal of molecular sciences* (2017).

Familia HSP90

HSP90 es una de las proteínas más abundantes en eucariotas, llegando a suponer hasta un 2% de las proteínas totales citoplásmicas en estado basal y pudiendo aumentar su expresión hasta 4-6% en condiciones de estrés [95]. Esta familia está formada por cuatro proteínas: las isoformas HSP90 α y HSP90 β , la mitocondrial TRAP1 y la GP96/Grp94 en el retículo endoplasmático. Grammatikakis y colaboradores relatan la existencia de una quinta proteína: HSP90N. Este nuevo miembro, sería una variante de la HSP90 citosólica pero asociada a membrana y estaría relacionada con la transformación de las células cancerígenas [96].

HSP90 se encuentra principalmente en forma de dímeros ($\alpha\alpha$ o $\beta\beta$), a pesar de que la isoforma α dimeriza más rápidamente que la β . Cada uno de los dímeros posee tres dominios. El dominio N se localiza en el extremo N-terminal de la proteína, se trata de un sándwich estructural que delimita el sitio de unión a ATP y a ciertos inhibidores como la geldanamicina [97]. Posee un segmento a modo de tapa que durante el cambio conformacional tendrá importancia en el mecanismo catalítico. El dominio N conecta con el dominio intermedio a través de una hoja- β [98]. El dominio intermedio consta de tres regiones estructurales bien definidas y que poseen alta afinidad para co-chaperonas y otras proteínas. El dominio C se sitúa en el extremo C-terminal, en él se encuentra el

sitio de reconocimiento de motivos EEVD (glutámico-glutámico-valina-aspártico), responsable de la interacción con co-factores como inmunofilinas y fosfoproteína 1 inducida por estrés, entre otros. [99] El dominio C posee un sitio de unión a ATP alternativo, que se vuelve accesible cuando el sitio de unión a ATP del dominio N está ocupado [100].

El factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) tiene mayor afinidad por el promotor del gen codificante para HSP90 que por el de HSP70, esto hace que la proteína HSP90 se exprese a niveles más altos que la HSP70 y que sea el mayor represor de HSF1[101]. HSP90 α es la forma inducible mientras que la HSP90 β se expresa de forma constitutiva, sin embargo hay estudios de que las dos isoformas pueden ser inducidas aunque por diferentes estímulos, el isómero α por estrés fisiológico y el β por factores de crecimiento o signos de diferenciación [102].

Tabla 3. Funciones de las isoformas HSP90 α y HSP90 β .

HSP90 α	HSP90 β
Regulación ciclo celular	Maduración células germinales
Crecimiento celular	Estabilización citoesqueleto
Citoprotección	Transformación celular
	Transducción señales
	Embriogénesis

En células no tumorales no sometidas a estrés, HSP90 desempeña una serie de funciones importantes, que incluyen el plegamiento, el transporte intracelular, el mantenimiento y la degradación de las proteínas, además de facilitar la señalización celular. Un gran número de proteínas requieren la ayuda de la HSP90 para mantenerse activas, aunque requiere de otras co-chaperonas como Cdc37, p23, HOP y CHIP, que le permiten asociarse con un número significativo de proteínas de señalización incluyendo receptores esteroideos, tirosinas kinasas como v-*Src*, y serina/treonina kinasas como Raf-1 o Akt [103]. Regula la actividad de los receptores de hormonas esteroideas, en ausencia de la hormona correspondiente el receptor se asocia con varias proteínas celulares, entre ellas HSP90, que lo mantienen inactivo. En presencia de progesterona, HSP90 se libera y el receptor cambia su conformación para poder unirse al ADN,

activando la expresión de los genes correspondientes (Figura 8) [104]. El nivel basal de HSP90 aumenta con el estrés, pudiendo unirse a los microtúbulos para estabilizar el citoesqueleto y activar genes para la supervivencia [41].

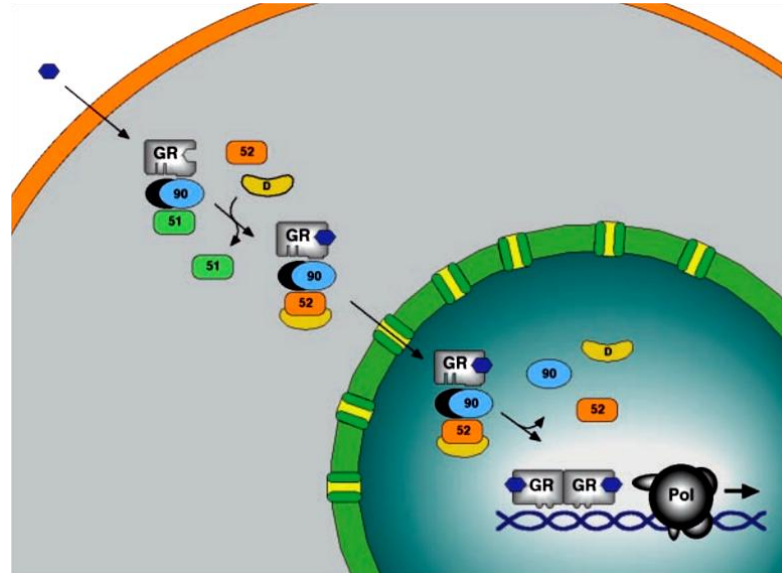


Figura 8. Translocación del receptor de glucocorticoides del citoplasma al núcleo asistido por HSP90. GR: receptor de glucocorticoides; 90: HSP90; 51: inmunofilina FKBP51; 52: inmunofilina FKBP52; Dyn: dineína.

Fuente: Davies et al. [105] *The Journal of biological chemistry* (2002).

Las células tumorales sobreexpresan varias proteínas, incluyendo receptores del factor de crecimiento como EGFR [106] o proteínas de transducción de señales como PI3K y Akt, entre las funciones de HSP90 está la de estabilizar estas proteínas. Por tanto, la inhibición de HSP90 puede inducir apoptosis a través de la inhibición de estas vías de señalización [107]. Otro papel importante de HSP90 es la estabilización de proteínas mutantes como v-Src, el oncogén de fusión Bcr/Abl y formas mutantes de p53 [108]. También se requiere HSP90 para la inducción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la óxido nítrico sintasa (NOS) [109]. Ambos son importantes para la angiogénesis *de novo* que se requiere para el crecimiento del tumor [108]. Además, HSP90 promueve la fase de invasión durante la metástasis asistiendo a la metaloproteinasas de la matriz 2 (MMP2) [110].

Familia HSP100

❖ *HSP104*

Estudios inmunológicos estiman que HSP104 se localiza en el aparato de Golgi de algunos tipos de levaduras, sin encontrar homología con *D. melanogaster* o el hombre. Los miembros de esta familia pertenecen a la familia de proteínas AAA+, que son ATPasas con diversas actividades. Tiene como función regular la agregación/separación de proteínas, pudiendo revertir la toxicidad de la α -sinucleína mutante, TDP-43, FUS y TAF15 [111].

❖ *HSP110*

Se trata del miembro de mayor tamaño de la familia HSP y está muy ligado a la familia HSP70, de hecho, se consideran miembros divergentes de esa familia. HSP110 se encuentra preferentemente dentro o cerca del núcleo [112].

En su estructura se diferencian varios dominios. El dominio A comprende desde los residuos 1 a 394 y es el responsable de la unión a ATP/ADP (NBD). A continuación está el dominio B, desde los residuos 394 al 509. Posee siete hojas- β responsables de la conexión al sustrato (SBD). Los siguientes 98 residuos de la proteína, desde 510 a 608, se cargan negativamente para formar un lazo y constituir el dominio L. Los restantes residuos, del 608 al 858, forman una serie de α -hélices dando lugar al dominio H [113].

Aunque HSP110 posee en su estructura dominios NBD y SBD similares a los de la familia HSP70 y pueden unir como sustratos proteínas desplegadas para volver a plegarlas, no muestran los mismos ciclos alostéricos impulsados por ATP. En cambio, su función principal *in vivo* parece ser la de actuar como factor intercambiador de nucleótidos (NEF) para HSP70. El mecanismo por el cual HSP110 induce la liberación de nucleótidos no está claro, pero es distinto de cómo funcionan otros NEF, ya que HSP110 primero debe unirse a ATP para asumir una conformación que le permita unirse a HSP70 [114]. El complejo resultante HSP110:HSP70 es estable y se disocia solo cuando el ATP se une posteriormente a HSP70 [115].

I. 2.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE CHOQUE TÉRMICO

La respuesta al estrés requiere la activación del denominado factor de choque térmico (HSF) [116]. Este factor conecta con el elemento promotor de choque térmico (HSE), caracterizado por tener cinco repeticiones del motivo 5'-nGAAn-3' y situado a 80-150 pares de base por encima del lugar de iniciación de la transcripción. Las posiciones 3 y 4 del HSE son simétricas, lo que hace que HSF tenga afinidad por unirse a ellas [117]. La unión de HSF conduce a cambios en la organización de la estructura de la cromatina [118].

Todos los HSF tienen en común: una secuencia conservada hélice-vuelta-hélice del dominio de unión al ADN, una repetición hidrofóbica de 80 residuos (HR-A/B) esencial para la trimerización, un dominio responsable de la unión de la proteína y del HSE y, adyacente a éste, otra repetición hidrofóbica (HR-C) encargada de suprimir la trimerización a través de la interacción con HR-A/B [119].

Los HSF regulan la síntesis inducida de HSP durante el crecimiento, el desarrollo y la adaptación. En levaduras e invertebrados existe un único HSF en tanto que en plantas y vertebrados existen varias isoformas. La existencia de varios HSF aún no está clara, pero una de las hipótesis sugiere estar relacionada con la redundancia y especialización de la respuesta [120].

En ausencia de estrés, las HSP se unen a los HSF presentes en el citosol, manteniéndolos como monómeros inactivos, mientras que en presencia de estrés, los HSF se separan de las HSP. La activación del HSF1 humano ocurre en al menos dos pasos. Un primer paso consistente en la formación de un homotrímero capaz de unirse a HSE pero que carece de actividad transcripcional. Y un segundo paso, donde el trímero HSF1 se convierte en una forma transcripcionalmente competente, dando inicio a la síntesis de HSP. La diferencia entre ambos estados es la fosforilación por la PKC o por otra serina/treonina kinasa de los residuos Ser303, Ser307 y Ser363, lo que sugiere un papel regulador en la activación de HSF1 [121] (Figura 9).

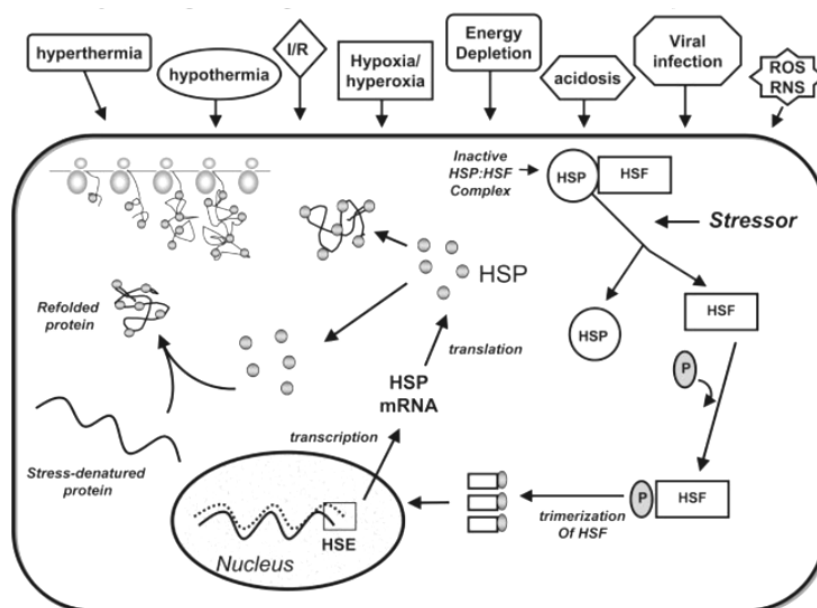


Figura 9. Síntesis de HSP inducida por diferentes tipos de estrés.

Fuente: Kregel [121] *Journal of Applied Physiology* (2002).

Factor de choque térmico 1

HSF1 es el principal factor de transcripción inducido por estrés en vertebrados, *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* [122]. En condiciones normales, HSF1 se encuentra en forma de monómero fosforilado pero ante un estímulo estresante, HSF1 trimeriza y se traslada al núcleo.

La familia de proteínas kinasas MAP inhibe la respuesta al estrés a través de cambios en el estado de fosforilación de HSF1. Esta familia incluye a ERK1 y ERK2 activadas por factores de crecimiento, JNK/SAPK activada por luz ultravioleta, citoquinas pro-inflamatorias, estrés térmico y rayos x; y p38, activada por hiperosmolaridad y estrés térmico [123, 124].

Factor de choque térmico 2

Se conoce muy poco sobre HSF2 en comparación con HSF1. Se sabe que responde a la hemina durante la diferenciación, maduración y embriogénesis, donde pasa de un estado dimérico inerte a un trímero activo [125].

Factor de choque térmico 3

En aves, HSF3 ejerce funciones similares a las de HSF1 y HSF2, sin embargo cuando HSF3 está inhibido, las células quedan claramente comprometidas, incluso en presencia de los otros. Puede ser activado por el oncogén Myb incluso en ausencia de estrés [126].

Factor de choque térmico 4

HSF4 se expresa en corazón, cerebro, musculo esquelético y páncreas de humanos, siendo el único de los cuatro que no es ubicuo. Otra diferencia con los restantes HSF de vertebrados es que carece de la repetición hidrofóbica HR-C [127].

I. 3 APOPTOSIS

El término apoptosis procede del griego (*ἀπόπτωσης*), compuesto por *ἀπό* (*apó*, “desde” o “a partir de”) y *πτωσις*, (*ptōsis*, “caída”). Inicialmente fue acuñado por los botánicos para referirse a la caída de las hojas pero a principio de los 70's Kerr, Wyllie y Currie lo incorporaron a la biología celular. La apoptosis, también denominada muerte celular programada, es un proceso activo de muerte celular dependiente de energía. Está genéticamente regulado por la expresión de genes conservados evolutivamente e involucra una amplia red de señales tanto para su iniciación como para la ejecución [128].

Este proceso forma parte de los mecanismos fisiológicos que controlan el equilibrio tisular, mediante la proliferación y la muerte de las células que componen un tejido, siendo esencial durante la embriogénesis donde se establecen los patrones morfofuncionales de los órganos [129]. Además, ha sido descrito como un proceso altruista a través del cual las células se suicidan silenciosamente para proteger a las células vecinas [130]. Este “suicidio celular” tiene un papel crucial en la eliminación de células no deseadas o dañadas, en el desarrollo y función del sistema inmune y en la protección antitumoral [131].

La apoptosis puede desencadenarse por numerosos estímulos estresantes, entre los que se encuentran hipertermia, presencia de radicales, radiaciones ionizantes, hipoxia, falta de factores de crecimiento u hormonas, citoquinas, glucocorticoides, drogas citotóxicas, agentes quimioterapéuticos, etc. [132].

I. 3.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE EL PROCESO DE APOPTOSIS

Cuando una célula muere por un proceso de apoptosis sufre una serie de cambios bioquímicos y morfológicos característicos muy marcados y coordinados que difieren de los descritos en la muerte por necrosis (Figura 10). Se trata de un fenómeno bastante rápido en el que se dan algunos acontecimientos de manera discreta y otros de forma más evidente.

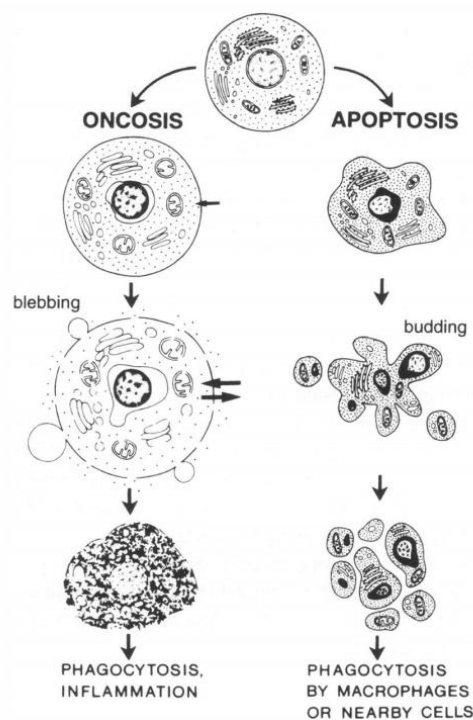


Figura 10. Diferencias morfológicas entre apoptosis y necrosis.

Fuente: modificada de Majno et al. [133] *American Journal of Pathology* (1995).

Uno de los eventos iniciales en la apoptosis es la deshidratación celular. La pérdida del agua intracelular conlleva la constricción de la membrana y una reducción considerable del volumen celular. Los orgánulos se aglomeran y se produce una

reducción del núcleo y una condensación de la cromatina [134]. Simultáneamente se inicia una serie de eventos bioquímicos que activan distintas endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} y que cortan el ADN en los espacios internucleosomales. Esto genera fragmentos de unos 200 pares bases con un patrón característico “en escalera” cuando se analiza el ADN de las células apoptóticas, considerándose como marcador del proceso apoptótico [135].

Una característica específica de la apoptosis es la preservación de la integridad estructural y de la funcionalidad de la membrana plasmática, al menos durante la fase inicial. La deshidratación celular hace que el citoplasma se condense, produciendo cambios en la forma y el tamaño celular, dando lugar al característico “blebbing” o formación de ampollas irregulares en la membrana celular, resultando en la formación de cuerpos apoptóticos con restos de citoplasma, orgánulos y en ocasiones también restos nucleares, rodeados por fragmentos de membrana celular [136, 137].

La constricción de la membrana implica una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática [138]. La pérdida de la asimetría de membrana plasmática debida a la translocación de fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilserina, desde la cara interna de la membrana plasmática hacia su cara externa. Esta exposición anormal de fosfolípidos sirve como señal de reconocimiento y los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula se rompe y libera su contenido al medio [139].

En ocasiones se produce una pérdida del potencial de membrana mitocondrial [138], acidificación intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) [140], movilización del calcio intracelular [141] y la desorganización del citoesqueleto celular [142]. Estos cambios bioquímicos son el reflejo de la activación de una maquinaria intracelular específica que controla este proceso, de la que son especialmente importantes un conjunto de enzimas proteolíticas llamadas caspasas [143].

I. 3.2 CASPASAS

La inducción y la ejecución de la apoptosis requieren de la coordinación entre proteínas adaptadoras, receptores de membrana, enzimas y proteínas reguladoras de la expresión génica.

La familia de las caspasas, son el eje central de la maquinaria celular implicada en la apoptosis [144]. El término caspasa deriva de *cisteinil - aspartato proteasa*, ya que estas enzimas son cisteínas proteasas, caracterizadas porque su actividad catalítica depende de un residuo de cisteína situado en una secuencia peptídica altamente conservada del centro activo de la enzima, y porque cortan específicamente su sustrato después de un residuo de ácido aspártico [143]. La estricta especificidad de las caspasas no implica una digestión proteica indiscriminada, sino que sólo un grupo de proteínas es diana para ser procesado.

En mamíferos, la familia de las caspasas se compone de 14 proteínas diferentes en base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades de su procaspasa, pudiendo clasificarlas en caspasas inflamatorias o caspasa apoptóticas.

El grupo de caspasas inflamatorias está formado por las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14. Se caracterizan por estar involucradas principalmente en la maduración proteolítica de las prointerleuquinas -1- β y -18 a sus formas pro-inflamatorias y biológicamente activas [145]. El grupo de las caspasas apoptóticas está formado por las caspasas relacionadas con el gen *ced-3* de *C. elegans* y juegan un papel importante en el desarrollo del proceso apoptótico. Según su función dentro de la cascada apoptótica podemos distinguir entre caspasas iniciadoras de las apoptosis, como las caspasas -2, -8, -9, y -10, y las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, encargadas de la ejecución de la apoptosis degradando directamente múltiples sustratos celulares [146].

Inicialmente las caspasas se sintetizan como zimógenos o precursores enzimáticos inactivos, denominadas procaspasas. Las caspasas están reguladas postraduccionalmente de modo que pueden ser activadas rápidamente. Contienen tres dominios (Figura 11), un prodominio en el extremo N-terminal, una subunidad mayor (~ 20 kDa) que posee cisteína en el centro activo dentro de un motivo conservado y una subunidad menor (~ 10 kDa) en el extremo C-terminal. El prodominio y la subunidad mayor están separados por un lugar de corte con aspartato, y la subunidad mayor está

separada de la menor por uno o dos motivos de este tipo. La presencia de aspartato en los motivos de corte para la maduración de las caspasas es consistente con la habilidad de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación [147, 148].

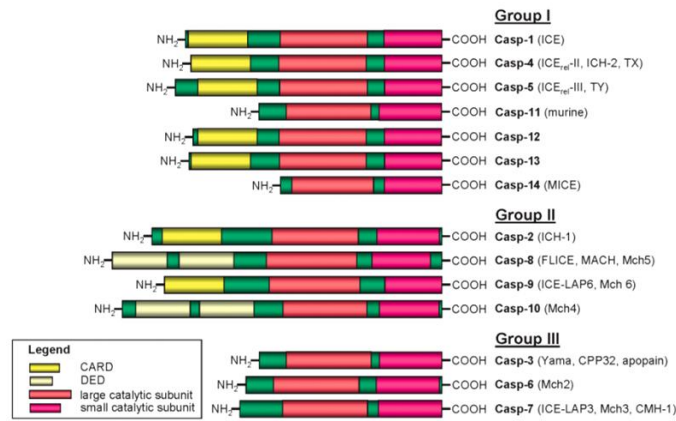


Figura 11. Familia de caspasas. Grupo I: caspasas inflamatorias, Grupo II: caspasas apoptóticas iniciadoras, Grupo III: caspasas apoptóticas ejecutoras.

Fuente. Lavrik et al. [149] *Acta naturae* (2009).

Los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas [150]. Sin embargo, las procaspasas inflamatorias y las apoptóticas iniciadoras poseen prodominios largos, excepto la procaspasa-14, que lo tiene muy corto o no tiene [151]. El prodominio largo puede contener el dominio efector de muerte o DED, *death effector domain*, como en las procaspasas -8 y -10; o bien, el dominio de reclutamiento de las caspasas o CARD, *caspase recruitment-domain*, como en las procaspasas -2 y -9. DED y CARD, pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte y permiten las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores. Además, juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas (Figura 11).

La activación de las procaspasas implica el procesamiento proteolítico en los residuos de ácido aspártico que separan cada uno de los tres dominios del zimógeno [152]. Tras la proteólisis, se produce una asociación entre la subunidad grande y la pequeña para formar un heterodímero y dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos independientes que unirán y cortarán el sustrato (Figura 12) [153].

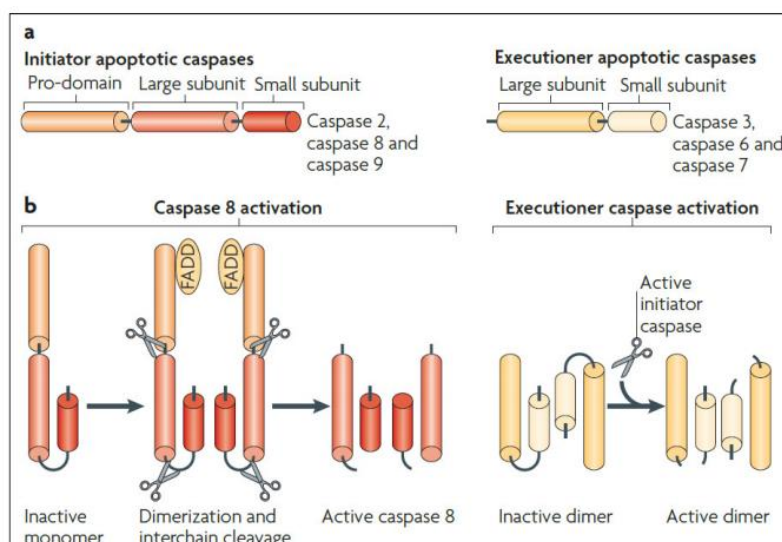


Figura 12. Clasificación y activación de las caspasas.

Fuente: Tait et al. [154] *Nature reviews. Molecular Cell Biology* (2010).

La activación de las caspasas puede darse mediante tres mecanismos. En primer lugar, mediante el procesamiento por otra caspasa, estrategia utilizada para la activación de las caspasas efectoras con prodominio corto -3, -6 y -7. Todos los dominios de la proenzima se mantienen y sólo se produce un cambio conformacional al cortar en el residuo de ácido aspártico. Estas enzimas pueden autoactivarse o ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación [155].

En segundo lugar, la activación inducida por proximidad, estrategia utilizada para la activación de las procaspasas -8, -9 y -10 durante el desarrollo de la apoptosis extrínseca. Este tipo de activación requiere de la participación de los receptores de muerte situados en la superficie de la membrana plasmática. Tras la activación, estos receptores se agregan y reclutan una serie de moléculas adaptadoras y a las procaspasas formando complejos de señalización de inducción de muerte o DISC, *death-inducing signalling complex* [156, 157]. En estas condiciones se aumenta la concentración local de estas procaspasas lo que permite que varias moléculas inactivas se corten mutuamente y se activen unas a otras (Figura 13) [158, 159].

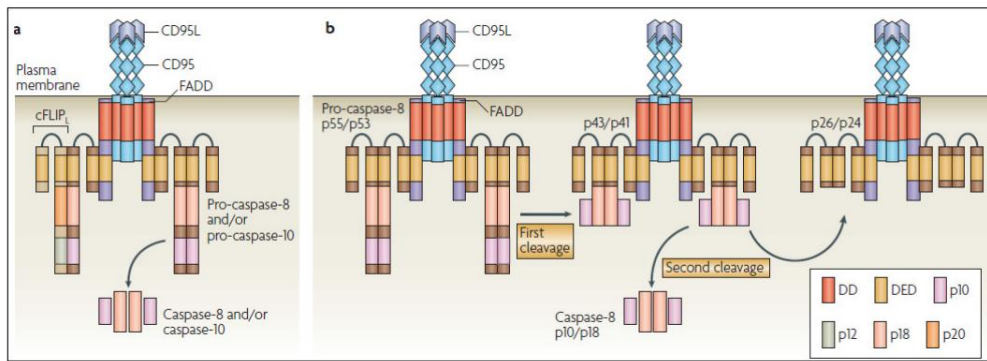


Figura 13. Activación por proximidad a través de DISC.
 Fuente: Krammer et al. [160] *Nature reviews. Immunology* (2007).

La última vía de activación consiste en la asociación con una subunidad reguladora. Es el mecanismo de activación más complejo y el utilizado por la procaspasa-9. Requiere de la molécula Apaf-1 para activarse. Apaf-1 presenta 3 dominios funcionales, el extremo N-terminal tiene una secuencia CARD con una alta homología a la secuencia CARD de la caspasa-9; en la zona central presenta un dominio de unión del dATP; y, en el extremo C-terminal está el dominio WD-40. El dominio WD-40 está implicado en la unión proteína-proteína, a través de cual el citocromo *c* interacciona con Apaf-1 (Figura 14. a) [161]. La unión del citocromo *c* y de la molécula de ATP facilita un cambio conformacional en la estructura de Apaf-1 permitiendo que oligomerice con otras moléculas de Apaf-1 y forme un heptámero, surgiendo una estructura denominada apoptosoma, que reclutará procaspasas-9 a través de interacciones entre los dominios CARD presentes tanto en Apaf-1 como en la procaspasa 9 [162, 163]. La activación de la procaspasa 9 dentro del apoptosoma se produce por una proteólisis autocatalítica (Figura 14. b) [164, 165].

La activación de las caspasas no implica una degradación indiscriminada de proteínas celulares. En la mayoría de los casos, el procesamiento mediado por las caspasas resulta en la inactivación de la proteína. Las caspasas pueden también activar proteínas, bien directamente mediante el corte de un dominio de regulación negativa, o bien indirectamente mediante la degradación de una subunidad inhibidora. La lista de substratos de caspasas incluye más de 30 proteínas.

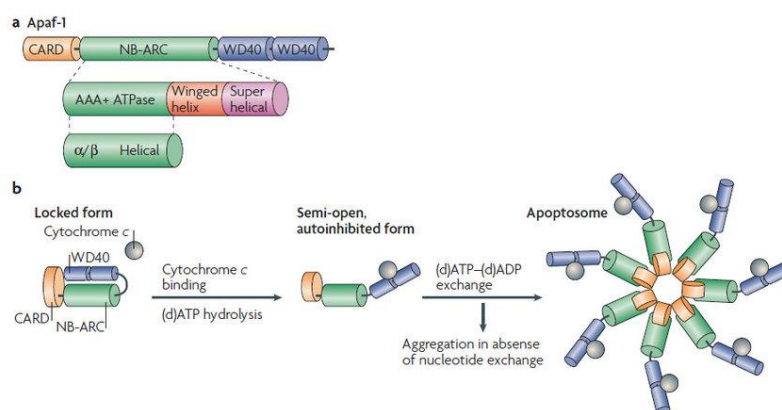


Figura 14. Mecanismo de formación del apoptosoma.

Fuente: Riedl et al. [166] *Nature reviews. Molecular cell biology* (2007).

I. 3.3 VÍAS DE ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS

Tradicionalmente se han descrito dos vías por las que se activa la apoptosis: la apoptosis intrínseca ó mitocondrial, mediada por el estrés celular o por la lesión en el ADN; y, la apoptosis extrínseca mediada por ligandos que se unen a sus receptores en la superficie celular.

Ambas vías producen la activación de las caspasas iniciadoras y convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, responsables de la muerte apoptótica [167]. Además de estas dos vías, se han descrito otras como la vía de activación de caspasas vinculada al estrés en el retículo endoplásmico [168, 169]. En ocasiones, la activación de las caspasas no guarda relación con el proceso de apoptosis [170].

Vía intrínseca o mitocondrial

La apoptosis inducida por señales intrínsecas se inicia en la mitocondria, donde convergen numerosos estímulos citotóxicos y apoptóticos que alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la pérdida de su potencial de membrana [171].

La alteración de la permeabilidad mitocondrial externa hace que una serie de proteínas que en condiciones normales se localizan en el espacio intermembrana de la mitocondria sean liberadas al citoplasma celular, donde promueven la activación de las caspasas (Figura 15) [172].

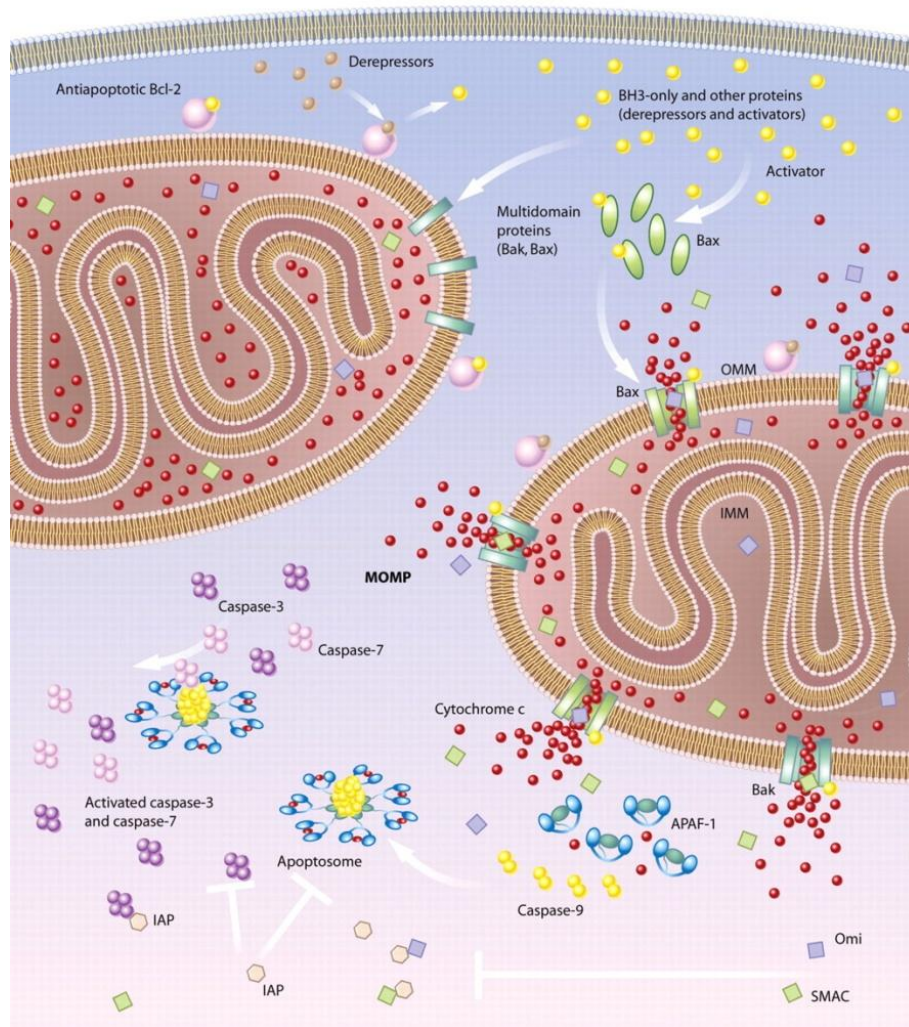


Figura 15. Vía intrínseca de la apoptosis.
Fuente: Spierings et al. [173] *Science* (2005).

Se han descrito tres mecanismos por los que se provoca la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa durante la apoptosis. El primero, contempla la formación del complejo del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTm). El PPTm funciona como un canal aniónico que permite el paso de agua y de moléculas de hasta 1,5 kDa, y participa en la regulación del Ca^{2+} , el pH, el potencial de membrana mitocondrial y el volumen de la mitocondria [174].

El segundo mecanismo implica a las proteínas de la familia Bcl-2. Mientras que las proteínas pro-apoptóticas se insertan en la membrana mitocondrial formando canales que provocan la despolarización mitocondrial, las proteínas anti-apoptóticas evitan la salida de factores proapoptóticos por esos canales. [171].

El tercer mecanismo englobaría a los anteriores. Se ha demostrado que la proteína pro-apoptótica Bax interacciona con las proteínas que componen el PPTm, formando canales iónicos en la membrana interna mitocondrial y constituyendo canales permeables para el citocromo *c* en la membrana mitocondrial externa [172, 175].

Las alteraciones en la permeabilidad y el potencial de membrana de la membrana mitocondrial induce la liberación al citoplasma de moléculas pro-apoptóticas entre las que se incluyen el citocromo *c*, Smac/DIABLO, el factor inductor de la apoptosis (AIF), la proteasa Omi/htrA2 y la endonucleasa G [143]. El citocromo *c* actúa activando la molécula adaptadora Apaf-1 con la consecuente activación de la caspasa-9 [176]. La liberación de AIF y la endonucleasa G al citoplasma, y su posterior translocación al núcleo, contribuyen a la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN sin la necesidad de la activación de las caspasas [177].

Por su parte, Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 facilitan la activación indirecta de las caspasas al actuar como inhibidores de los inhibidores endógenos de las caspasas como las IAPs [178].

Vía extrínseca o vía de los receptores de muerte

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la activación de los receptores de muerte anclados en la membrana plasmática cuando se unen ligandos específicos a ellos (Figura 16).

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), constituida por más de 20 proteínas con un amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la regulación de la supervivencia y la muerte celular al conectar las señales extracelulares inductoras de muerte con la apoptosis intracelular [179]. Los receptores de muerte más conocidos son el APO1/Fas/CD95 (antígeno de apoptosis-1), el TNFR1 (receptor 1 de TNF) y el TRAILR1 (*TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1*).

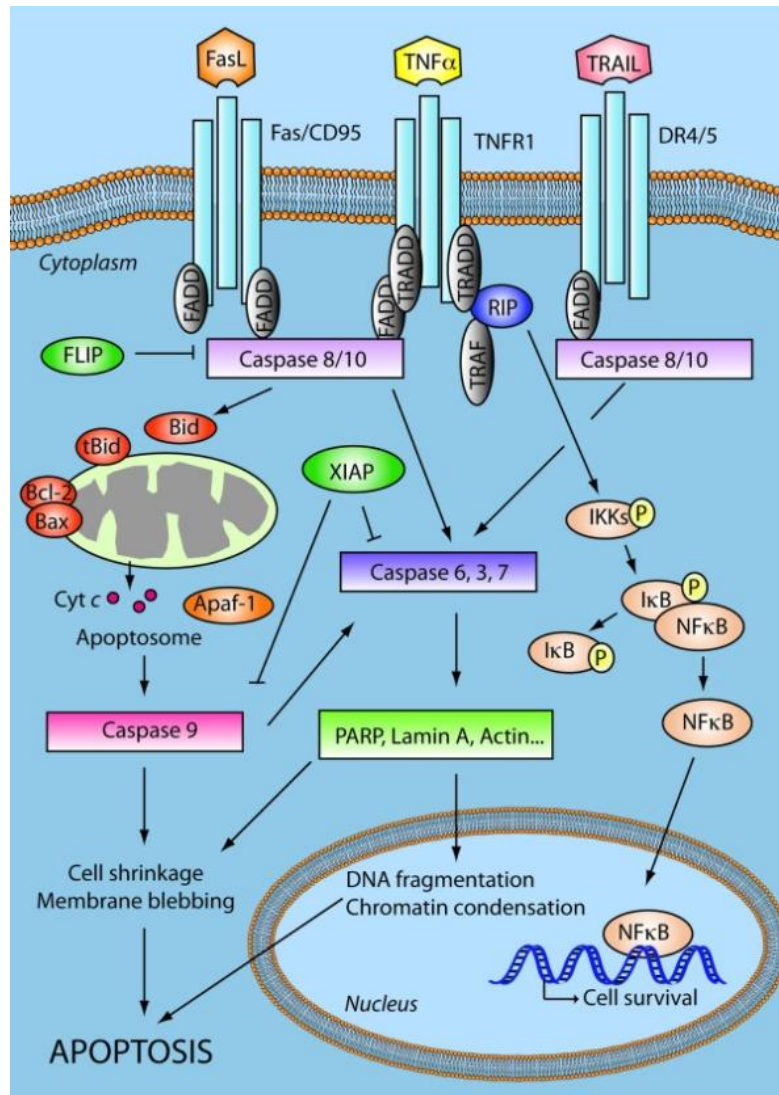


Figura 16. Vía extrínseca de la apoptosis.

Fuente: Krakstad et al. [180] *Molecular cáncer* (2007).

Estos receptores se caracterizan porque en la parte intracelular contienen un dominio de interacción con otras proteínas denominado dominio de muerte o DD (*Death Domain*). Dicho dominio es fundamental para la transmisión del estímulo apoptótico al servir como anclaje para una serie de proteínas señalizadoras que también poseen DD: la proteína adaptadora FADD, que puede interactuar directamente con el receptor, en el caso de Fas y TRAILR1, o indirectamente, a través de otra proteína adaptadora denominada TRADD (dominios de muerte asociados al TNFR) en el caso del TNRF1 (Figura 16) [180]. Además, los receptores de muerte poseen en su parte extracelular entre 2 y 4 dominios ricos en cisteína (CRDs) donde se unen sus ligandos específicos. La unión del ligando al receptor da lugar al reclutamiento a través de su DD de las moléculas adaptadoras FADD y TRADD [179]. Estas moléculas adaptadoras

contienen dominios efectores de muerte o DED, que interacciona con los DED de las caspasas -8 y-10 para formar el complejo intracelular multiproteico DISC [156, 157]. Una vez formado, el DISC promueve la activación de la caspasa-8 inducida por proximidad, la cual comienza a ser rápidamente activada por un mecanismo proteolítico [156]. Tras este proceso autocatalítico, la caspasa-8 se libera del DISC completamente activa, pudiendo activar directamente otros miembros ejecutores de la familia de las caspasas, como la caspasa-3, cuya activación conduce a la fase ejecutora de la apoptosis (Figura 16) [180].

Vía dependiente del estrés reticular

Existiría una tercera vía de activación de la apoptosis dependiente del estrés del retículo. La concentración de Ca^{2+} dentro del retículo genera un estrés oxidativo que altera las condiciones y las propiedades fisiológicas del interior del retículo afectando a la actividad de las chaperonas. Esto provoca la acumulación de proteínas sin plegar o incorrectamente plegadas en el interior del retículo, generando el llamado estrés reticular. Como respuesta al estrés reticular se inicia la respuesta a proteínas no plegadas o UPR, *Unfolded Protein Response*, la cual es mediada por las proteínas PERK (*Protein Kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), IRE1 (*Inositol Requiring Kinase 1*) y ATF-6 (*Activating Transcription Factor 6*), que promueve la muerte celular [181].

Sin embargo, cuando el daño es muy intenso y la UPR no es capaz de restablecer las condiciones y propiedades fisiológicas del ER, se inicia la activación de la vía apoptótica inducida por el estrés reticular y en la que inicialmente participan los mediadores de UPR [182]. La apoptosis inducida por el estrés reticular se ha descrito como un proceso heterogéneo y complejo en el que están implicados múltiples factores como la activación directa de diversas caspasas iniciadoras, las proteínas de la familia Bcl-2 y la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. [182, 183].

I. 3.4 APOPTOSIS Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio a favor de la producción de especies reactivas de oxígeno con respecto a las defensas antioxidantes de una célula. El término especies reactivas de oxígeno o ERO, engloba moléculas y radicales libres derivados del oxígeno molecular (O_2). Generalmente son moléculas muy pequeñas,

altamente reactivas y con un gran poder oxidante debido a una capa de electrones de valencia desapareados que les permite interactuar con otras moléculas orgánicas mediante reacciones de oxido-reducción. Las ERO están involucradas en una gran variedad de procesos celulares desde la muerte celular tanto por apoptosis como por necrosis hasta la proliferación celular y carcinogénesis [184].

Generación de ERO

Toda célula aeróbica genera ERO como subproducto de determinadas reacciones bioquímicas y en respuesta a algunos estímulos [185]. Cualquier proteína o sistema enzimático capaz de transferir electrones puede generar ERO como resultado de la reacción de transferencia electrónica. Este es el caso de NAD(P)H oxidasa, peroxisomas, xantina oxidorreductasa, acilCoA oxidasa, citocromos P-450, ciclooxigenasas, lipooxigenasa además de pequeñas moléculas autooxidables como grupos tioles, hidroquinonas, catecolaminas y flavinas [186].

De entre todos, la cadena transportadora de electrones situada en la membrana mitocondrial interna es el sistema más importante de generación de ERO. La principal función de este sistema es la transferencia de electrones procedentes del ciclo de Krebs y de la β -oxidación de los ácidos grasos a través de una serie de complejos donde sufrirán reacciones de oxido-reducción, transportándose desde el NADH y el FADH₂ hasta transferirlos al receptor final, el O₂.

Esta transferencia de electrones está acoplada a la generación de un gradiente electroquímico de H⁺ que da lugar tanto a un gradiente de pH, como a una diferencia del potencial de membrana mitocondrial. Desviaciones en el normal funcionamiento de la cadena transportadora conducen a un desacoplamiento en la transferencia de electrones, provocando la generación de radical superóxido (O₂⁻), especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otras ERO que sí pueden ser altamente reactivas. La adición de un segundo electrón o la dismutación del O₂⁻, de forma espontánea o a través de la superóxido dismutasa, genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂), una molécula capaz de atravesar las membranas biológicas [187]. En el H₂O₂, que no es un radical libre propiamente dicho, la unión entre ambos oxígenos es muy débil lo que le confiere alta reactividad. El H₂O₂ puede ser completamente reducido a agua (H₂O) en una reacción catalizada por la catalasa o la

glutación peroxidasa, pero también puede descomponerse fácilmente y ganar otro electrón para convertirse mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss en el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), uno de los oxidantes más potentes y con mayor toxicidad de la naturaleza. Finalmente la incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de H_2O (Figura 17) [188].

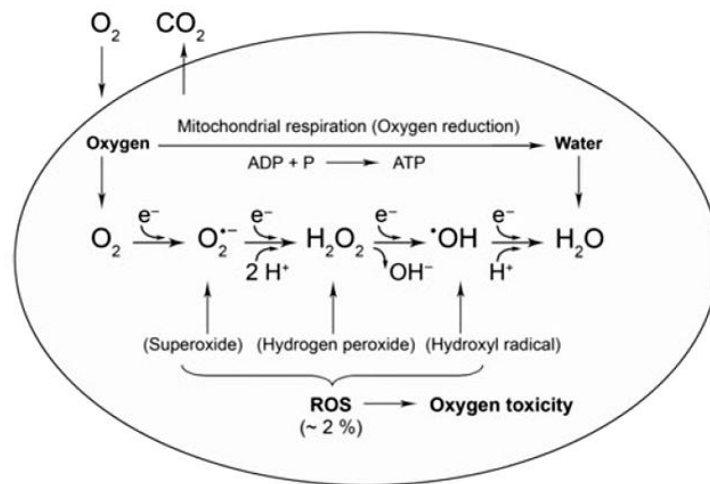


Figura 17. Formación de ERO como efecto secundario del flujo de electrones en la mitocondria.
Fuente: Kutschera et al. [189] *Theory in biosciences* (2013).

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) generando diversas especies reactivas de nitrógeno o ERN, como el peroxinitrito (ONOO^-), otro potente oxidante. El radical ONOO^- suele estar en equilibrio con su ácido conjugado (ONOOH). Se comporta como un potente oxidante, capaz de reducir grupos tioles o tioéteres, capaz de nitrar residuos de tirosina, de guanosina y de degradar carbohidratos, por lo que pueden iniciar la peroxidación lipídica y puede fragmentar el ADN [190].



Papel de las ERO en la apoptosis

El metabolismo celular depende de un continuo aporte de ATP de la mitocondria, esencial en la mayoría de los tejidos. Por tanto, cualquier daño en la

cadena respiratoria podría tener un gran impacto sobre la viabilidad celular. La concentración de $O_2^{\cdot-}$ en la matriz mitocondrial es entre 5 y 10 veces mayor que en el citosol o en el núcleo [191]. Los radicales libres generados en la mitocondria podrían inhibir uno o más componentes de la cadena de transporte de electrones, lo que contribuye a la aparición de una disfunción en condiciones de estrés oxidativo [192]. Por ello, la célula cuenta con un sistema de defensa de detoxificación de ERO, además de sistemas de reparación de los daños causados por las mismas.

Las ERO son capaces de oxidar indiscriminadamente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos alterando su estructura y su función [193]. Este tipo de reacciones lleva a la formación de agregados de proteínas y facilita la formación del PPTm, que provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas, como el citocromo *c*, desde el espacio intermembrana al citoplasma celular, que iniciarán la cascada de reacciones que culminan en la apoptosis [194].

Una de las principales dianas de ERO es el ADN mitocondrial (ADNmt), que codifica para 30 polipeptidos esenciales para la cadena de transporte de electrones y generación de ATP por fosforilación oxidativa. El ADNmt es especialmente susceptible debido a su proximidad a la cadena de transporte de electrones y a la falta de histonas protectoras. Bajo condiciones de estrés oxidativo el ADNmt contiene un número de entre 10 y 20 veces mayor de bases modificadas que el ADN nuclear. El daño oxidativo en el ADN es la principal fuente de inestabilidad genómica de la mitocondria y conlleva a la disfunción respiratoria, envejecimiento prematuro, aparición de cáncer y enfermedades neurodegenerativas [195].

Un importante mecanismo de toxicidad del $O_2^{\cdot-}$ es la oxidación directa e inactivación de las proteínas hierro-azufre (Fe-S), tales como las aconitasas y las asociadas liberación de hierro. La aconitasa mitocondrial, posee un centro Fe-S y juega un papel importante en el ciclo de Krebs catalizando la conversión de citrato a isocitrato. La inhibición de la aconitasa deriva en una disfunción del ciclo teniendo un gran impacto en la producción energética y la viabilidad celular. Otra proteína Fe-S que se ve afectada es la NADH deshidrogenasa del complejo I [196].

La relación entre ERO y apoptosis ha sido puesta de manifiesto en diversos trabajos realizados por nuestro grupo de investigación. En concreto, ha observado que el

tratamiento de plaquetas con su agonista fisiológico trombina, genera H_2O_2 y despolariza la membrana mitocondrial induciendo apoptosis, evento que queda inhibido tras el tratamiento con catalasa. Cuando las plaquetas se trataron con H_2O_2 exógeno aumentó significativamente la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de la caspasa-9, como consecuencia de tales eventos hubo un aumento en la activación de la caspasa-3 y la externalización de la fosfatidil serina [140]. Adicionalmente, ha sido puesto de manifiesto que el tratamiento con H_2O_2 de células de pancreatoma de rata AR42J induce un aumento en la $[Ca^{2+}]$, despolarización mitocondrial, liberación de citocromo c y activación de caspasa-3 a través de un mecanismo que requiere la recaptación mitocondrial de calcio [197]. En células germinales, como los espermatozoides humanos expuestos a tratamiento con H_2O_2 hemos observado que existe un aumento de la activación de las caspasas 3 y 9 y posterior externalización de fosfatidil serina, en un proceso calcio-dependiente [198]. De manera similar, los efectos del H_2O_2 en células leucémicas humana HL-60 tienen efectos parecidos, ya que la inducción de la despolarización de membrana mitocondrial y posterior activación de las caspasas-3 y -9 se llevaba a cabo por procesos calcio-dependientes [199].

I. 3.5 EVASIÓN DE LA APOPTOSIS POR CÉLULAS TUMORALES

La resistencia que muestran las células tumorales a la apoptosis no implica una completa evasión a la muerte, pudiendo ocurrir mediante senescencia o necrosis, a través de vías independientes de caspasas.

Cuando las células tumorales se ven expuestas a la terapia combinada de estrés térmico y a agentes quimioterapéuticos, presentan una tasa elevada de muerte en comparación con las células que son únicamente tratadas con quimioterapéuticos [200]. Sin embargo, esto no sucede cuando las mismas células se exponen al calor antes del tratamiento, ya que terminan por desarrollar resistencia [201].

Las células tumorales presentan algunas características comunes que las hacen ser resistentes, como la sobreexpresión de las proteínas Bcl-2 [202], survivina [203] y BAG, cuya localización nuclear durante la radioterapia está asociada a un mal pronóstico [204].

Son muchas y variadas las funciones que las HSP desempeñan en la apoptosis, y aunque en la mayoría de los casos conduce a la inhibición de las vías apoptóticas, el modo de actuación es complejo y controvertido. Curiosamente, las mismas señales de estrés que desencadenan la apoptosis también estimulan la expresión y liberación de las HSP. Sin embargo, la inducción de HSP reprime la apoptosis mediante la inhibición de factores pro-apoptóticos, como p53, Bax, Bid, Akt, Apaf-1 y Bcl-2 [205]

La sobreexpresión de proteínas de estrés está implicada en la supervivencia de las células tumorales [206]. HSP27, HSP70 y HSP90 aparecen en altas concentraciones en células tumorales debido a su capacidad de inhibir la apoptosis [207]. En células no tumorales p53 y p63 actúan como represores, inhibiendo la transcripción de genes HSP al unirse a sus promotores [208]. Cuando aumenta la expresión de p53 se produce una disminución de la proliferación celular, las células permanecen en la fase G1 cuando deberían proseguir a fase S. En células tumorales se produce un aumento de la transcripción de HSP debido a que disminuye la expresión de p53 y además aumenta la expresión de los proto-oncogenes HER2 y c-Myc [209]. Algunos cánceres como pulmón y mama, presentan mutaciones en p53 resultando en una resistencia a la apoptosis [210].

Las HSP se asocian a indicadores de estrés o apoptosis y bloquean la muerte celular, promoviendo supervivencia, proliferación o diferenciación. Pueden evadir el proceso de apoptosis a varios niveles: regulando las vías de señalización anteriores a la mitocondria, como la vía Akt; a nivel mitocondrial, controlando la liberación de citocromo *c*; y, a nivel post-mitocondrial interactuando con el citocromo *c* o con proteínas como Apaf-1 y/o Smac/DIABLO [211].

La sobreexpresión de HSP afecta tanto a la vía intrínseca como a la extrínseca, previniendo la activación de caspasas, la agregación de proteínas y el daño mitocondrial en respuesta a estímulos apoptóticos como la acumulación de ERO y daños en el ADN. Por otro lado, la depleción de estas proteínas es suficiente para desencadenar el proceso de apoptosis mediante activación de caspasa-3, incluso en ausencia de estímulo apoptótico [211].

La sobreexpresión de HSP en células tumorales se relaciona también con muchos procesos clave en la oncogénesis, como la autosuficiencia en señales de

crecimiento, la estabilización de proteínas mutantes, la angiogénesis y la metástasis [212]. Las células tumorales que expresan HSF1 y HSP tienen una elevada tendencia a invadir otros tejidos y extenderse [213]. Existe una correlación entre los niveles de HSP27 y HSP70, y la capacidad de invasión y/o metastización tumoral. Ambas son proteínas citoprotectoras con papeles esenciales en la aparición de células malignas al evitar la muerte tanto por apoptosis como por senescencia [14].

Las células tumorales dependen en mayor medida de la actividad chaperona de las HSP que las células sanas para la proliferación y supervivencia debido a que las oncoproteínas en las células tumorales a menudo están mal plegadas y requieren de ellas. Esto conduce al planteamiento de desarrollar inhibidores de HSP como posible terapia del cáncer tanto en el tratamiento preclínico como en el clínico.

HSP27

HSP27 desempeña multitud de funciones durante el estrés celular que daría respuesta a los efectos citoprotectores observados cuando aumenta la expresión de esta proteína. Entre ellas se incluiría su papel como chaperona, la interferencia con los mecanismos de activación de la caspasa o la modulación del estrés oxidativo.

En células estresadas con altos niveles de proteínas dañadas el aumento de la expresión de HSP27 facilita su reparación promoviendo así la recuperación celular. o la destrucción, si el daño es irreversible [214]. Esta capacidad de HSP27 puede aumentar la tasa de supervivencia celular al limitar los niveles de proteínas mal plegadas que, en última instancia, podría ser responsable de desencadenar la apoptosis. Además, como chaperona molecular es responsable de la regulación de la apoptosis a través de su interacción con Akt, ya que la activación de ésta última inhibiría la apoptosis [215]. Durante el estrés celular inducido por peróxido de hidrógeno y calor, la interacción entre Akt y HSP27 puede contribuir al aumento de la resistencia a la apoptosis en células que expresan niveles altos de HSP27 [216]

HSP27 también tiene la capacidad de interferir en los mecanismos de activación de caspasas. Parece ser que HSP27 se concentra en la mitocondria de manera similar a la proteína antiapoptótica Bcl-2, e incluso podría actuar de igual modo, inhibiendo la apoptosis al prevenir la liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembrana

[217]. De este modo, HSP27 regula negativamente la activación de procaspasa-9 por su incapacidad de interactuar con el citocromo *c* e impidiendo la correcta formación del apoptosoma [218] HSP27 también puede inhibir la activación de la caspasa-3 al interactuar con la procaspasa-3, posiblemente al evitar que caspasas iniciadoras como la caspasa-9, tengan acceso a las dianas de procesamiento que activan la enzima (Figura 18) [219].

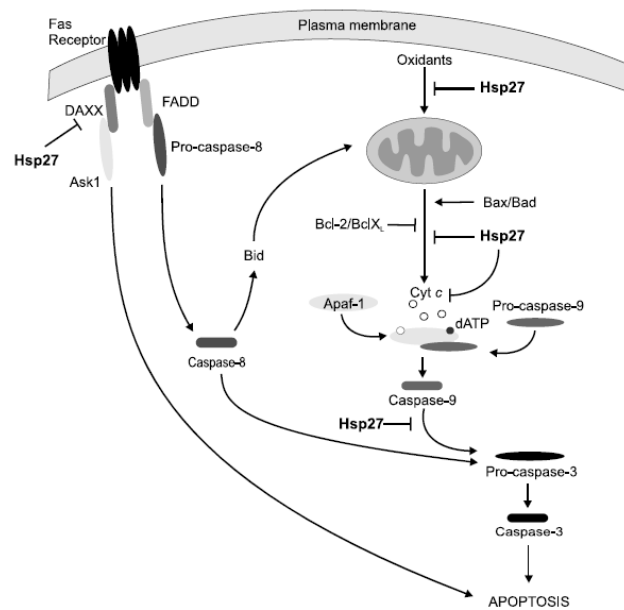


Figura 18. Regulación de la apoptosis por HSP27.
Fuente: Concannon et al. [220] Apoptosis (2003).

La generación de ERO desempeña un papel fundamental en la muerte celular inducida por numerosos estímulos. Cuando una célula está expuesta a ciertos tóxicos, como el TNF- α o el peróxido de hidrógeno, los niveles de ERO intracelulares aumentan rápidamente debido a una disfunción mitocondrial [221]. En este aspecto, HSP27, protege a las células de las ERO al modular y mantener los parámetros redox dentro de ellas. Aunque HSP27 carece de actividad desintoxicante de ERO, puede aumentar los niveles intracelulares de glutatión, actuando como un sistema amortiguador que previene la oxidación de proteínas [222].

HSP27 está presente en etapas específicas de desarrollo en diversos tipos de cáncer como mama [223], ovario [224], leucemia [225], colon [226] o próstata [227]. Cuando su patrón de fosforilación aparece alterado, alcanzando altos niveles de HSP27 hiperfosforilada, se correlaciona con un mal pronóstico de cáncer [228]. En células

leucémicas se ha descrito como marcador de pre-diferenciación ya que su inducción se produce en etapas tempranas [229]. El papel de HSP27 en la diferenciación puede deberse a que su expresión aumenta a medida que las células alcanzan la fase no proliferativa/quiescente en el ciclo celular (G0/G1).

La sobreexpresión de HSP27, no sólo potencia la capacidad tumorogénica [36], sino también la de metastatizar [230]. Además, desempeña un papel fundamental en la angiogénesis. La hiperfosforilación de HSP27, requisito para la remodelación del citoesqueleto, es inducida por VEGF e inhibida por factores fisiológicos anti-angiogénicos como la endostatina, la fumagilina o la trombospondina-1 [231].

❖ *Inhibidores de HSP27*

La inhibición de HSP27 surge en respuesta a sus efectos antiapoptóticos y a la citoprotección que ofrece contra fármacos quimioterapéuticos [232].

Una de las estrategias más efectiva es el uso de oligonucleótidos antisentido o siRNA, tanto en cultivos *in vitro* [233], como en xenoinjertos *in vivo* [234]. Otra de las estrategias es actuar sobre los agentes moduladores que disminuyen la función antiapoptótica de HSP27 [235]. Estos agentes poseen actividad antitumoral en tumores que expresan altos niveles de HSP27 y pueden tener un potencial clínico significativo [228].

Tiolutina, es un antibiótico azufrado que actúa como inhibidor de la transcripción a través de diversas vías comprometiendo la estabilidad del ARNm y la expresión génica [236]. Se ha visto que es capaz de inhibir la adhesión de células endoteliales al impedir las interacciones entre HSP27 con componentes del citoesqueleto como la actina y los filamentos intermedios [237]. Además, puede inhibir la angiogénesis inducida por células tumorales *in vivo* mediante la adhesión de células endoteliales a vitronectina [238].

HSP70

HSP70 puede interactuar con múltiples componentes de las vías apoptóticas, tanto dependientes como independientes de caspasas.

HSP70 tiene la capacidad de interferir en los mecanismos de activación de caspasas. Aunque el mecanismo exacto aún se desconoce, parece ser que HSP70 puede asociarse directamente con Apaf-1 y bloquear la formación del apoptosoma, de este modo regula negativamente la activación de procaspasa-9 [239].

También afecta a algunos factores de transcripción involucrados en la expresión de la familia Bcl-2. Bcl-2 y Bax son objetivos transcripcionales de la proteína p53 supresora de tumores. La expresión de p53 induce apoptosis en respuesta al daño en el ADN. Algunos estudios muestran como varios miembros de la familia HSP70, inducidos (HSP70) o no (Hsc70), son capaces de estabilizar complejos con p53 mutada y prevenir sus efectos apoptóticos [240]. Así como la presencia de HSP70 en membranas lisosomales de células tumorales, inhibe la muerte asociada a permeabilización de los lisosomas [241].

Actúa inhibiendo las proteínas kinasas que regulan la señal de apoptosis. La regulación negativa de HSP70 facilita la activación de Ask1 inducida por H₂O₂ y la subsiguiente apoptosis [242]. HSP70 también se une a JNK y evita su activación [243].

El papel de HSP70 en la regulación de la función NF-κB es más controvertido. HSP70 citosólica podría inhibir el NF-κB, mientras que la HSP70 asociada a la membrana plasmática podría activar este factor de transcripción [244] (Figura 19).

Es importante destacar que la actividad ATPasa de HSP70 no parece ser necesaria para todas estas actividades, ya que la acción de la proteína sobre JNK y AIF se produce independientemente de la hidrólisis de nucleótidos [245]. Ésta es una observación a tener en cuenta ya que muchos inhibidores de HSP70 tienen como diana la actividad ATPasa [246].

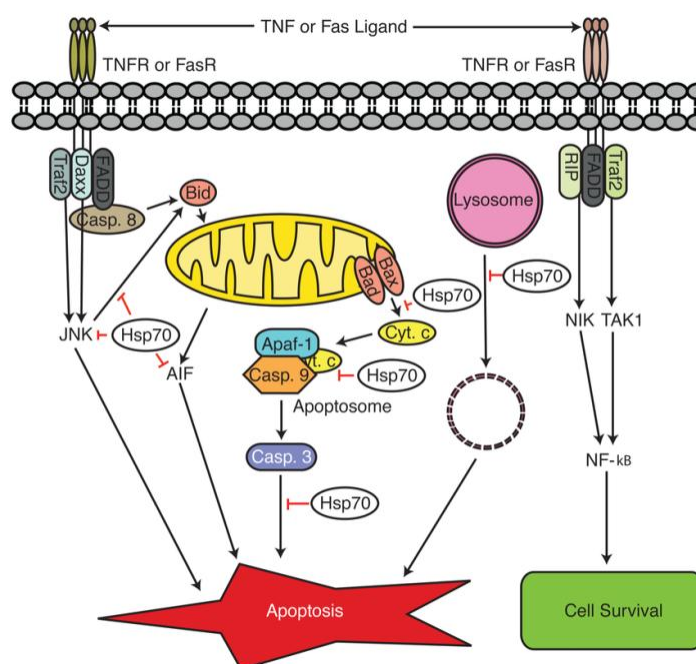


Figura 19. Regulación de la apoptosis por HSP70.

Fuente: Evans et al. [247] *Journal of medicinal chemistry* (2010).

Algunos tipos de células tumorales expresan receptores de HSP70 que median en su internalización teniendo como consecuencia mayor supervivencia y crecimiento celular [248]. La sobreexpresión de HSP70 potencia la tumorigénesis [249] y suele relacionarse con tumores malignos en fase avanzada de endometrio [250], riñón [251], mama [252] y cuello de útero [253].

❖ *Inhibidores de HSP70*

La inhibición de HSP70 se centra en dos objetivos fundamentalmente. Por un lado, el uso de anticuerpos monoclonales de ratón cmHsp70, con capacidad de unión específica a HSP70 localizada en la membrana de células tumorales [254]; y por otro, el uso de compuestos químicos que tienen la capacidad de modular directamente la actividad de HSP70, teniendo la posibilidad de combinarse con los agentes quimioterapéuticos convencionales [255, 245].

Existen numerosos compuestos químicos que actúan como agentes inhibidores de HSP70, como análogos de ATP [256], flavonoides [257], imidazoles [258] o péptidos [259].

El 2-feniletinesulfonamida (PES) o pifithrin- μ (P- μ), es una sulfonamida (Figura 20) que inhibe la apoptosis mediada por p53, evitando la unión de esta proteína a Bcl-xL y Bcl-2 en la mitocondria [260]. Se ha visto que P- μ reduce la apoptosis inducida por radiación γ , ejerciendo una acción protectora en el síndrome hematopoyético letal [261]. P- μ también interactúa selectivamente con HSP70, donde se une a SBD, impidiendo la asociación entre HSP70 y muchas de sus co-chaperonas y proteínas sustrato [262, 263]. La terapia combinada de P- μ con metotrexato, fármaco contra el cáncer que bloquea la síntesis de purinas y pirimidinas, parece aumentar de forma sinérgica los efectos citotóxicos en las células de cáncer cervical [264].

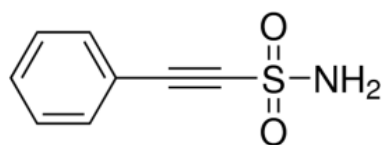


Figura 20. Estructura química de pifithrin- μ .

HSP90

HSP90 responde a las señales extracelulares, principalmente aquellas relacionadas con el desarrollo y renovación [265]. Fue descrita como "capacitadora de la evolución", ya que permite la acumulación de proteínas mutantes con la consiguiente aparición de nuevos fenotipos [266]. El papel fundamental de HSP90 en el desarrollo tumoral queda demostrado por el alto grado de angiogénesis alcanzado durante su sobreexpresión por el contrario, ésta cesa cuando se produce una inhibición de la proteína [267].

HSP90 regula y estabiliza muchos factores de transcripción y kinasas implicados en la apoptosis como p53, JNK, Her2, HIF1 α , Raf-1 o Akt [268]. Cuando Akt se activa puede fosforilar a Bad y a la caspasa-9, desencadenando la señal apoptótica [269]. Por otra parte, Akt también puede fosforilar a la kinasa I κ B, resultando en la activación de NF- κ B e induciendo supervivencia celular [270]. Otro ejemplo de regulación es el oncogen HER2 en el cáncer de mama [271]. El factor tumorigénico herregulina- β 1 se une a la superficie de las células de cáncer de mama, elevando la expresión de HER2 que al final resulta en la activación de HSF1 y la sobreexpresión de HSP, conduciendo a

la supervivencia celular [272]. HER2 se expresa en grandes cantidades en cáncer de pulmón [273], leucemias [274], próstata [275] y páncreas [276].

HSP90, al igual que HSP70, puede asociarse con Apaf-1 para inhibir la formación de apoptosoma y la activación de procaspasa-9 [277].

También desempeña un papel importante en la propagación de la apoptosis a partir de la membrana plasmática [278].

❖ *Inhibidores de HSP90*

La inhibición de HSP90 conduce a la degradación de muchas proteínas implicadas en el desarrollo tumoral, por lo que algunos de sus inhibidores están siendo probados en terapias anticáncer [279]. Entre ellos, se incluyen productos naturales como el radicicol y la geldanamicina, así como los derivados semisintéticos de ésta última, el 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) o tanespimicina y el 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG) o alvespimicina (Figura 21). Independientemente de su naturaleza, todos ellos actúan uniéndose al extremo N-terminal de HSP90, impidiendo la unión del ATP y dando lugar a la acumulación de proteínas mal plegadas y/o desnaturalizadas que serán degradadas posteriormente [280].

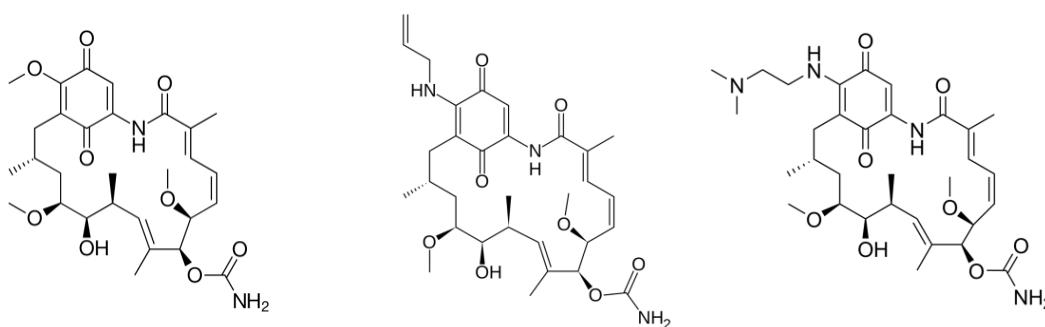


Figura 21. Estructura química de geldanamicina, tanespimicina y alvespimicina respectivamente.

El radicicol es un antibiótico que induce diferenciación de las células HL-60 en macrófagos [281], suprime la transformación de células NIH 3T3 por oncogenes como *src*, *ras* y *mos* [282] y suprime la expresión de ciclooxigenasa-2 inducible por mitógenos [283]. Como modulador de diferenciación celular tiene actividad anti-

angiogénica *in vivo*, inhibiendo la proliferación y la producción de activador de plasminógeno por las células endoteliales vasculares [284].

La geldanamicina es un antibiótico de la familia de las ansamicinas que se aisló originalmente como un compuesto natural con actividad antifúngica. Se une específicamente a ABD, ocupando el sitio de unión del ATP de HSP90 e inhibiendo la actividad ATPasa [285]. Esta unión impide los cambios conformacionales necesarios para el correcto funcionamiento como chaperona, desregulando las funciones de plegamiento y degradación de proteínas [286]. La formación de complejos Hsp90 - proteína sin plegar, y su acumulación, activa el sistema ubiquitina/proteosoma para su degradación [287]. Entre las proteínas cliente de HSP90 que se ven afectadas se incluyen una amplia variedad de proteínas de transducción de señales que participan en la regulación del ciclo celular, el crecimiento, la supervivencia, la apoptosis y la oncogénesis, como las proteínas quinasas y los receptores de hormonas esteroideas, reduciéndose considerablemente la señalización intracelular y provocando la muerte de la célula tumoral [288, 289].

La geldanamicina impide la interacción entre HSP90 y HSF1. HSP90 es el mayor represor de HSF1 y cuando no forma complejo con él permanece libre, pudiendo activar la síntesis de otras HSP [290]. También induce la degradación selectiva de proteínas mutadas involucradas en el desarrollo de tumores como v-Src, Bcr-Abl y p53 [291].

A pesar de todas las ventajas que presenta la geldanamicina su uso como fármaco se ve limitado al presentar una elevada hepatotoxicidad [292]. El desarrollo de análogos como tanespimicina o alvespimicina, que poseen diferentes sustituyentes en la posición 17, puede ser la solución al problema que presenta la geldanamicina, ya que presentan las mismas características con la ventaja de tener menor toxicidad [293].

17-AAG o tanespimicina, se presenta como un fármaco antitumoral [294]. Se ha comprobado que 17-AAG puede detener el ciclo celular e inducir apoptosis mediante la activación caspasas en linfoma [295] glioblastoma [296] y en células miogénicas [297]. También se ha mostrado efectivo en terapias combinadas con quimioterapéuticos, como doxorubicina frente a cáncer de mama HER+ [298], cisplatino frente al carcinoma de

células escamosas esofágicas [299] o tipifarnib frente a leucemia monocitaria aguda [300].

17-DMAG o alvespimicina se ha mostrado efectivo en los modelos preclínicos, teniendo efectos terapéuticos en pacientes con tumores sólidos, tumores sólidos avanzados o leucemia mieloide aguda [301]. Al igual que los otros inhibidores de HSP90, 17-DMAG tiene acción antitumoral al inducir diferenciación y apoptosis en la leucemia linfocítica aguda [302] y cáncer de mama [303]. También se ha mostrado efectivo en el cáncer de páncreas al combinarlo con los quimioterapéuticos gemcitabina y 5-fluoruracilo [304]. El 17-DMAG puede suprimir también el proceso inflamatorio al interferir en la señalización a través de la vía NF- κ B [305].

HSP60 / HSP10

A pesar de que todas las actuaciones de los miembros de la familia HSP anteriormente vistos están destinadas a la atenuación/inhibición de la apoptosis, algunos miembros como HSP60 y HSP10, pueden ejercer una regulación tanto positiva como negativa de la vía intrínseca [306].

HSP10 forma un complejo en con HSP60 para regular la unión del sustrato y la actividad ATPasa de ésta última. La mayoría de ellas (60–80%) se localizan en la mitocondria, donde participan en el plegamiento de las proteínas mitocondriales [307].

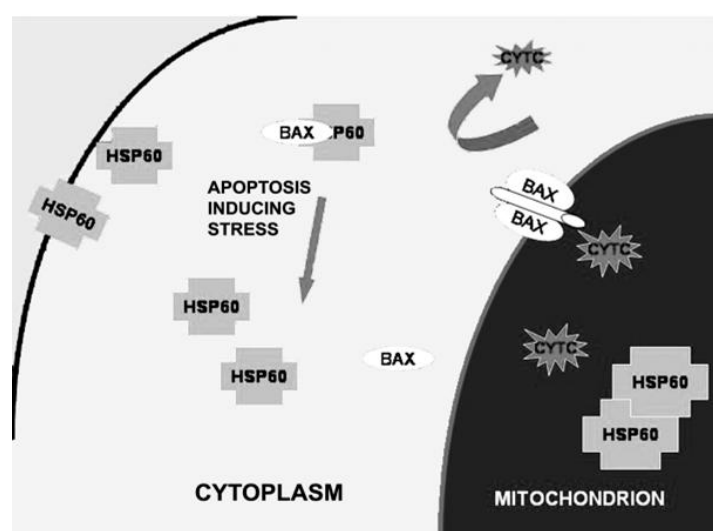


Figura 22: Interacción entre HSP60 y Bax

Fuente: Gupta et al. [308] *Journal of cellular and molecular medicine* (2005).

El papel de HSP60/HSP10 en la apoptosis no está claro del todo. Por una parte, puede desempeñar una acción pro-apoptótica al ejercer su función como chaperona, promoviendo la activación de caspasa-3 al formar un complejo multiproteico con ella [309, 310].

Por contra, la sobreexpresión combinada de HSP60 y HSP10 ejerce una acción citoprotectora que se asocia con una disminución en la liberación de citocromo *c*, la actividad caspasa y la fragmentación del ADN [311]. Parece ser que HSP60 actuaría de manera similar a HSP70, es decir, reclutando y manteniendo a BAX en el citosol en una conformación inactiva, regulando así su función (Figura 22). Además, la sobreexpresión de HSP60 y HSP10 conduce a un aumento en los mecanismos antiapoptóticos postranscripcionales vía Bcl-2 y Bcl-xL [308].

I. 3.6 AGENTES QUIMIOTERAPEÚTICOS

Un agente quimioterapéutico o quimioterápico, es un compuesto químico utilizado para tratar el cáncer, asignando el nombre de quimioterapia al tratamiento. Las terapias habituales contemplan el uso de agentes citotóxicos o una combinación de ellos con el fin de mejorar la eficacia, aunque esto no siempre implica obtener los resultados esperados pudiendo presentarse reacciones adversas.

Sería deseable conseguir una quimioterapia inteligente mediante el uso de fármacos que tengan como diana exclusiva las células tumorales, sin que afecte a las células sanas. Este método mejoraría la eficacia del tratamiento, la tolerancia y los resultados [312].

5-FLUOROURACILO

El 5-fluorouracilo (5-FU) se incluye dentro de los fármacos antimetabolitos antineoplásicos que inhibe o compite con un metabolito específico en el tratamiento del cáncer. Heidelberger y colaboradores fueron los primeros en estudiar la actividad biológica del 5-FU en tumores sólidos a finales de la década de los cincuenta, siendo uno de los primeros fármacos utilizados en oncología debido a sus propiedades citostáticas [313].

El 5-FU es un análogo del uracilo que posee un átomo de flúor en posición 5 (Figura 23). El 5-FU puede convertirse en 5-fluoroxiuridina monofosfato (F-UMP) a través de la enzima timidina quinasa, que puede reemplazar el uracilo e incorporarse al ARN, inhibiendo su procesamiento y por tanto el crecimiento celular [314]. Otro metabolito, el 5-5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-O-monofosfato (F-dUMP), inhibe la timidilato sintasa y provoca el agotamiento del trifosfato de timidina (TTP), nucleótido esencial para la síntesis de ADN [315]. Otros metabolitos del 5-FU pueden incorporarse tanto al ARN como al ADN, interfiriendo en las funciones de ambos [316].

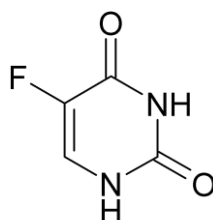


Figura 23. Estructura química de 5-FU.

El uso de 5-FU, ya sea en monoterapia o en terapias combinadas, altera la correcta síntesis de proteínas, en particular proteínas estructurales del citoesqueleto y HSP. La combinación de 5-FU y doxorubicina con inhibidores de HSP90 potencia los efectos terapéuticos en el cáncer de páncreas [317]. También se ha visto que el perfil de expresión de HSP27 está estrechamente relacionado con la terapia combinada de 5-FU y cisplatino en el adenocarcinoma esofágico [318].

CITARABINA

También conocida como arabinósido de citosina (AraC), es un antimetabolito antineoplásico que inhibe específicamente la fase S del ciclo celular.

La citarabina fue sintetizada por Walwick, Roberts y Dekker en 1959, basándose en el descubrimiento de Bergman y Feeney de los nucleósidos esponouridina y espongotimidina, procedentes de la esponja *Cryptotethya cripta*. No fue hasta 1968 cuando Ellison et al. [319] introdujo la citarabina en clínica para usarla como tratamiento contra la leucemia.

La citarabina es un análogo de la citidina, cuyo azúcar es arabinosa en lugar de ribosa (Figura 24), siendo el primer fármaco utilizado contra el cáncer que modifica el azúcar de los nucleósidos y no la base [320].

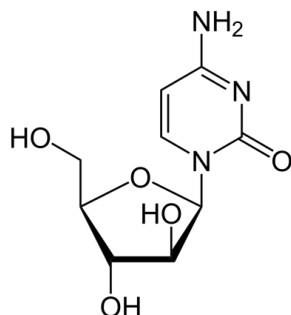


Figura 24. Estructura química de citarabina.

Dentro de la célula, la citarabina se transforma en citarabina-5-trifosfato (ara-CTP) y compite con citidina por su incorporación al ADN. Debido a que la arabinosa dificulta estéricamente la rotación de la molécula dentro del ADN, la síntesis del mismo resulta inhibida durante la fase S del ciclo celular. Otro modo de actuación de la citarabina es inhibiendo enzimas como las polimerasas, tanto de ADN como de ARN, o las nucleótido reductasas que resultan indispensables para la síntesis de ADN [321].

Se utiliza para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda [322], leucemia mieloide crónica [323], la leucemia meníngea [324], la eritroleucemia [325] y los linfomas no hodgkinianos [326]. No siendo muy útil en tumores sólidos [327]. También posee acción antiviral y puede utilizarse para el tratamiento de la infección por herpesvirus generalizada sin embargo, al no ser selectiva puede causar supresión de la médula ósea y otros efectos secundarios graves [328].

ETOPÓSIDO

Etopósido o VP-16, es una podofilina semisintética que contiene un residuo de D-glucosa (Figura 25). Deriva de la podofilotoxina procedente de la mandrágora silvestre, *Podophyllum peltatum*. Se sintetizó por primera vez en 1966 [329].

El etopósido actúa inhibiendo la enzima topoisomerasa II. Una de las funciones de esta enzima es cambiar el grado de superenrollamiento del ADN mediante el corte de ambas hebras. Cuando el etopósido se une a la topoisomerasa II y al ADN se forma un

complejo ternario estable que impide que los fragmentos de ADN vuelvan a unirse [330]. Las células tumorales dependen de esta enzima en mayor medida que las células no tumorales, ya que se dividen más rápidamente, causando daños en el ADN que promueven la apoptosis de la célula tumoral [331].

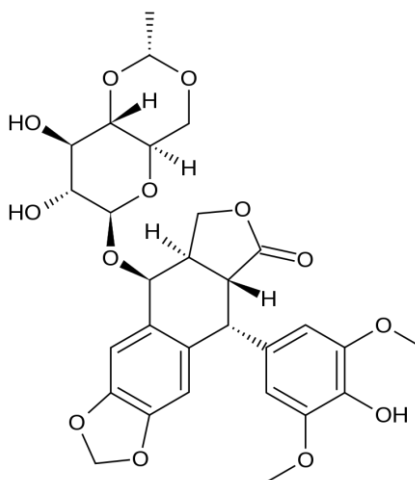


Figura 25. Estructura química de etopósido.

Se utiliza para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda [332], leucemia linfocítica aguda [333], cáncer de pulmón [334], cáncer de ovario [335] y cáncer testicular [336].

I. 4 MELATONINA

La melatonina o *N*-acetyl-5-metoxitriptamina es una hormona que deriva del aminoácido esencial triptófano y que está presente en casi todos los seres vivos, desde algas hasta humanos [337]. Fue descubierta en la década de los 50's por Lerner et al. [338], que la aislaron a partir de pinealocitos bovinos.

La melatonina es una indolamina de pequeño tamaño (~232.28 kDa) y de naturaleza lipófila (Figura 26). Es esencialmente secretada por la glándula pineal y cuya concentración muestra un patrón de síntesis circadiano que se altera en caso de realizar una pinealotomía [339]. Aunque inicialmente su síntesis se atribuía exclusivamente a la glándula pineal, su secreción se realiza en tejidos como retina [340], células enterocromafines del intestino [341], plaquetas sanguíneas [342], células mononucleares

de sangre periférica [343], células de medula ósea [344], piel [345] o tejido ovárico [346].

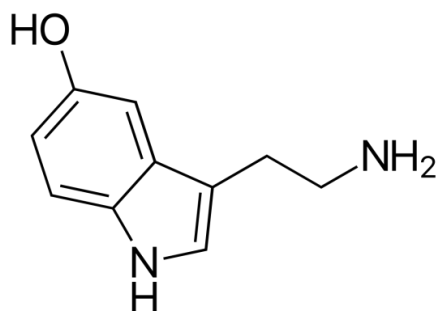


Figura 26. Estructura química de la melatonina.

La ruta de biosíntesis de la melatonina se inicia con el aminoácido L-triptófano procedente de la dieta, que se absorbe y distribuye por el torrente sanguíneo. En la glándula pineal, el L-triptófano sufre una serie de transformaciones que dan lugar a la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT). La serotonina se acumula y aumenta su concentración en la pineal para dar finalmente melatonina [347].

La secreción de melatonina al medio extracelular se asume que, dada su naturaleza lipófila, ocurre mediante difusión simple a través de la membrana de los pinealocitos, pudiendo atravesar incluso la barrera hematoencefálica [348]. Un proceso similar de secreción se podría atribuir al resto de tejidos productores de melatonina, en estos casos la acción que ejerce la melatonina queda limitada al entorno, pudiendo ser autocrina, intracrina y paracrina [349, 350]. En sangre la melatonina se transporta unida a la albúmina [351].

Además de su producción endógena, el consumo de alimentos ricos en su precursor triptófano induce un aumento de los niveles de melatonina en plasma provocando la estimulación de las funciones inmunológicas innatas, la viabilidad y capacidad antioxidante en heterófilos [352, 353] llegando además a mejorar el descanso en tórtola collariza [354].

I.4. 1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MELATONINA

Acciones dependientes de la unión a receptores

Algunos de los efectos de la melatonina sobre la célula suceden por la unión de la melatonina a los receptores de alta afinidad acoplados a proteínas G. Puesto que estos receptores están localizados en la membrana plasmática, los efectos de regulación sobre la célula acontecen mediante segundos mensajeros intracelulares como $[Ca^{2+}]_i$, GMPc, diacilglicerol y proteína kinasa C o ácido araquidónico [355, 356].

El receptor de membrana acoplado a proteína G MT1 fue clonado por primera vez por Ebisawa y colaboradores [357], posteriormente se identificaron los receptores MT2 y Mel 1c. MT2 se expresa en diferentes tejidos que MT1, y Mel 1c no ha sido identificado en mamíferos [358]. La melatonina también puede unirse al receptor huérfano RZR α , el cual tiene 6 isoformas y pertenece a la superfamilia de receptores del ácido retinoico ROR α 1, ROR α 2, RZR α y RZR β [359]. Cuando la melatonina se une al receptor huérfano se reprime la expresión del gen de la lipoxigenasa (LOX), enzima implicada en la producción de ERO en el citosol [360]. En contraste con los receptores anteriores, existe un receptor de melatonina de baja afinidad identificado y nombrado por Dubocovich en 1995, conocido como MT3, antiguo ML2 [361]. Inicialmente se pensó que este receptor estaba acoplado a proteína G, sin embargo estudios posteriores lo identificaron como quinona reductasa II [362].

Los receptores se distribuyen por diversos tejidos del cuerpo humano como cerebro [363], intestino [364], ovarios [365] y vasos sanguíneos [366]. Los receptores neuronales del núcleo supraquiasmático y del hipotálamo participan en la regulación del ciclo circadiano [367], en tanto que los receptores ubicados en tejidos periféricos están involucrados en la regulación de la función cardiovascular y de la temperatura corporal [368].

Acciones independientes de la unión a receptores

Adicionalmente, la melatonina realiza funciones independientes de sus receptores, mediante su interacción directa con otras sustancias. Entre los compuestos

que pueden unirse a la indolamina están la calmodulina y la calreticulina, proteínas que modulan la actividad del Ca^{2+} [369]. La melatonina también actúa en la regulación de algunas proteínas quinasas y otras enzimas como la enzima óxido nítrico sintasa neuronal [370] o del citoesqueleto [371], aunque en la regulación del citoesqueleto se ven también implicados los receptores de membrana [372].

Otra de las funciones de vital importancia es la capacidad que tiene la melatonina de capturar radicales libre nocivos y eliminarlos [373]. Esta acción antioxidante la realiza a través de la cesión de electrones al compuesto oxidante, tan sólo es necesario la proximidad de ambos compuestos antes de que se produzca el daño a las moléculas vecinas. Moléculas tales como ADN nuclear, proteínas y lípidos son protegidas del estrés oxidativo gracias a la ubicuidad de esta indolamina. Se ha visto que es capaz de neutralizar radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión peroxinitrito (ONOO^-), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y ácido hipocloroso (HClO). Asimismo, ciertos metabolitos generados de la actuación de este indol como 3-hidroximelatonina cíclica, AFMK y AMK, tienen capacidad para interaccionar con los radicales libres, ya que conservan alta capacidad antioxidante y secuestradora [374].

Además de este efecto antioxidante directo, puede regular los niveles de $\cdot\text{NO}$ de forma indirecta a través de su producción. Dicha síntesis se ve afectada por la inhibición de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) debido a la interacción de la melatonina con el complejo calcio-calmodulina [375]. Uno de sus derivados, AMK, puede inhibir igualmente la actividad nNOS, lo que sugiere que los efectos de la melatonina sobre nNOS tienen lugar, al menos en parte, a través de sus metabolitos [375]. Paralelamente, la melatonina inhibe la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) [376]. La LOX es otra enzima prooxidante en cuya regulación participa la melatonina. Tanto a nivel farmacológico como fisiológico, la melatonina inhibe la acción de LOX disminuyendo la producción de especies reactivas [377].

Por otro lado, se ha demostrado que la melatonina, tanto a dosis fisiológicas (nM y pM) como farmacológicas (μM y mM), incrementa la expresión de genes y actividad de las enzimas que constituyen el sistema antioxidante de la célula tales como

superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutathion peroxidasa (GSH-Px), glutathion reductasa (GSH-Rd) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) [378]. Glutathion (GSH) es una molécula antioxidante que desempeña un papel fundamental en el control del estado redox de la célula. GSH se oxida para neutralizar un oxidante potencialmente tóxico generando disulfuro de glutathion (GSSG). La relación GSH/GSSG se utiliza para medir el estado redox de la célula, o en otras palabras, para medir el estrés oxidativo de la misma. Puesto que la melatonina estimula en la actividad GSH-Px y GSH-Rd, tiene gran influencia sobre el metabolismo de GSH en beneficio de su reciclaje cuando es oxidado a GSSG y manteniendo el equilibrio GSH/GSSG. No obstante, se sabe que también la melatonina promueve la síntesis *de novo* de glutathion mediante la estimulación de la enzima responsable de su síntesis [379]. De modo que mediante el incremento de la expresión y la actividad de dichas enzimas, la melatonina reduce el número de ERO protegiendo la célula frente al estrés oxidativo y sus consecuencias.

Evidencias experimentales de nuestro grupo de investigación indican que esta indolamina potencia la capacidad antioxidante de heterófilos de la tórtola collariza tras la administración tanto de melatonina como de triptófano, especialmente en individuos ancianos que en condiciones de normales muestran niveles muy bajos de melatonina circulante. Por lo tanto, la melatonina y su precursor podrían formar parte de tratamientos frente a enfermedades o procesos que conlleven un excesivo daño oxidativo [380].

I.4. 2 MELATONINA Y HSP

La melatonina estimula la síntesis de dos de las principales HSP con acción antiapoptótica, HSP27 y HSP90, en células de carcinoma pancreático humano (PANC-1) [381]. La melatonina disminuye la apoptosis inducida por estrés térmico a 43 °C durante 30 minutos en células HL-60, a través del receptor MT2 y de la activación de HSP27 [382].

La melatonina puede modular la expresión de HSP70 y HSP90 en hepatocitos expuestos a H₂O₂, lo que les permite ser tolerantes al estrés y aumentar su supervivencia al alterar las funciones de ERK, Akt, y NFκB en las vías de transducción de señales [383]. Asimismo, la melatonina aumentó la expresión de HSP90 a través del receptor

MT1 en células espermáticas sometidas a procesos de congelación/descongelación, aumentando así la viabilidad de espermatozoides descongelados [384].

I.4.3 MELATONINA Y APOPTOSIS

La melatonina tiene una naturaleza altamente lipofílica que le permite cruzar las membranas celulares fácilmente y alcanzar cualquier compartimento subcelular, incluyendo la mitocondria. Cabe destacar el hecho de que esta molécula tenga alta afinidad y se acumule en altas concentraciones en este compartimento celular [385].

Se han localizado dos sitios de unión en la mitocondria, uno de ellos de baja afinidad y asociado a la inhibición del PPTm, efecto que hace pensar que la melatonina previene la apoptosis. El otro sitio de unión presenta alta afinidad y se localiza en el complejo I, uno de los puntos principales de liberación de electrones [386]. Además, la melatonina modula el flujo de electrones en el complejo IV, salvaguardando el potencial de membrana e incrementando la producción de ATP, incluso puede interactuar con las bicapas lipídicas estabilizando la membrana mitocondrial interna, efecto que junto con las interacciones con los complejos I y IV podrían explicar, la mejora de la eficiencia de la cadena de transporte de electrones [387]. Todo ello hace que se produzcan un menor número de ERO, protegiendo a la célula de posibles daños oxidativos en lípidos, proteínas y ADN que podrían iniciar los procesos apoptóticos en la célula, tanto activando caspasas, como causando fragmentación de ADN mediante DNasas.

Por otro lado, la disfunción mitocondrial conduce a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, disminución de la producción de ATP e iniciación de procesos apoptóticos, incluida la apertura del PPTm que confiere a la membrana externa la permeabilidad necesaria para la salida de factores proapoptóticos. En este sentido, cuando la cardiolipina, anclada a la membrana interna mitocondrial, sufre peroxidación rompe la unión al citocromo *c*, el cual, en condiciones de permeabilidad de la membrana externa, puede liberarse al citosol induciendo la activación de caspasas y así iniciar la apoptosis intrínseca. Daños irreparables por estrés oxidativo en el ADN harían que el factor de transcripción p53 activase la transcripción de genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas como NOXA, PUMA o BAX [388].

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que la melatonina retrasa la apoptosis inducida por estrés reticular debido a incrementos en la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$). Se sabe que los incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ tiene una repercusión directa sobre la $[Ca^{2+}]$ mitocondrial, es posible que el papel protector desempeñado de la indolamina sea a nivel mitocondrial en neutrófilos y linfocitos humanos [389]. Adicionalmente, cuando leucocitos humanos tratados con movilizadores de calcio se preincubaron con melatonina, los eventos apoptóticos que acompañan el aumento de $[Ca^{2+}]_c$, como la activación de Bax, liberación de citocromo *c* y la consecuente activación de las caspasas -9 y -3, fueron revertidos, observándose una recuperación de la viabilidad celular con respecto a aquellos leucocitos que no fueron preincubados con melatonina [390].

Por otra parte, diferentes estudios experimentales ponen de manifiesto que la melatonina es capaz de aumentar la señalización de las rutas de supervivencia de la célula, como la expresión de sirtuina 1 y NF- κ B, además el factor antiapoptótico Bcl-xL o la acetilación de p53, hechos que se vieron aumentados tras el tratamiento con melatonina [391].

Durante el tratamiento contra el cáncer, la aplicación de la mayoría de agentes quimioterapéuticos o radiación terapéutica inducen un aumento de la producción de ERO, con el consecuente daño celular y tisular. Está ampliamente documentado que la melatonina puede proteger a las células sanas contra los efectos nocivos de estas terapias [392]. De manera que, la administración de quimioterapéuticos combinados con melatonina se considerara en ocasiones para atenuar los efectos secundarios de dicho tratamiento.

Efectos apoptóticos de la melatonina en células tumorales

Durante la primera parte del siglo XX Engel y Bergmann [393, 394], así como Hofstätter [395] realizaron estudios pioneros tanto experimentales como clínicos sobre la capacidad antineoplásica de la glándula pineal bovina. Posteriormente Lapin en los años setenta llevó a cabo importantes estudios experimentales. Fue ella quien organizó el primer *workshop* internacional que relacionaba la glándula pineal y el cáncer. Allí, gracias a los resultados procedentes de diferentes autores se pudo concluir que el papel

del indol melatonina era muy importante con respecto a la incidencia del desarrollo de tumores [396]. Una conclusión central de los estudios de Lapin fue que la pinealectomía estimula el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis lo que conduce a un descenso de supervivencia [397]. Tal hallazgo concordaba con las observaciones de otros investigadores, incluso con las de Bindoni [398] quien observó que la pinealectomía estimula la división celular de los tejidos normales. Sin embargo, los mecanismos por los que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral o induce apoptosis en células tumorales se desconoce aún. Evidencias experimentales recientes han mostrado que el papel que desempeña la melatonina es de suma relevancia, ya que se ha observado que los pacientes con cáncer presentan niveles reducidos de melatonina en sangre [399].

El crecimiento tumoral es considerado como el desbalance entre la proliferación y la muerte celular. De este modo, tanto la modulación del ciclo celular como la inducción de la apoptosis son dos factores a tener en cuenta en el control del crecimiento del tumor [400]. En contraste con la capacidad antiapoptótica en células no tumorales, la melatonina tiene un comportamiento muy diferente en células cancerosas, debido a que la melatonina induce apoptosis en una amplia variedad de células tumorales a través de diferentes mecanismos de señalización celular [401].

El tratamiento con melatonina de la línea celular leucémica HL-60 provoca un arresto del ciclo celular de G1 a S a favor del aumento de la fase hipodiploide. Un aumento de la proteína pro-apoptótica Bax y disminución de la anti-apoptótica Bcl-2 causa la permeabilización de la mitocondria, favoreciendo así el inicio de la apoptosis intrínseca. Los eventos apoptóticos acontecidos no parecen estar mediados por los receptores MT1/2 acoplados a proteína G [402].

La melatonina puede inhibir el crecimiento tumoral al promover la apoptosis vía proteínas MAPK en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP. El tratamiento con el indol activa a JNK y p38 kinasa, mientras que la kinasa regulada por señales extracelulares, ERK, no mostró variaciones frente al tratamiento [403]. Similares resultados se obtuvieron en hepatocarcinoma HepG2, donde la melatonina produjo un arresto del ciclo celular mediado por la activación de JNK 1, 2 y 3 y p38. El tratamiento

implica además, la activación de la expresión de p53 sensible a daño en el ADN, que a su vez activa a p21 inhibiendo a CDK y parando la progresión del ciclo celular [404].

La melatonina puede ejercer un efecto oncostático a través de los receptores MT1/2, comportándose como un Modulador Selectivo de Receptor de Estrógenos (SERM). En este caso se inhibe la expresión del gen que codifica para el receptor de estrógenos α (RE α), responsable de la proliferación de este tipo de tumores. Las propiedades antiestrogénicas de la indolamina le confieren a esta molécula efecto oncostático en aquellos tumores estrógeno-dependientes, tales como cáncer de mama, ovario o útero [405].

Otro mecanismo que intenta explicar la acción antiestrogénica de la melatonina tiene en cuenta que la melatonina se une a la calmodulina e inactiva el complejo calmodulina/Ca²⁺. La calmodulina actúa como modulador de la actividad transcripcional de RE α , pero no de RE β , de manera que la sensibilidad a la melatonina depende de la cantidad de RE β que se exprese [406, 400].

Del mismo modo que la mitocondria es considerada por la melatonina como diana de sus acciones de supervivencia, es también una diana para la melatonina a la hora de inducir la muerte en células tumorales. Diferentes grupos de investigación concluyen que la melatonina provoca en la mitocondria pérdida del potencial de membrana, generación de especies reactivas de oxígeno, permeabilización de membrana y salida de factores proapoptóticos mitocondriales. Estudios desarrollados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, demuestran que el indol provoca un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa regulado por la acción de sus receptores de membrana acoplados a proteína G [407]. Experimentos realizados en la línea celular linfoblástica RAMOS-1 indicaron que el tratamiento con melatonina induce activación de la vía apoptótica dependiente de mitocondria mediante la despolarización de membrana mitocondrial, liberación de citocromo *c* y disminución de Bcl-2 y posterior activación de caspasa-3 y fragmentación de ADN [408]. Estudios en la línea de pancreatoma AR42J indican que los efectos nocivos de la melatonina se deben a un aumento de la [Ca²⁺] tanto citosólico como mitocondrial, activando así la caspasa-3 de manera Ca²⁺-dependiente [409].

El papel prooxidante de la melatonina en células tumorales está abalado por varios estudios. En células de hepatocarcinoma HepG2 se ha visto que la melatonina tiene un comportamiento dual dosis-tiempo dependiente. Así, a tiempos cortos y bajas concentraciones ejerce una acción antioxidante y por contra, tratamientos largos con altas concentraciones actúa de manera prooxidante, favoreciendo la generación de ERO, depleción de GSH y descenso de viabilidad [410]. Se ha demostrado que esta indolamina tiene una actividad prooxidante y disminuye los niveles de GSH y, por tanto, aumenta las ERO en células leucémicas [411]. Sin embargo, en células leucémicas U-937, se ha observado que aunque existe depleción de GSH, no existe modificación de la actividad glutatión peroxidasa [412].

Ensayos realizados en células de glioma indican que la melatonina sensibiliza estas células a la apoptosis inducida por TRAIL, este efecto parece estar mediado por la activación de PKC y desactivación de Akt. Se conoce ampliamente que los receptores TRAIL activados por TNF α reclutan dominios FADD y estos a su vez activan caspasa-8, estos resultados podrían explicar la activación de la caspasa-8 en células de hepatocarcinoma HepG2, puesto que descartaron un aumento de la expresión de Fas-L [413].

Sin embargo, no todos los estudios realizados apoyan los efectos proapoptóticos de la melatonina en células tumorales. Existen algunos, que aunque minoritarios, discrepan de manera parcial o total en la capacidad del indol para inducir apoptosis en células tumorales o inhibición del crecimiento tumoral. El grupo de Ghibelli en diferentes ocasiones sostiene que la melatonina induce ERO en células tumorales tales como U-937, linfoma de Burkitt BL-41 y astrocitoma, pero en ningún caso presentando efectos tóxicos, sino por el contrario, aumentando la resistencia a la muerte celular [414]. De igual modo, Pirozhok asegura que la melatonina no juega un papel prominente en el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata [415], mientras que Cos afirma que la melatonina reduce la proliferación de células tumorales mamarias, pero no existe una clara inducción de apoptosis [416]. Así mismo, Chetsawang describió cómo la melatonina preserva las células de neuroblastoma de la línea SH-SY5Y de la muerte inducida por peróxido de hidrógeno [417].

I.4. 4 MELATONINA Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Diversos estudios han destacado el carácter pleitrópico de la melatonina como molécula reguladora de numerosos procesos fisiológicos mediante su implicación en diferentes mecanismos moleculares. Sin duda, una de las particularidades más interesantes de esta molécula es su carácter discriminatorio frente a células sanas y células tumorales, actuando como agente citoestático y citotóxico sobre estas últimas. Por sí misma, la melatonina disminuye la incidencia de tumores y limita su crecimiento *in vivo* al inhibir la proliferación de las células tumorales e interferir en el comportamiento metastásico [418, 419], tal como revelan estudios en líneas celulares de cáncer de mama [420] y modelos animales [421] sin apenas producir efectos adversos [422].

Los efectos inhibitorios de la melatonina se han descrito para numerosos tipos de cáncer, como el cáncer de mama [423], el cáncer gástrico [424], el carcinoma de ovario [425], el carcinoma ductal pancreático [426], leucemia [427] y el carcinoma pulmonar [428]. En la mayoría de ellos los resultados son positivos tanto en condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo* [418]. Los resultados surgidos en los últimos años también sugieren que la melatonina, ya sea sola o junto con la quimioterapia en pacientes con cáncer diagnosticados con tumores sólidos avanzados, además de mejorar los resultados de la regresión del cáncer y la esperanza de vida, ayuda a los pacientes a tolerar mejor la quimioterapia [429].

La terapia combinada de melatonina con agentes quimioterapéuticos refuerza la citotoxicidad y la apoptosis estimulada por estos agentes. Así, se ha visto que en estudios donde se aplicó la terapia combinada de melatonina y el agente quimioterapéutico etopósido (VP-16) no sólo inhibe el crecimiento de las células tumorales de hepatocarcinoma en comparación con la monoterapia, sino que además reduce la toxicidad provocada por el agente quimioterapéutico; pudiendo considerar la melatonina como potencial tratamiento adyuvante para la quimioterapia y la radioterapia [430, 431].

Otro ejemplo es el tratamiento con citarabina, donde su uso combinado con la melatonina en ratas redujo su toxicidad y minimizó el daño producido en médula ósea,

mejorando los recuentos de todos los tipos celulares en sangre periférica así como el porcentaje de proteínas totales séricas [432].

El efecto potenciador resultante de la combinación de la melatonina con agentes quimioterapéuticos ha sido estudiado por nuestro grupo de investigación. En concreto, ha observado que el tratamiento de 5-fluorouracilo, cisplatino, y doxorubicina junto con melatonina favorecen la citotoxicidad y la apoptosis inducida por los agentes quimioterapéuticos en la línea celular AR42J de tumor pancreático de rata [433]. Asimismo, el tratamiento de 5-fluorouracilo y cisplatino combinados con melatonina, lograron promover acciones citotóxicas y apoptóticas mediadas por la transducción de señales provocada por la estimulación del receptor MT3, en las líneas celulares HT-29 de adenocarcinoma de colon y HeLa de cáncer cervical [434]. Por otro lado, los hallazgos sobre el efecto quimiosensibilizante in vitro de la melatonina junto con cisplatino en las neoplasias malignas del tracto genital femenino parecen ser bastante consistentes, lo que sugiere que la indolamina podría aplicarse potencialmente como un agente coadyuvante para mejorar el efecto de la quimioterapia [435, 436]. En resumen, nuestros resultados indican que la melatonina utilizada in vitro potencia la toxicidad e incrementa la muerte de las células tumorales, pudiendo considerarse como un potente agente sinérgico que proporciona un tratamiento eficaz frente al cáncer cuando se combina con los agentes quimioterapéuticos clásicos.

La melatonina es una hormona con acción anticancerígena efectiva en la prevención y el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Aun así, hay que considerar que no todos los estudios realizados hasta la fecha apuntan a la melatonina como una molécula que mejore la esperanza de vida y reduzca los efectos adversos de la quimioterapia [437, 438]. Se ha visto que en pacientes con cáncer avanzado de pulmón o gastrointestinal la melatonina no mostró ningún efecto beneficioso, por lo que su valor como adyuvante sigue siendo dudoso [437]. Aunque muchos de los resultados preliminares y la seguridad de la melatonina hacen considerar a esta hormona como una posible terapia combinada en el tratamiento contra el cáncer, los datos de los que se disponen en la actualidad son limitados y los obtenidos en humanos prácticamente inexistentes, por lo que se requiere de investigaciones adicionales [439].

II. OBJETIVOS

A pesar de los estudios y los avances en el diseño de nuevas terapias, el desarrollo de quimioresistencia por parte de las células tumorales sigue siendo una materia pendiente. Las HSP dentro de la célula desempeñan un papel esencial en la protección conformacional y funcional de las proteínas celulares. Sin embargo, en células tumorales confieren una sobre-tolerancia a estrés, suponiendo un frente de resistencia a superar. Las terapias combinadas suponen una ventaja en el tratamiento del cáncer frente a las monoterapias, ya que combinan diversas estrategias moleculares para inducir apoptosis en la célula tumoral. Por ello, el OBJETIVO PRINCIPAL de esta Tesis Doctoral es estudiar las terapias combinadas antileucémicas basadas en las proteínas HSP como diana principal.

Para abordar este objetivo hemos dividido este trabajo en 3 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar la implicación de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 en la resistencia a la hipertermia de las células de leucemia monocitaria aguda U-937.
2. Investigar las posibles acciones de la hipertermia cuando se utiliza en tratamientos combinados con agentes antileucémicos cuyos mecanismos de acción estén basados en la inducción de estrés oxidativo y/o daño en el ADN.
3. Esclarecer el papel de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 en las terapias combinadas de melatonina y agentes quimioterapéuticos en células de leucemia monocitaria aguda U-937.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 LISTA DE REACTIVOS

III.1. 1 LÍNEA CELULAR, MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

- Línea celular de Leucemia Monocitaria Aguda U-937 (European Collection of Cell Cultures - ECACC - ; Salisbury, Reino Unido).
- Medio RPMI-1640 (Lonza Ibérica S.A.U.; Barcelona, España).
- Albumina de suero bovino (Lonza Ibérica S.A.U.; Barcelona, España).
- Estreptomicina/Penicilina (Lonza Ibérica S.A.U.; Barcelona, España).
- L-Glutamina (Lonza Ibérica S.A.U.; Barcelona, España).

III.1. 2 TRATAMIENTOS

- Geldanamicina o GA (Enzo; Barcelona, España).
- Tanespimicina o 17-AAG (Enzo; Barcelona, España).
- Pifithrin- μ o P- μ (Enzo; Barcelona, España).
- Peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Melatonina (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España)
- 5-fluorouracilo (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Citarabina (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Etopósido o VP-16 (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).

III.1. 3 ANTICUERPOS

- β -actina: anti-mouse, dilución 1:1000 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).
- HSP70: anti-mouse, dilución 1:250 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California).
- HSP90 α/β : anti-mouse, dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California).
- HSP27: anti-mouse, dilución 1:1000 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).
- HSF-1: anti-rabbit, dilución 1:1000 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).

- Caspasa-3: anti-rabbit, dilución 1:1000 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda)
- Caspasa-3 clivada: anti-rabbit, dilución 1:250 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).
- Caspasa-8: anti-mouse, dilución 1:250 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).
- Caspasa-9: anti-mouse, dilución 1:250 (Cell Signaling Technology; Leiden, Holanda).
- Anti-rabbit, dilución 1:1000 y 1:5000 (GE Healthcare, little Chalfont, UK).
- Anti-mouse, dilución 1:1000 y 1:5000 (GE Healthcare, little Chalfont, UK).

III.1. 4 OTROS REACTIVOS

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Azida sódica (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Azul Tripano o Trypan Blue (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Azul-bromofenol (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Chaps (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Cloruro potásico (KCl; Panreac, Castellar del Vallés, España).
- Cloruro sódico (NaCl; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España).
- Dimetilsulfóxido o DMSO, (Panreac; Barcelona, España).
- DL-ditiotreitol (DTT; Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Fosfato potásico monobásico (KH₂PO₄; Panreac, Castellar del Vallés (Barcelona), España).
- Fosfato sódico (Na₂HPO₄; Panreac, Castellar del Vallés, Barcelona, España).
- Glicerol (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Glicina (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- HEPES (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Hoechst 33342 (Life Technologies S.A.; Eugene, USA).

- MES (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Mini-PROTEAN precastgels (Bio-Rad, Barcelona, España).
- Nonidet-P40 (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España)
- Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisherScientific, Rockford, EEUU).
- Reactivo Bradford (Bio-Rad, Barcelona, España).
- Sacarosa (Sigma AldrichS.A., Madrid, España)
- Tampón de electroforesis - TGS (Bio-Rad, Barcelona, España).
- Tampón de transferencia - TG (Bio-Rad, Barcelona, España).
- Tris/HCl (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Tritón (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Trizma-base (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).
- Tween 20 (Sigma Aldrich S.A., Madrid, España).

III.2 CULTIVO DE CÉLULAS U-937

La línea de células de leucemia monocitaria aguda U-937 se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina y 100 U/mL de antibiótico estreptomomicina/penicilina a 37 °C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de O₂ (Memmert, ICO). El cultivo se hacía crecer en suspensión de manera exponencial en flask con tapón ventilado de 25 cm² con una concentración celular entre 0,1 x 10⁶ y 1 x 10⁶ células/mL, revisando que su tiempo de duplicación, característico de este tipo celular, fuera de 24 horas.

El pasaje celular se realizaba en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (CYTOSTAR Telstar; Terrassa, España). La concentración celular de trabajo se ajustó a 1 x 10⁶ células/mL, controlando su densidad mediante recuento en cámara de Neubauer. La mortalidad de las células se analizó mediante la exclusión de azul tripano. Sólo se consideró una mortalidad inferior al 5% como apta para la realización de los experimentos.

III.3 METODOLOGÍA

III.3.1 INDUCCIÓN DE ESTRÉS TÉRMICO

Los cultivos celulares, control o pretratados, se sometían a 1 hora de estrés térmico a 42 °C en flask de poliestireno, y sumergiéndolos en un baño de agua termostatzado hasta cubrir el nivel del cultivo (Figura 27). Al finalizar, se extraían las alícuotas necesarias de cada tipo de muestra durante un periodo post-estrés de recuperación de 1, 2, 4 y 6 horas a 37 °C (Figura 28).



Figura 27. Inducción de estrés térmico a los cultivos celulares

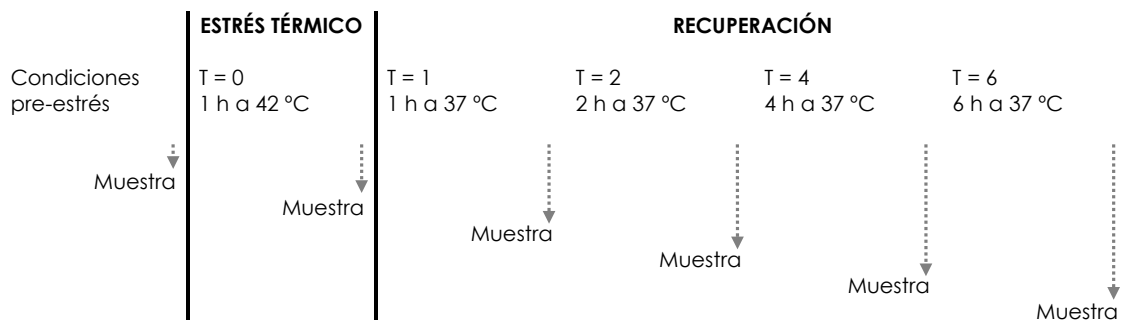


Figura 28. Esquema experimental de inducción de estrés térmico

III.3. 2 INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Para la inducción de estrés oxidativo se utilizó peróxido de hidrógeno. Se partió de un stock inicial comercial de peróxido de hidrógeno con una concentración 8 M para obtener las concentraciones de 1 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM y 1 mM y se determinó la viabilidad celular tras 1, 2, 4 y 24 horas de incubación con cada una de las concentraciones ensayadas. Una vez estudiado el efecto dosis/tiempo dependiente se eligió la concentración de 500 μM con un periodo de incubación de 6 horas.

Los cultivos celulares se sometieron a 6 horas de estrés oxidativo con 500 μM de H_2O_2 en flask de poliestireno en un incubador a 37 °C y 5% de CO_2 . A continuación, se estudió el efecto de dicho estrés sobre la funcionalidad de las HSP durante un periodo post-estrés de recuperación de 1, 2, 4 y 24 horas (Figura 29).

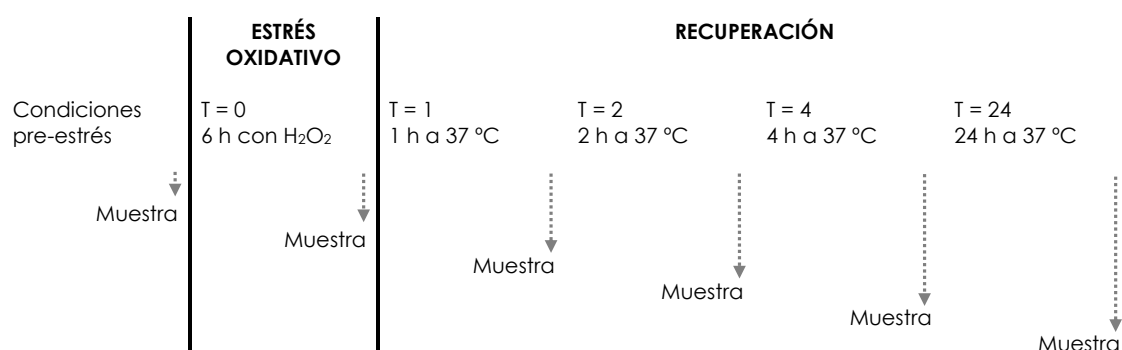


Figura 29. Esquema experimental de inducción de estrés oxidativo

III.3. 3 TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE HSP

Los cultivos celulares se incubaron durante 24 horas a concentraciones de 100 y 500 nM con geldanamicina (GA) o tanespimicina (17-AAG), inhibidores de HSP90. Pifithrin- μ (P- μ), inhibidor de HSP70, se incubó durante 24 horas a concentraciones de 1 y 5 μM . Finalmente, se establecieron las siguientes condiciones experimentales: concentración de 500 nM y 24 horas de incubación para geldanamicina y tanespimicina; y, concentración de 1 μM y 24 horas de incubación para pifithrin- μ .

III.3. 4 TRATAMIENTO CON MELATONINA

Los cultivos celulares se incubaron con melatonina (Mel) durante 24 horas a una concentración de 1 mM, en presencia o ausencia de los inhibidores de HSP70 y HSP90 y/o los agentes quimioterapéuticos citarabina, etopósido y 5-fluoruracilo.

III.3. 5 TRATAMIENTO CON AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Los cultivos celulares se preincubaron con los agentes quimioterapéuticos citarabina (50 μ M), etopósido (50 μ M) y 5-fluorouracilo (1 mM) durante 6 horas a 37 °C en presencia o ausencia de los inhibidores de HSP70 y HSP90 y/o melatonina a las dosis y tiempos anteriormente indicados.

III.3. 6 RECUENTO CELULAR

La proliferación celular se estudió mediante contaje celular con cámara de Neubauer en microscopio invertido, el recuento se realizó al objetivo de 20x. Adicionalmente se comprobó la supervivencia celular mediante tinción con azul tripano, una mortalidad inferior al 5% se consideraba como apta para la realización de los experimentos.

III.3. 7 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determina mediante la técnica del bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT), basada en la capacidad de las células viables en reducir el grupo tetrazolio del MTT por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a un compuesto de color azul (formazán). La reducción enzimática de la sal de tetrazolio ocurre sólo en células activas metabólicamente, pero no en células muertas, siendo por tanto un indicador de la funcionalidad mitocondrial. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células se distribuyeron en eppendorfs 250 μ L de la suspensión celular de cada tipo de muestra, siendo la concentración del control de 10^6 células/mL aproximadamente. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de una solución que contenía 50 μ L del sustrato MTT ([stock] = 5 mg/mL) y 250 μ L de medio RPMI-1640 sin suplementar, a continuación, se incubaron durante 1 hora a 37° C y oscuridad. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 150 g durante 5 minutos.

Posteriormente se retiró el sobrenadante mediante aspiración, y el pellet se resuspendió en 300 μL de DMSO para disolver los cristales de formazán. Por último, se transfirieron 150 μL de cada tratamiento a una placa de 96 pocillos de poliestireno (Greiner Bio-One) para su lectura en el lector de placa (Figura 30). La densidad óptica se cuantificó en un lector de placas automático (NanoQuant Infinite M200; Tecan, Austria), a 530 nm, usando 630 nm como longitud de onda de referencia. Los datos obtenidos se presentan como incrementos normalizados con respecto al control (experimento/control).



Figura 30. Lector de placas y placa conteniendo las muestras para el estudio de viabilidad celular

III.3. 8 ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA APOPTÓTICA

La morfología apoptótica se estudió mediante la sonda fluorescente Hoechst 33342. Por su comportamiento lipófilo, este compuesto puede atravesar fácilmente las membranas y unirse al ADN, permitiendo visualizar núcleos y mitocondrias. El Hoechst 33342 se excita por luz ultravioleta con una longitud de onda de 350 nm y emite fluorescencia azul/cíjan con un máximo de emisión de 461 nm. Cuando el fluorógeno se une a la cromatina nuclear permite ver si el núcleo tiene morfología apoptótica, en cuyo caso se aprecia un núcleo multilobular característico al microscopio de fluorescencia.

Para su determinación, se depositaron 50 μL de suspensión celular de cada tipo de muestra en una placa de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One). A

continuación, se añadió 1 μL /pocillo de Hoechst 33342 a la suspensión celular y se dejó incubar durante 20 - 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, posteriormente se realizó el conteo celular en microscopio invertido de epifluorescencia (Eclipse TS 100, Nikon; Barcelona, España) con el filtro azul/cian (Figura 31). Los valores se expresan como porcentajes de células que contienen núcleos con morfología apoptótica de 300 células mediante el conteo en diferentes campos seleccionados al azar.

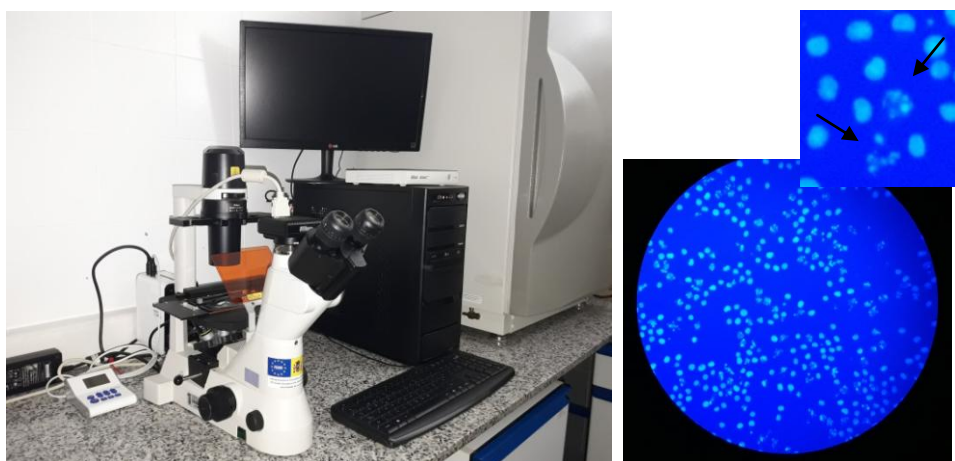


Figura 31. Microscopio invertido y campo con muestra para el estudio de la morfología apoptótica.

III.3. 9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales con el reactivo de Bradford se basa en la unión de las mismas a un colorante, el Azul de Coomassie. Las proteínas van a unirse al colorante en medio ácido, generando un complejo proteína-colorante y produciéndose un viraje de color de marrón a azul, siendo proporcional la intensidad de color a la concentración de proteínas.

La cantidad de proteína total se utilizó como referencia en la determinación de la actividad caspasa y la cuantificación de proteínas específicas mediante western blotting. Se depositaron 5 μL /pocillo de cada muestra en placa de 96 pocillos (GreinerBio-One) sobre los cuales se adicionaron 100 μL del reactivo Bradford. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un lector de placas (Infinite M200; Tecan, Austria) a una longitud de onda de 595 nm. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en ellas, estimándose mediante una

curva de referencia con concentraciones 50 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL de un estándar de proteína de albúmina de suero bovino (BSA).

III.3. 10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CASPASA

Las caspasas tienen la capacidad de hidrolizar la unión de un fluoróforo de un sustrato, pudiendo cuantificarse su actividad enzimática de manera directamente proporcional a la fluorescencia que emite dicho fluoróforo cuando es liberado. Las células se incuban con el sustrato específico para cada tipo de caspasa, que habitualmente se conjuga con un radical fluorescente del tipo AMC (7-amino-4-metilcumarina) para las caspasas 3 y 9. Las que las caspasas activadas pueden procesar el enlace peptídico en el sustrato específico, liberando el radical fluorescente. La fluorescencia es un indicador directamente proporcional a la actividad caspasa en el ensayo, pudiéndose monitorizar mediante un lector de placas (NanoQuant Infinite M200; Tecan, Austria) a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión a 460 nm.

Una suspensión celular de 2×10^6 células de cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 700 g. Los pellets se resuspendieron en 100 µL de tampón fosfato salino (PBS) para obtener una concentración aproximada de 2×10^6 células/100 µL. 15 µL de suspensión reaccionaron con 50 µL del tampón de ensayo específico de caspasa (Tabla 4) en placa de 96 pocillos especiales para fluorescencia (Greiner Bio-One). La fluorescencia emitida se monitorizó cada 3 minutos durante 40 minutos. La pendiente de la fase lineal de la emisión de fluorescencia se consideró como valor relativo de cinética enzimática de las caspasas. La actividad caspasa se estimó como el incremento de la pendiente de la curva de tiempo de cada tratamiento con respecto a la concentración de proteínas.

Tabla 4. Composición de los tampones de las caspasas

Buffer para caspasa 3 y 8	Buffer para caspasa 9
HEPES 0.1 M	MES 0.1 M
<i>Ajustar a pH 7.5</i>	<i>Ajustar a pH 6.5</i>
Sacarosa 10%	PEG 10%
Chaps 0.1%	Chaps 0.1%

III.3. 11 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

La identificación y cuantificación de proteínas mediante western blotting, se basa en una electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida, que separa las proteínas según la carga o/y el peso molecular de las mismas, seguida de una transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Finalmente, la proteína de interés se detecta mediante la unión antígeno-anticuerpo, pudiendo cuantificarla por densitometría.

Preparación de las muestras: una suspensión celular de 2×10^6 células de cada tipo de muestra se centrifugó durante 5 minutos a 700 g, los pellets se resuspendieron en 60 μ L de tampón fosfato salino (PBS) (Tabla 5) para obtener una concentración aproximada de 2×10^6 células/60 μ L. Para obtener los lisados celulares de las muestras se utilizó un tampón de extracción, Laemmli's buffer 2x suplementado con ditioneitol (DTT) al 5%, posteriormente cada muestra se sometió a un pulso de sonicación para romper las células a 50 W/20 KHz durante 5 segundos (Vibra Cell, Sonics & Materials). Las proteínas se desnaturalizaron hasta su estructura primaria mediante calor seco en termobloque durante 10 minutos a 75 °C. Por último, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 g, quedando ya dispuestas para realizar la separación de las proteínas.

Tabla 5. Composición del tampón fosfato salino (PBS)

NaCl	0,1370 M
KCl	0,0027 M
Na ₂ HPO ₄	0,0122 M
KH ₂ PO ₄	0,0018 M
<i>Ajustar a pH 7.4</i>	

Cuantificación de las proteínas: la concentración de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante el método de Bradford, utilizando una curva con concentraciones conocidas de BSA como referencia (ver apartado 3.9 *Cuantificación de proteínas totales por Bradford*). De esta forma, se añadió la misma cantidad de proteínas de cada muestra.

Electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico): la separación de las proteínas se realizó atendiendo a su carga y a su peso molecular mediante electroforesis (EPS 301; GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia).

Para ello las muestras procesadas se cargaron en un gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN precast gels; BioRad, España) colocado en una cubeta de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra; BioRad, España) y cubierto por el tampón de electroforesis conteniendo SDS (Tabla 6). Posteriormente se somete a una corriente eléctrica inicial de 100 V hasta que las muestras salen de los pocillos, pasando a 150 V hasta que el frente de electroforesis recorre todo el gel.

Tabla 6. Composición del tampón de electroforesis

TGS 10x (Bio-Rad)	10%
Agua destilada	90%

Transferencia de proteínas: tras la electroforesis, se realizó una electrotransferencia semiseca de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, ya que es un soporte mucho más manejable para las siguientes etapas. El gel, la membrana y varias capas de papel de filtro se colocaron formando un sándwich y se dispusieron en la unidad de transferencia junto con el tampón de transferencia (Tabla 7) durante 90 minutos a 50 mA/cm² (TE 77 PWR; Amersham Bio-Sciences, Suecia).

Tabla 7. Composición del tampón de transferencia

TG 10x (Bio-Rad)	10%
Agua destilada	90%

Bloqueo de la membrana: antes de incubar la membrana con los anticuerpos primarios específicos, se llevó a cabo un bloqueo de la misma para evitar uniones inespecíficas. La membrana se mantuvo durante 1 hora en agitación suave con una solución al 5% de leche desnatada en polvo en tampón tris salino – Tween 20 (TBST) 1x (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Composición del tampón tris salino – Tween (TBST) 10x

Tris-base	0.2 M
NaCl	1,37 M
Tween 20	1 %
Ajustar a pH 7.6	

Tabla 9. Composición del tampón tris salino – Tween (TBST) 1x

TBST 10x	10 %
Agua destilada	90 %

Detección de la proteína de interés: el inmunoblotting se realizó con una solución conteniendo el anticuerpo primario específico de la proteína a cuantificar (Tabla 10). La membrana se incubó con esta solución durante toda la noche a 4 °C en agitación continua (*Rotamax 120*; Heidolph Instruments, Alemania). Después de 3 ó 4 lavados vigorosos de la membrana con TBST 1x en un agitador orbital, se realizó la incubación con la solución que contenía el anticuerpo secundario (Tabla 11) específico para la cadena pesada del anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está conjugado con una peroxidasa de rábano que permite su posterior detección. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente en agitación, se procedió a lavar la membrana para eliminar el anticuerpo secundario no unido.

Tabla 10. Solución para el anticuerpo primario

TBST 1X	5 mL
Leche en polvo	10 %
Azida sódica	0,025 %
Anticuerpo primario	Dilución 1:250 - 1:1000
<i>Mantener a 4 °C</i>	

Tabla 11. Solución para el anticuerpo secundario

TBST 1X	5 mL
Leche en polvo	2,5 %
Anticuerpo secundario	Dilución 1:5000 ó 1:1000

Análisis: cuando el anticuerpo secundario contacta con el sustrato de la peroxidasa se inicia una reacción quimioluminiscente (Figura 32). El revelado se realizó en una cámara oscura incubando durante 5 minutos con una solución ECL que contiene el sustrato de la peroxidasa que lleva unida el anticuerpo secundario. El resultado final se detectó como la impresión de la quimioluminiscencia en forma de manchas sobre papel fotográfico (Amersham HyperfilmTM ECL; GE Healthcare, Reino Unido). El

tamaño e intensidad de las manchas se analizó por densitometría mediante el programa informático Image J. Los resultados se expresan como diferencias en los porcentajes de densidad óptica entre las manchas de las diferentes muestras.

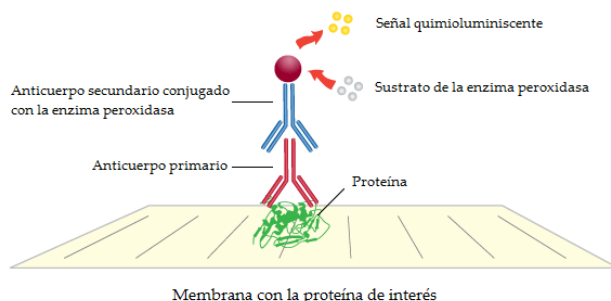


Figura 32. Esquema de la emisión de la señal quimioluminiscente

III.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron como la media \pm EEM (error estándar de la media). Para comparar entre los diferentes tratamientos, la significación estadística se calculó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Tukey para comparaciones múltiples. Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El software utilizado para el análisis estadístico y diseño de gráficas fue Graphpad Prism 6.01 para Windows.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1. PAPEL DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP70 EN LA RESISTENCIA A LA HIPERTERMIA DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MONOCITARIA AGUDA U-937.

Para abordar el primer objetivo, nos planteamos estudiar el efecto del estrés térmico (HS) sobre la viabilidad de las células leucémicas U-937. Para ello, las células se expusieron a 42 °C, durante 1 hora. A continuación, se sometieron a un periodo de recuperación a 37 °C, y posteriormente se midió su actividad metabólica durante 1, 2, 4 y 6 horas. Los valores muestran que el estrés térmico indujo una disminución gradual y dependiente del tiempo en la viabilidad celular. A partir de 1 hora a 37 °C tras el HS ya se apreció una disminución significativa de la viabilidad celular ($P < 0,05$). La viabilidad celular alcanzó un valor mínimo tras 4-6 horas de recuperación a 37 °C (Figura 33).

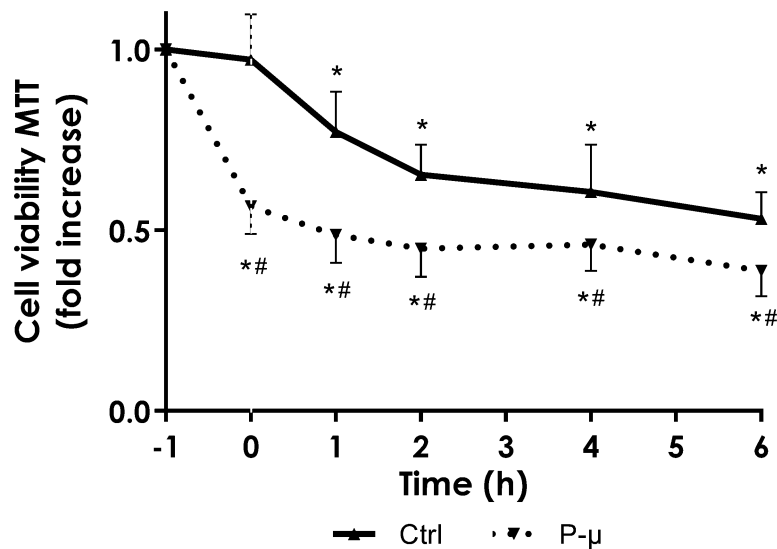


Figura 33. Efecto del estrés térmico (HS) sobre la viabilidad celular en células U-937. Las células se trataron previamente durante 24 horas con 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl), luego se indujo el HS durante 1 h a 42 °C (eje de abscisa de -1 h a 0 h). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT antes y después del HS en diferentes momentos (0-6 h). Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor de actividad en ausencia de HS (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con el control en ausencia de HS. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de control correspondientes en tiempo tras HS.

Para investigar la posible participación de HSP70 en la resistencia a la disminución de la viabilidad celular inducida por el HS, las células U-937 se preincubaron durante 24 horas con pifithrin- μ (2-feniletinesulfonamida, P- μ), un inhibidor de HSP70. La exposición a HS tras el pretratamiento con 1 μ M P- μ redujo de manera significativa ($P < 0,05$) la viabilidad celular con respecto a los valores de los mismos tiempos de las muestras sometidas a HS en ausencia de P- μ (Figura 33).

Para examinar si los efectos del HS en la viabilidad celular estaban relacionados con la muerte celular por apoptosis, analizamos la actividad de la caspasa-3, -8 y -9 en células U-937 sometidas a HS. Como se muestra en la Figura 34, el HS causó un aumento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) en la actividad enzimática de la caspasa-3, -8 y -9 (Figura 34A). Este aumento se produjo de manera tiempo-dependiente, alcanzando el valor máximo a las 4 horas del período de recuperación. Para confirmar los hallazgos previos sobre la actividad enzimática de las caspasas, se determinó mediante Western blot el precursor inactivo de la caspasa-3, la procaspasa-3, en células U-937 sometidas a HS. Así, cuando las células se sometieron a un estrés térmico, se observó también una activación de la caspasa-3 dependiente del tiempo ($P < 0,05$), como revela la disminución de la cantidad en la forma inactiva de la procaspasa-3 (Figura 34B). Acorde con los resultados presentados en la Figura 33, la incubación previa de las células con 1 μ M de P- μ durante 24 horas fue capaz de aumentar significativamente ($P < 0,05$) la actividad enzimática de las caspasas -3 y -8, pero no de la caspasa-9 tras 4 horas de recuperación después del HS en comparación con el control (Figura 34C). El análisis de la expresión de procaspasa-3 mediante Western blot corroboró una disminución de la misma ($P < 0,05$), cuando las células estaban pretratadas con 1 μ M P- μ , en comparación con el control (Figura 34D), lo que sugiere que la chaperona HSP70 dificulta, al menos en parte, la activación de la caspasa-3 inducida por HS en células de leucemia U-937 previniendo la progresión de la apoptosis.

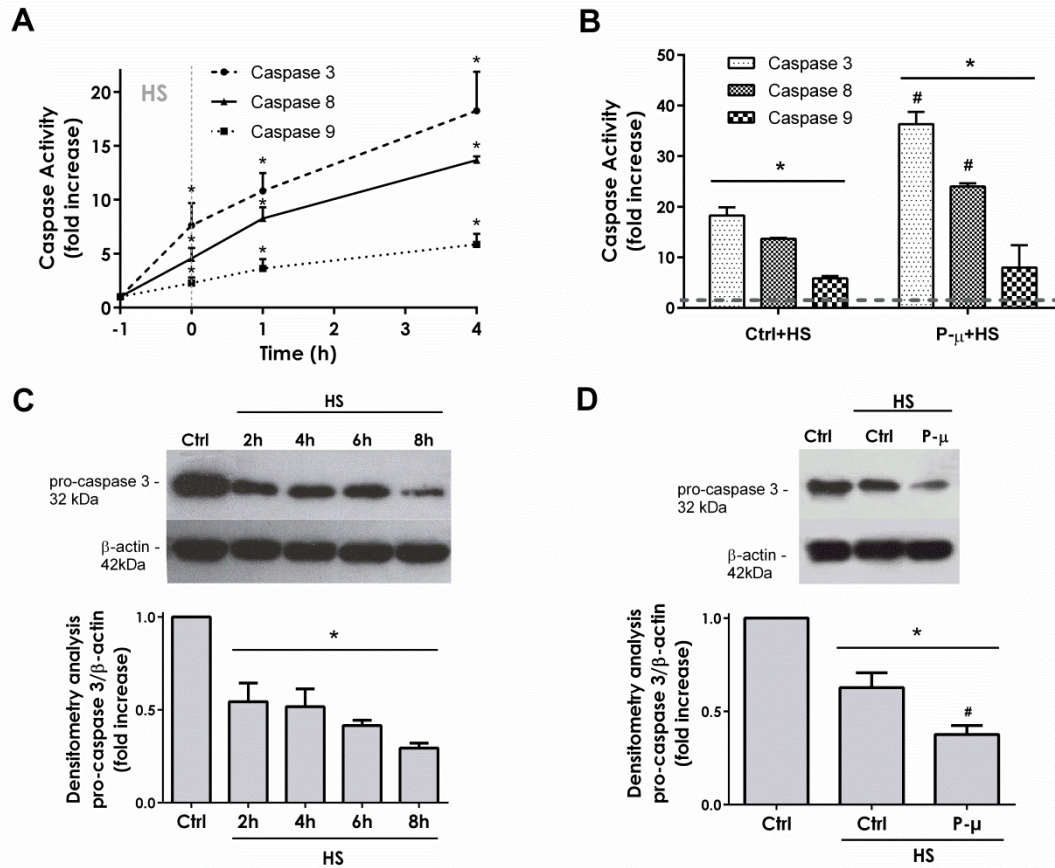


Figura 34. Efecto del estrés térmico (HS) sobre la actividad caspasa en células U-937. Las células se pretrataron durante 24 horas con 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl), luego se indujo el HS durante 1 h a 42 $^{\circ}$ C (eje de abscisa de -1 h a 0 h). La actividad enzimática de caspasa-3, -8 y -9 se estimó como se describe en Materiales y Métodos. (A) Valores de activación de caspasa-3, -8 y -9 con respecto al tiempo. (B) Actividad enzimática de caspasa-3, -8 y -9. (C) Contenido procaspasa-3 con respecto al tiempo tras HS. (D) Contenido de pro-caspasa-3 en células pretratadas durante 24 h con 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ); Las muestras se recolectaron a las 4 h de cese del HS. El Western blot se realizó con el anticuerpo específico anti-pro-caspasa-3 (8G10) y utilizando anti- β -actina (8H10D10) como referencia de carga de proteínas. El histograma muestra la cuantificación procaspasa-3 (32 kDa) con respecto a la β -actina (45 kDa). Los valores presentan las medias \pm SEM de 4-8 experimentos independientes, y expresan el número de veces sobre el valor de las muestras no estresadas (experimental/control). * P < 0,05 en comparación con los valores de control. # P < 0,05 en comparación con los valores de control en condiciones de estrés.

También se determinó el porcentaje de células que presentaba morfología nuclear apoptótica mediante microscopía de fluorescencia con tinción de la cromatina nuclear con Hoescht 33342. Como se muestra en la Figura 35, el porcentaje de células apoptóticas aumentó más de un 20% tras el HS en comparación con las células control. Además, cuando las células se preincubaron con 1 μ M P- μ durante 24 h, el porcentaje de células apoptóticas aumentó significativamente (P < 0,05) a $38,5 \pm 3,6\%$ (Figura 35).

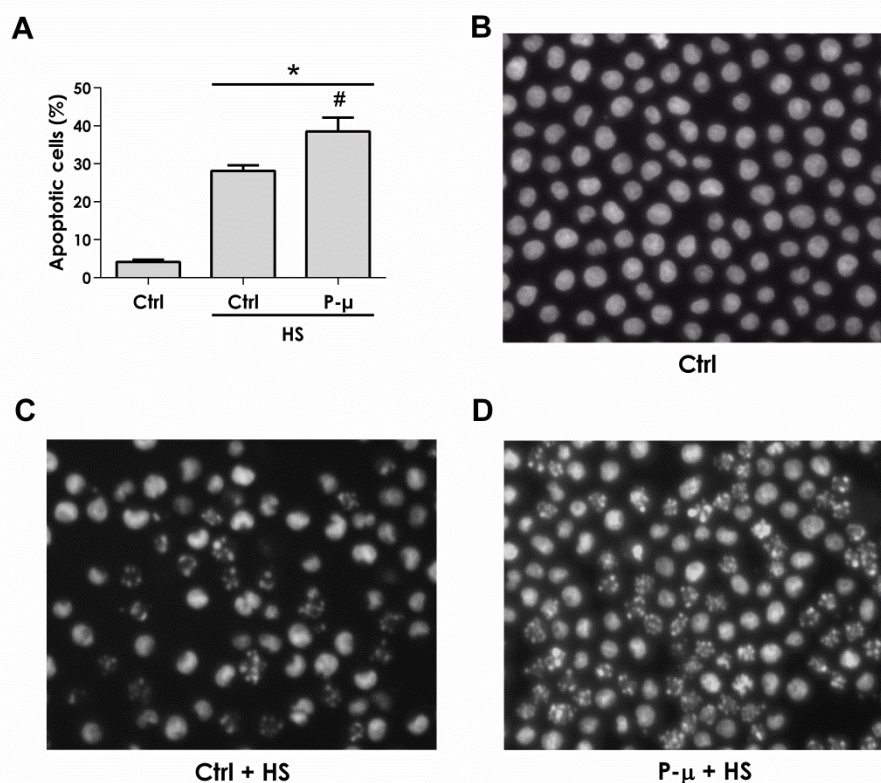


Figura 35. Efecto del estrés térmico (HS) en la apoptosis de células U-937. Las células se pretrataron 24 horas con 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control), luego se indujo el HS durante 1 h a 42 $^{\circ}$ C, las muestras se recolectaron tras 4 h de cese del HS. (A) El histograma muestra el porcentaje de células con morfología nuclear apoptótica. Los valores se presentan como las medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de control en condiciones de estrés. (B-D) Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, se visualizaron en un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse TS 100 y las imágenes se capturaron usando una cámara digital Nikon (DSQi1Mc). Se muestra un campo representativo de cada grupo experimental.

Para esclarecer los efectos del HS en la modulación de la expresión de HSP, cuantificamos los niveles de las proteínas HSP27, HSP70 y HSP90 en células U-937 sometidas a HS, entre 2 y 8 horas después de finalizar el estrés térmico. Como se muestra en la Figura 36, la cuantificación de los niveles celulares de HSP90 mediante Western blot manifiesta que el HS indujo una disminución tiempo-dependiente en la expresión de HSP90, alcanzando el valor mínimo tras 6 horas de recuperación del HS a 37 $^{\circ}$ C. Los resultados revelan la existencia de un nivel basal de HSP70 en células control debido a la expresión constitutiva de la misma con los que cuenta la célula. No obstante, el HS indujo un aumento de la expresión de HSP70 en células U-937 a las 2 horas de su finalización. El HS no alteró los niveles de expresión de HSP27 de manera significativa (Figura 36).

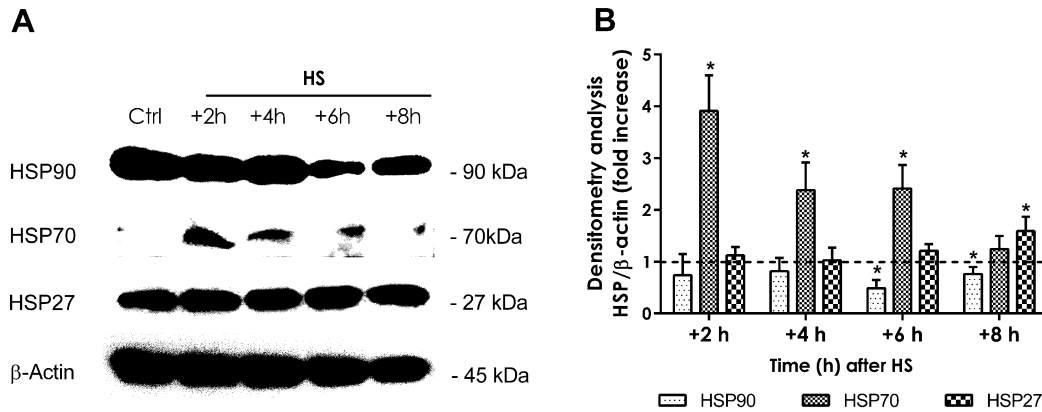


Figura 36. Efecto del estrés térmico (HS) en la expresión de las proteínas de estrés térmico (HSP) con respecto al tiempo en células U-937. Las células se sometieron a HS (42 °C, 1 h), las muestras se recolectaron antes (control, Ctrl) y entre 2-8 horas tras el cese del HS. A) El Western blot se realizó con un anticuerpo específico anti-HSP90 (F-8), anti-HSP70 (N27F3-4), anti-HSP27 (G31), utilizando el anticuerpo anti- β -actina (8H10D10) como referencia y control de carga de proteínas. B) El histograma muestra las medias \pm SEM (experimental/control) de 4 experimentos independientes. *P < 0,05 en comparación con los valores de control.

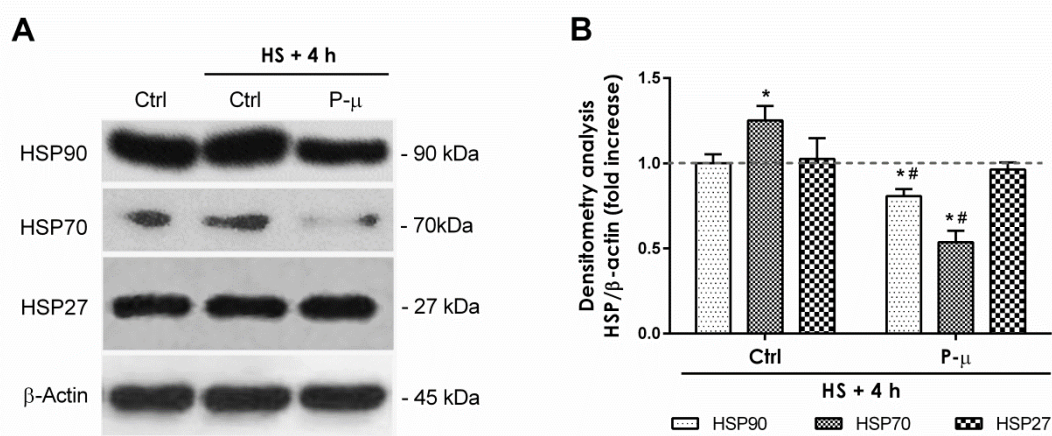


Figura 37. Efecto del estrés térmico (HS) y la inhibición de HSP70 sobre el contenido de proteínas de estrés térmico (HSP) en células U-937. Las células se pretrataron 24 horas con 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl), luego se indujo HS (42 °C, 1 h). Las muestras se recogieron tras 4 horas del cese de HS. A) El Western blot se realizó con un anticuerpo específico anti-HSP90 (F-8), anti-HSP70 (N27F3-4), anti-HSP27 (G31), y se utilizó anticuerpo anti- β -actina (8H10D10) como referencia y control de carga de proteínas. B) El histograma muestra la expresión de proteínas HSP. Los valores se presentan como las medias \pm SEM (experimental/control) de 4 experimentos independientes. *P < 0,05 en comparación con los valores de control. #P < 0,05 en comparación con los valores de control en condiciones de estrés.

Siguiendo esta línea de resultados, la preincubación con 1 μ M P- μ indujo una sensibilización al HS, lo que se tradujo en una disminución notable, no sólo en la expresión de HSP70, sino también de HSP90 (Figura 37). Lo cual podría explicar el aumento del número de células apoptóticas cuando las células tratadas con P- μ , carentes de actividad HSP70, se someten a HS (Figura 35), en coherencia con estudios previos [440].

La chaperona HSP70 participa en el correcto plegamiento de proteínas de nueva síntesis para garantizar su funcionalidad [441]. Por tanto, aunque ciertos niveles de HSP70 son constitutivos en la célula, su expresión está inducida por la acumulación de proteínas mal plegadas durante las etapas iniciales de estrés, constituyendo parte de la "respuesta al estrés". En condiciones estresantes para la célula, HSP70 se une a las proteínas desplegadas para favorecer su destrucción. Cuando el estrés cesa, HSP70 vuelve a disminuir hasta niveles previos a los del estrés, y la fisiología celular procede regularmente [442]. Sin embargo, en ocasiones las alteraciones causadas por el factor estresante superan la capacidad de respuesta al estrés, y los daños conducen la célula hacia la apoptosis [442]. En base a esto, el descenso de la viabilidad celular de las células U-937 (Figura 33) indica que las condiciones experimentales de estrés excedieron la capacidad de los mecanismos de respuesta a estrés. Las células de leucemia tienen altos niveles de HSP70, para preservar el correcto funcionamiento de sus proteínas en condiciones sostenidas de estrés celular. Por ello no es de extrañar que la inhibición de HSP70 con P- μ haya mostrado una notable actividad anti-leucémica [443]. Nuestros datos muestran que la pérdida de viabilidad celular debido a HS se acentuó debido a la inhibición de HSP70. Esto apunta a que HSP70 participa, al menos parcialmente, en la respuesta al estrés de las células U-937 (Figura 33).

En paralelo a la pérdida de la viabilidad celular inducida por HS (Figura 33) se produjo una activación dependiente del tiempo de caspasa-3, y -8 (Figura 34). Adicionalmente, las imágenes de microscopía evidencian la morfología nuclear apoptótica de las células U-937 causada por HS. Por otro lado, los hallazgos de Samali et al. [444] demuestran que la hipertermia promueve la apoptosis en las células U-937. Por tanto, las evidencias son lo suficientemente robustas para afirmar que el HS induce apoptosis también en nuestro modelo experimental (U-937). Los estudios de Samali et al. [444] mostraron un rápido aumento de los niveles de HSP70 como parte de la respuesta a estrés térmico. Del mismo modo, aquí mostramos una disminución de

viabilidad celular (Figura 33) acompañada de un aumento simultáneo de los niveles de HSP70 (Figura 36). Después del incremento de expresión de HSP70, los niveles disminuyeron (Figura 36) y se desencadenó la muerte celular apoptótica (Figura 35), como corroboró la activación de las caspasas-3, -8 y -9 (Figura 34). Samali et al. [444] indujeron hipertermia en las mismas condiciones que nosotros utilizamos (42 °C, 1 h), y además sobre la misma línea celular de leucemia (U-937) mostrando valores crecientes de los niveles de HSP70 después del choque térmico. Sin embargo, nuestros datos indican que el notable aumento de HSP70 inducido por HS, fue seguido de una caída de los niveles de HSP70, volviendo estos a los niveles basales previos a los inducidos por HS (Figura 36). Por otro lado, Yu et al. [440] demostraron que aplicando un tratamiento apoptogénico de hipertermia en células U-937 se induce la activación de las caspasas-3 y -8. A pesar de que no demuestran la activación de la caspasa-9 en su estudio, afirman que la apoptosis inducida por HS cursa por vía intrínseca ya que sí mostraron eventos apoptóticos estrechamente relacionados con la apoptosis mitocondrial, como la despolarización de membrana mitocondrial, generación de peróxidos intracelulares y la liberación de citocromo *c*. La activación de la caspasa-9 que experimentaron nuestras células, no sólo está de acuerdo con el citado estudio, sino que además, lo complementa con la activación de esta proteasa que funcionaría como un “gatillo” para la activación de proteasas ejecutoras de la apoptosis. Yu et al. [440] también concluyeron que los bajos niveles de HSP70 favorece la progresión de la apoptosis al desmontar este mecanismo de protección, como muestran nuestros resultados (Figura 36).

Los resultados aquí descritos muestran una disminución simultánea de HSP70 y HSP90 (Figura 36), que se produce en un contexto paralelo de pérdida de viabilidad celular (Figura 33). Estudios demuestran que HSP70 y HSP90 interactúan con proteínas de supervivencia que confieren resistencia a la apoptosis, y por ello estas HSP han sido consideradas como dianas en estudios para vencer la quimioresistencia que presenta la leucemia [445, 94]. Teniendo en cuenta que ambas HSP juegan un papel importante en la resistencia a la apoptosis [445, 94], la eliminación de las mismas por mecanismos como el proteasoma y/o lisosoma, desempeñan una función facilitadora para un funcionamiento normal de la maquinaria apoptótica, y la consecuente eliminación de las células dañadas. A pesar de que HSP70 aumenta inicialmente para defender las células U-937 de la hipertermia, las alteraciones causadas son tales que conducen a las células a un destino fatal. De modo, que todo parece indicar que HSP70 y HSP90 son eliminadas

con el fin de no obstaculizar el proceso apoptótico (Figura 36). Tanto es así que cuando aplicamos HS a células U-937 carentes de actividad HSP70, disminuyó la viabilidad celular (Figura 33), aumentó actividad caspasa-8 y -3 (Figura 34) y la apoptosis (Figura 35), las células experimentaron una disminución adicional de los niveles de HSP70 y HSP90 (Figura 37).

HSP27 ha sido descrita por tener una respuesta lenta al estrés ya que mientras que la mayoría de estas proteínas se acumulan en un corto espacio de tiempo, HSP27 necesita horas para alcanzar niveles similares [14], siendo gran responsable de la termotolerancia y la resistencia a drogas [39]. Interviene en proliferación y diferenciación celular en células leucémicas, considerándose como un marcador de diferenciación [43, 44]. Aunque ciertos estudios apuntan a que HSP27 es parte de la respuesta al estrés [94], nuestro sistema celular no muestra modulación de HSP27 inducida por HS (Figura 36). Por otro lado, Bruey et al. [217] sostienen que HSP27 sólo inhibe la activación de caspasas que cursan por la vía apoptótica intrínseca mediante el secuestro del citocromo *c*. El aumento en la actividad caspasa-9 que produjo el HS no se vio incrementado como en el caso de la caspasa-3 cuando se adicionó pifithrin- μ (Figura 34C). Además, los niveles de HSP27 no se vieron afectados a las 4h de HS, con o sin pifithrin- μ , manteniendo los valores de las condiciones basales (Figura 37). Por tanto, entendemos que la activación de la caspasa-9 no está bloqueada, al menos totalmente por la acción de HSP70 en las células U-937 (Figura 34A). A pesar de que este resultado mantiene la coherencia con los estudios de Bruey y cols. [217], se necesitaría un estudio adicional para esclarecer el papel de HSP27 en la respuesta al estrés en células de leucemia U-937, enmarcándolo como un potencial objetivo para mejorar la eficiencia de la activación de la apoptosis por vía mitocondrial.

CAPÍTULO 2. PAPEL DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP90 EN LA RESISTENCIA A LA HIPERTERMIA DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MONOCITARIA AGUDA U-937.

Para abordar otro de los objetivos de esta tesis, nos propusimos estudiar el efecto de HSP90 sobre la proliferación de las células de leucemia monocitaria aguda U-937. Para ello, 2 mL de suspensión celular, a una confluencia de $0,5 \times 10^5$ células/mL, fueron tratados durante 24 h (tiempo de duplicación) con los inhibidores de HSP90, geldanamicina (GA) o tanespimicina (17-AAG), ambos con una concentración de 500 nM. El recuento celular en cámara de Neubauer indicó que tanto el tratamiento con GA como con 17-AAG, disminuyeron notablemente la proliferación celular ($P < 0,05$) con respecto a las células con HSP90 activa. En otras palabras, el control aproximadamente duplicó la concentración inicial en 24 h, mientras que las células tratadas con los inhibidores de HSP90 apenas sufrieron cambios en su confluencia en este tiempo (Figura 38A).

A continuación, para esclarecer el papel de HSP90 en la proliferación celular, analizamos la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular en presencia de inhibidores de esta proteína. En los perfiles de distribución de las fases del ciclo se apreció que las células U-937 tratadas con inhibidores de HSP90 no mostraron cambios con respecto al control, es decir, no hubo arresto del ciclo celular en ninguna fase en particular. Sin embargo, se evidenció un aumento de células apoptóticas representadas en el segmento subG1 (Figura 38). Estos resultados en conjunto indican que la ralentización de la proliferación afectaría a todas las fases del ciclo por igual. Además, las diferencias que se aprecian en el recuento de células con HSP90 inhibida con respecto al control se deben principalmente a un bloqueo de la proliferación, más que a una inducción de muerte celular. Hay estudios que han analizado el ciclo celular bajo condiciones de inhibición de HSP90 en células tumorales, tales como células de cáncer de vejiga [446]. Este estudio sostiene que la proliferación celular se ve irrupida por un arresto en fase G2/M acompañado de un incremento de la apoptosis [446]. Lo cual es coherente dado que la ciclina dependiente de kinasa-2 (Cdk2), o incluso la proteína Wee1 [447], que regulan el ciclo en esta fase son proteínas clientes de HSP90, y por tanto dependiente de ella para su correcto funcionamiento [446, 448], no siendo pocos los estudios que muestran la interacción de HSP90 con diversas proteínas reguladoras de cualquiera de las diferentes fases ciclo celular [449], además de ciertos

factores de crecimiento que resultan esenciales en células tumorales [450]. Por lo que no es de extrañar que se haya descrito que en células tumorales el bloqueo de HSP90 ha producido catástrofe mitótica por depleción de reguladores mitóticos como Wee1, plk-1, Aurora B y survivina, favoreciendo así una apoptosis aberrante [451].

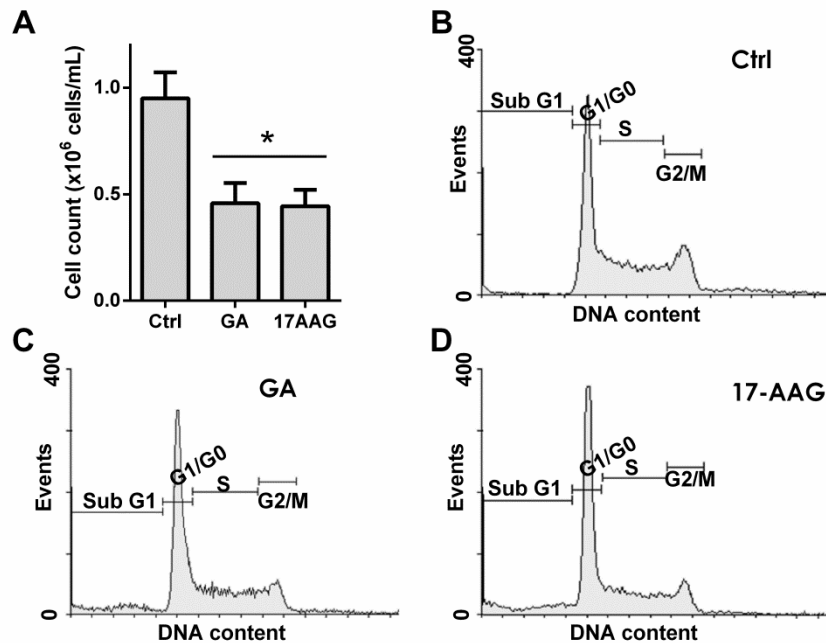


Figura 38. Papel de HSP90 en la proliferación celular en células U-937. Las células se trataron 24 horas con 500 nM de geldanamicina (GA), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl). A) La confluencia celular se cuantificó mediante cámara de Neubauer. Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control. B-D) Las células U-937 fijadas y teñidas con yoduro de propidio se analizaron por citometría de flujo para estudiar las fases del ciclo celular. Los perfiles de ciclo celular son los más representativos de 4 experimentos independientes.

Dado que la inhibición de HSP90 parecía dificultar la proliferación de las células de leucemia, nos planteamos estudiar el papel de dicha inhibición en la sensibilidad de las células U-937 a un estrés térmico posterior. Para ello, bajo condiciones de inhibición de la actividad HSP90 se indujo un choque térmico (HS, 1 h, 42 °C) a células U-937 y se valoraron los efectos mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Los resultados en la Figura 39 expresan la viabilidad celular, cada uno de los valores representado es el ratio de disminución de las células estresadas con respecto a una muestra no estresada. Los resultados indican que el HS causó una disminución tiempo dependiente de la viabilidad de las células U-937. La inhibición de HSP90 no modificó dicha pérdida de viabilidad celular, ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a los valores control y muestras experimentales para los mismos puntos de tiempo (Figura 39).

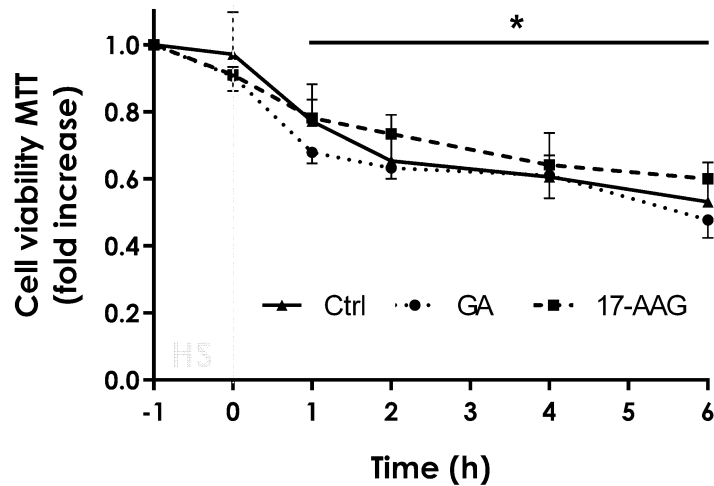


Figura 39. Efecto del estrés térmico (HS) sobre la viabilidad celular en células U-937. Las células se trataron previamente durante 24 horas con 500 nM de geldanamicina (GA), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl); luego se indujo el HS durante 1 h a 42 °C (eje de abscisa de -1 h a 0 h). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT a lo largo del tiempo, antes del HS y después en diferentes momentos (0-6 h). Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor de actividad en ausencia de HS (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de viabilidad inicial.

Para estudiar el efecto de la inhibición de HSP90 en la inducción de la apoptosis por estrés térmico, las células U-937 se pretrataron durante 24 h con 500 nM GA o 500 nM 17-AAG previo al HS (1 h, 42 °C). Tras 4 h del término del HS se cuantificó por microscopía el porcentaje de células que presentaban morfología nuclear apoptótica (Figura 40A). Los resultados muestran un incremento significativo del ratio de células con morfología nuclear apoptótica analizadas 4 h después del HS con respecto al control ($P < 0,05$; Figura 40B). También se apreció un aumento significativo del ratio de células apoptóticas inducido por la inhibición de HSP90 con respecto al control ($P < 0,05$; Figura 40B). Aunque, dicha inhibición no produjo diferencias adicionales en el elevado ratio de células apoptóticas inducido por HS (Figura 40B). Sin embargo, si observamos en conjunto estos resultados (Figura 39 y Figura 40), podemos ver que la inhibición de HSP90 mostró un efecto citostático que redujo la proliferación celular a niveles inapreciables, y además este efecto no interfirió con la capacidad apoptogénica del estrés térmico sobre las células U-937. Por tanto, el efecto de HS no se ve alterado por la presencia de inhibidores de HSP90 en cuanto a resultados de viabilidad celular e inductor de la apoptosis, pero hay que tener presente que en dichas condiciones las células prácticamente no están proliferando, por lo que resulta más eficiente.

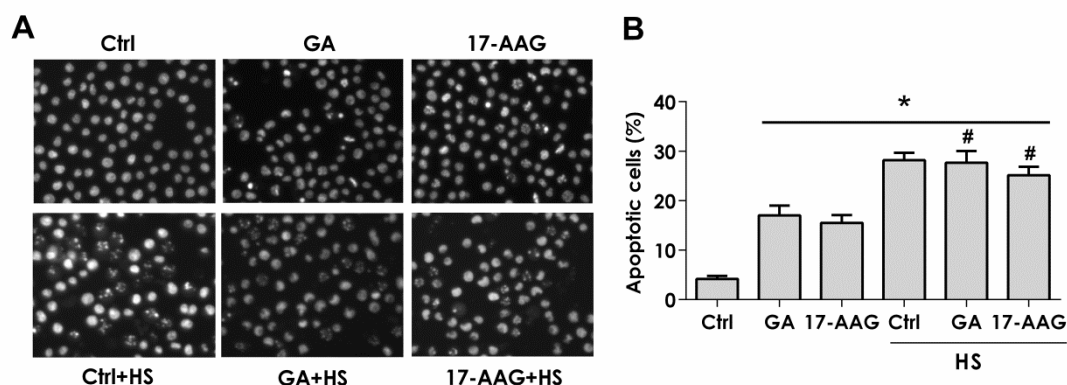


Figura 40. Efecto del estrés térmico (HS) en la apoptosis de células U-937. Las células se pretrataron durante 24 horas con 500 nM de GA, 500 nM de 17-AAG o el vehículo (control, Ctrl), luego se indujo el HS durante 1 h a 42 °C, las muestras se recolectaron tras 24 h de inhibición y tras 4 h de cese del HS. (A) Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, se visualizaron en un microscopio de fase de contraste Nikon Eclipse TS 100 y las imágenes se capturaron usando una cámara digital Nikon (DSQi1Mc). Se muestra un campo representativo de cada grupo experimental. (B) El histograma muestra el porcentaje de células con núcleos apoptóticos. Los valores se presentan como las medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0.05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0.05$ en comparación con los valores de inhibición en ausencia de HS.

Dado que el tratamiento conjunto de inhibidores de HSP90 y HS inducían apoptosis en células U-937, analizamos la actividad enzimática de las caspasa-3, -8 y -9 por su papel clave en las vías de señalización apoptótica. La inhibición de HSP90 indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) en la actividad de las caspasa-3, -8 y -9 con respecto al control (Figura 41A). Igualmente, las células U-937 fueron sometidas a HS observamos un notable incremento con respecto al control ($P < 0,05$) en la actividad de las tres caspasas analizadas. El HS causó un aumento significativo en la actividad caspasa-3 y -8 de las células U-937 pretratadas con GA o 17-AAG ($P < 0,05$), sin embargo, la actividad caspasa-9 no experimentó variación significativa con respecto a la activación inducida por los agentes inhibidores. Por otro lado, se aprecia que este aumento en la actividad de las caspasas inducido por el tratamiento combinado (GA+HS o 17-AAG + HS) es notablemente inferior ($P < 0,05$) que el generado por el HS en una célula con actividad HSP90 (Figura 41A). Siendo la caspasa-3 una proteasa ejecutora en la que convergen las principales rutas apoptóticas, nos propusimos cuantificar los niveles de procaspasa-3. En coherencia con los valores de actividad enzimática, los niveles de procaspasa-3 disminuyeron significativamente tanto por la inhibición de HSP90 como por el HS ($P < 0,05$). El tratamiento térmico combinado con la inhibición de HSP90 indujo un mayor procesamiento de la procaspasa-3 con respecto a las células no estresadas térmicamente ($P < 0,05$). Sin embargo, y en concordancia con los valores de actividad enzimática, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento combinado y el HS en términos de activación de caspasa-3 (Figura 41B).

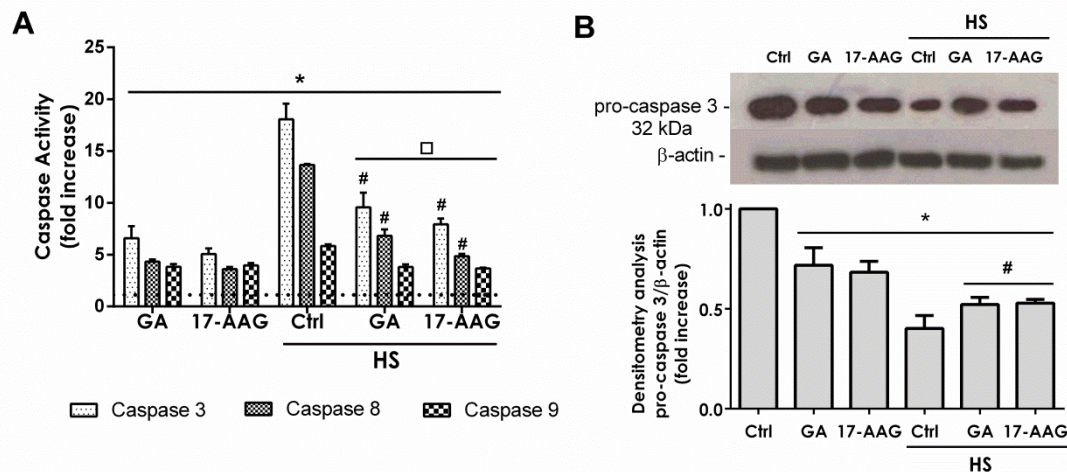


Figura 41. Efecto del estrés térmico (HS) sobre la actividad caspasa en células U-937. Las células se pretrataron durante 24 horas con 500 nM de geldanamicina (GA), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl), posteriormente se indujo el HS durante 1 h a 42 °C seguido de un periodo de recuperación de 4 h. (A) Valores de activación de caspasa-3, -8 y -9. La actividad enzimática de caspasa-3, -8 y -9 se cuantificó como se describe en Materiales y Métodos. (B) Valores del contenido de procaspasa-3. El Western blot se realizó con el anticuerpo específico anti-procaspasa-3 (8G10) y utilizando anti-β-actina (8H10D10) como referencia de carga de proteínas. El histograma muestra la cuantificación procaspasa-3 con respecto a la β-actina. Los valores presentan las medias ± SEM de 4 experimentos independientes y expresan el número de veces sobre el valor de las muestras no estresadas (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de inhibición en ausencia de HS. □ $P < 0,05$ en comparación con los valores de control en condiciones de estrés.

Se sabe que la expresión de proteínas HSP es muy elevada en las células tumorales en general, y en células de leucemia en particular. A este respecto estudiamos los niveles de HSP90, HSP70 y HSP27 en las condiciones apoptogénicas descritas debido al tratamiento combinados de inhibición de HSP90 y HS. Los resultados de Western blot no mostraron alteraciones en los niveles de HSP90, ni en presencia de sus inhibidores GA y 17-AAG, ni tras el HS (Figura 42B). Sin embargo, GA y 17-AAG indujeron un aumento de los niveles de HSP70 y HSP27. Cabe pensar, que estando en condiciones de inapreciable proliferación y aumento de la apoptosis las células estén estresadas y manifiesten un aumento de la expresión de los niveles de HSP70 y HSP27 ($P < 0,05$). El HS sólo tuvo efecto sobre la expresión de HSP70, a las 4 h del cese del mismo, que se vio aumentada de manera significativa con respecto al control (Figura 10B; $P < 0,05$). Cuando se inhibió HSP90, el HS tuvo un efecto inductor ($P < 0,05$) de la expresión de HSP70 y de HSP27, aunque estos niveles no fueron significativos con respecto a los valores de expresión de HSP70 y HSP27 inducidos por los inhibidores. Es decir, parece ser que la ausencia de actividad HSP90 promueve la expresión de HSP70

y HSP27, probablemente mediado por HSF, y el HS no incrementó los niveles de HSP70 y HSP27 de manera adicional ($P < 0,05$; Figura 42B).

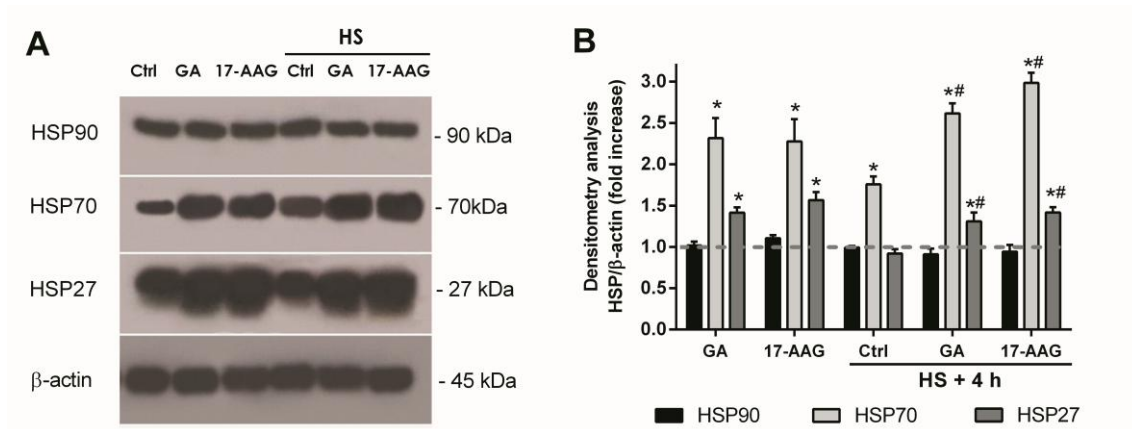


Figura 42. Efecto del estrés térmico (HS) en la expresión de las proteínas de choque térmico (HSP) en células U-937. Las células se pretrataron durante 24 horas con 500 nM de geldanamicina (GA), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl), posteriormente se indujo el HS durante 1 h a 42 °C seguido de un periodo de recuperación de 4 h. A) El Western blot se realizó con un anticuerpo específico anti-HSP90 (F-8), anti-HSP70 (N27F3-4), anti-HSP27 (G31), y se utilizó anticuerpo anti- β -actina (8H10D10) como referencia y control de carga de proteínas. B) El histograma muestra la expresión de proteínas HSP. Los valores se presentan como las medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores en condiciones de estrés (HS+4 h).

Cuando las células están bajo condiciones de estrés térmico y ausencia de actividad HSP90, los resultados obtenidos muestran una elevada expresión de HSP70 y HSP27 (Figura 42) aún, cuando la proliferación celular es prácticamente nula (Figura 33) y la apoptosis es elevada (Figura 40 y 41). Inicialmente podría parecer un resultado contradictorio con respecto al desarme del mecanismo de “respuesta a estrés” que sostiene el Capítulo 1 de los resultados de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aún desconocemos lo que sucedería con los niveles de HSP70 y HSP27 a tiempos más largos de exposición. Aunque observando los valores de la tendencia de viabilidad celular con respecto al tiempo (Figura 39) y como disminuyen los niveles de HSP cuando la célula entra en apoptosis (Figura 36) sería lógico hipotetizar que estos niveles elevados de HSP70 y HSP27 preceden a un descenso de los mismos. Lo cual estaría en línea también con los estudios de Yu et al. [440] sobre el descenso de los niveles de HSP70 en condiciones apoptogénicas.

No obstante, estudios llevados a cabo en células de leucemia U-937 han descrito que niveles elevados tanto de HSP70 [452], como de HSP27 [219] previenen la activación de caspasas mediada por citocromo *c*. Aunque los niveles de HSP70 y HSP27 aparecen elevados al tratar las células con inhibidores de HSP90 y HS (Figura 42) con respecto al tratamiento de HS por sí solo, es probable que se trate de un hecho transitorio. En el Capítulo 1 mostramos una correspondencia entre la disminución de los niveles HSP70 con la progresión de la apoptosis (Figura 36). Es muy probable que HSP70 y/o HSP27, estén dificultando en parte la activación de las caspasa-3, -8 y -9, cuando las células son tratadas con HS en ausencia de actividad HSP90 (Figura 41). La pérdida tiempo-dependiente de la viabilidad celular y su tendencia decreciente (Figura 39) hace pensar que tanto los niveles de HSP70 y HSP27 como la reducida actividad de las caspasas sean hechos relacionados y que ocurren de forma transitoria en células de leucemia U-937. No obstante, la comprobación de esta hipótesis requeriría de estudios adicionales.

Por otro lado, HSP27 ha sido descrita como una proteína partícipe de la respuesta a estrés, cuyos niveles aumentan de manera más lenta que el resto de miembros HSP presentes en la respuesta al estrés [14]. Futuros estudios en los que se llevasen a cabo la inhibición de la actividad HSP27, podrían esclarecer si los elevados niveles de esta proteína tienen alguna implicación en la disminución de la actividad caspasa observada cuando las células U-937 son tratadas con HS en condiciones de inhibición de HSP90 con respecto al tratamiento de HS por sí solo (Figura 42). De confirmarse que HSP27 representa un obstáculo para una mayor activación de la vía intrínseca de la apoptosis, sería de gran interés investigar la doble inhibición de HSP27 y HSP90 como procedimiento sensibilizador a la hipertermia en células leucémicas U-937.

En resumen, la inhibición de HSP90 interrumpe drásticamente la proliferación celular de células de leucemia monocitaria U-937 sin alterar los efectos proapoptóticos de un posterior tratamiento de hipertermia. Es decir, el uso combinado de inhibidores de HSP90 e hipertermia tiene un efecto citostático y apoptogénico en células de leucemia U-937.

CAPÍTULO 3. EFECTO DE LA HIPERTERMIA EN PRESENCIA DE AGENTES OXIDANTES O QUIMIOTERAPÉUTICOS

El aumento de la actividad oxidativa que sobrepasa la capacidad de los mecanismos antioxidantes disponibles en la célula genera el fenómeno conocido como estrés oxidativo. Cuando los daños oxidativos son irreparables, la célula sana inicia los procesos de apoptosis. Las células tumorales, en términos generales, son más tolerantes a cualquier tipo de estrés y el inicio de las vías apoptóticas está seriamente dificultado. No obstante, superado cierto umbral de daño, la célula tumoral iniciaría igualmente los procesos de apoptosis de la misma manera que ocurre en células sanas. Se sabe que el tratamiento con fármacos antitumorales, como etopósido [453] y citarabina [454] en células U-937, genera estrés oxidativo y parte de su acción está basado ello. Ejercen una acción específica en la célula tumoral, consiguiendo activar las vías de señalización apoptóticas en modo particular en este tipo de células.

Para estudiar los efectos del estrés oxidativo sobre células U-937 bajo estrés térmico (HS), en primer lugar, nos planteamos caracterizar el efecto apoptogénico de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Con este fin, las células U-937 en fase de crecimiento exponencial ($0,5-1 \times 10^6$ células/mL) fueron incubadas con H_2O_2 a diferentes tiempos (1, 2, 4 y 24 h) y concentraciones crecientes (1, 10, 100, 500 μM y 1 mM). Acorde con resultados publicados anteriormente por nuestro grupo de investigación en células leucémicas HL-60 [455], el H_2O_2 indujo una disminución tiempo y dosis dependiente en la viabilidad de las células U-937. La mayor concentración de H_2O_2 (1 mM) durante el mayor tiempo de exposición (24 h) tuvo como resultado la reducción más acentuada de la viabilidad celular (Figura 43A). Los procesos apoptóticos en células leucémicas, como U-937, se pueden evidenciar aproximadamente a las 3 h de recibir el estímulo apoptótico. En virtud de ello, tomamos como referencia el tiempo de 4 h para cuantificar la proporción de células apoptóticas inducidas por concentraciones crecientes de H_2O_2 . El H_2O_2 causó un aumento en el ratio de células que mostraban morfología nuclear apoptótica directamente proporcional a su concentración, siendo el mayor efecto a la dosis de 1 mM H_2O_2 (Figura 43B).

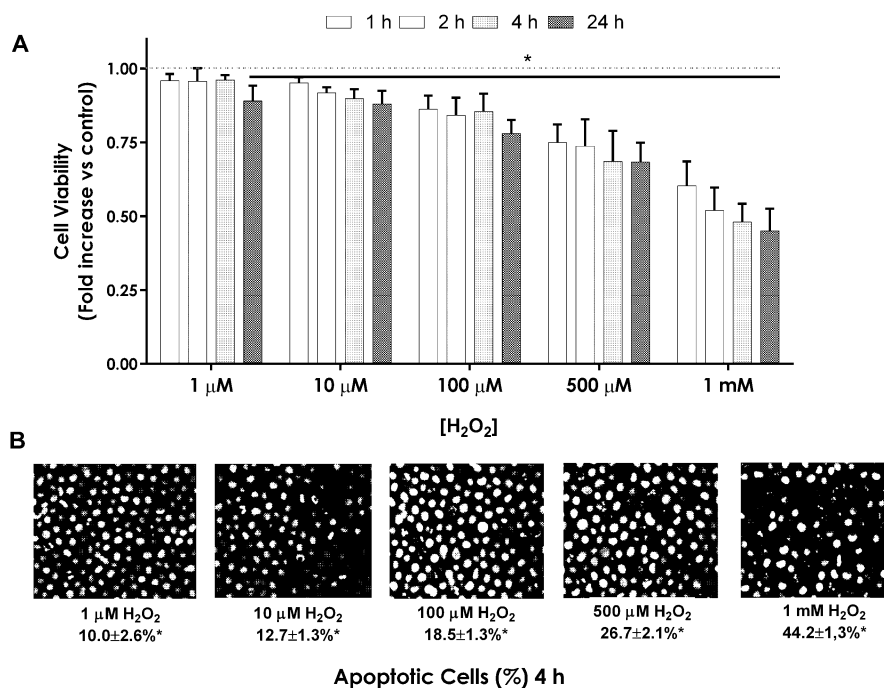


Figura 43. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad celular y apoptosis en células U-937. A) Histograma dosis/tiempo-respuesta de la viabilidad celular (MTT) al agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células se trataron con 1 μM, 10 μM, 100 μM, 500 μM y 1 mM de H₂O₂. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT a las 1 h, 2 h, 4 h y 24 h de la incubación con el H₂O₂. Los valores se presentan como medias ± SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor de actividad en ausencia de H₂O₂ (experimental/control). B) Las imágenes de microscopía de fluorescencia (Hoescht 33342) muestran la morfología nuclear de células U-937 tratadas con concentraciones crecientes de H₂O₂ tras 4 h de tratamiento. Los valores se expresan como medias del porcentaje de células con morfología nuclear apoptótica. *P < 0,05 en comparación con los valores de control.

Citarabina (AraC) y etopósido (VP-16) son dos agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados en tratamientos de leucemia aguda [319, 332]. Para estudiar la incidencia que tienen dichos agentes quimioterapéuticos sobre la viabilidad celular de estos compuestos. Tratamos las células U-937 con 50 μM citarabina y 50 μM etopósido, y a continuación llevamos cabo el ensayo de viabilidad celular MTT a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4 y 6 h). Los resultados indicaron una disminución significativa (P < 0,05) de la viabilidad celular con respecto al control a partir de las 2 h de tratamiento. Los valores experimentaron una disminución progresiva hasta el último de los puntos monitorizados (Figura 44A). De manera simultánea se cuantificó el ratio de núcleos apoptóticos en las células U-937 a los mismos puntos de tiempo. Los resultados indicaron un aumento significativo (P < 0,05) en el ratio de células que presentaban

núcleos con morfología apoptótica a partir de las 4 h con respecto al control (Figura 44B y 44C).

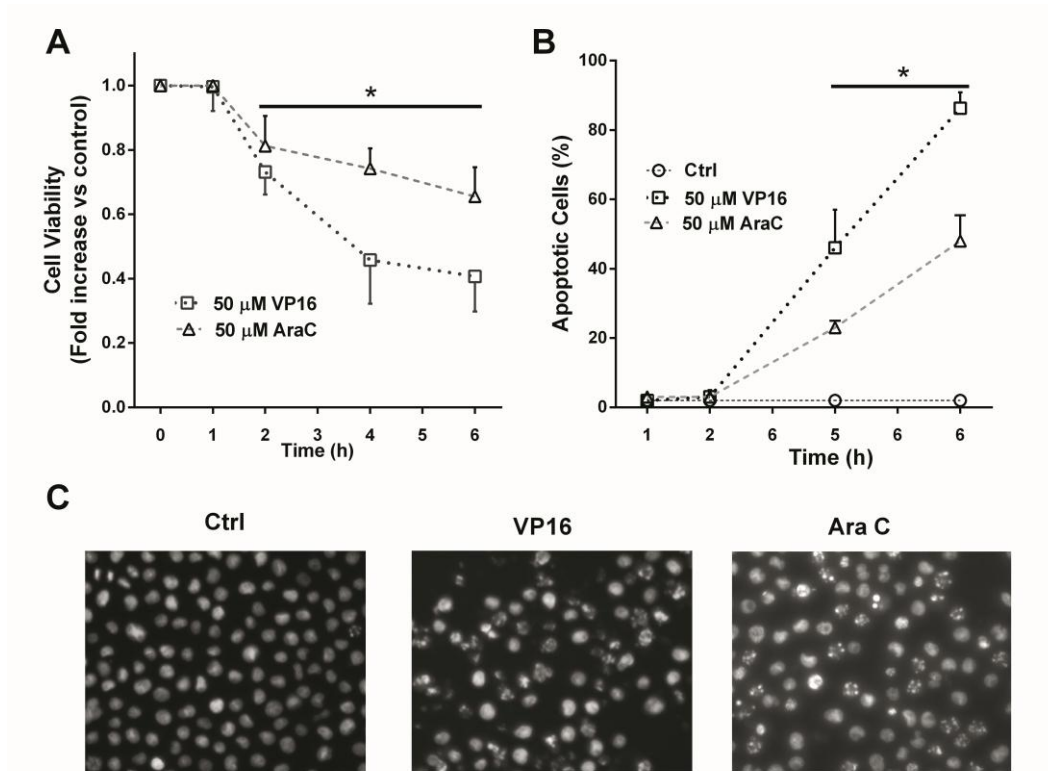


Figura 44. Efecto de los quimioterapéuticos sobre la viabilidad celular y apoptosis en células U-937. Las células se trataron previamente durante 4 horas con 50 μM de etopósido (VP-16) o 50 μM de citarabina (AraC). A) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT a diferentes tiempos (0-6 h). B) Cuantificación de la morfología apoptótica. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, se visualizaron en un microscopio de fase de contraste Nikon Eclipse TS 100 y las imágenes se capturaron usando una cámara digital Nikon (DSQi1Mc). Los valores de A y B representan las medias ± SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor de actividad en ausencia de quimioterapéuticos (experimental/control). *P < 0,05 en comparación con el control. C) Muestra los campos más representativos de cada grupo experimentales cuantificados en B a las 4 h de tratamiento.

Caracterizados los efectos del HS (1 h, 42 °C) en las células U-937 (Capítulo 1), sabemos que estas no desarrollan resistencia en dichas condiciones de hipertermia. Hemos visto que el principal mecanismo de proteínas HSP que participa en la respuesta a estrés disminuye sus niveles, y a continuación las células leucémicas U-937 entran en apoptosis de manera progresiva.

Estudios previos presentan la terapia combinada de estrés térmico y agentes quimioterapéuticos, como una herramienta exitosa induciendo apoptosis en comparación con las células que son únicamente tratadas con quimioterapéuticos [200].

En vista de nuestros resultados, nos planteamos estudiar el efecto del HS previo a un estímulo apoptótico en células U-937. Para ello, las células U-937 se sometieron a HS y 2 h después de su cese, se trataron con 500 μM H_2O_2 , 50 μM citarabina o 50 μM etopósido durante 4 h. A continuación, se cuantificaron los valores de viabilidad celular y el ratio de células con morfología nuclear apoptótica. Los resultados de MTT indican que la disminución de la viabilidad celular inducida por H_2O_2 o etopósido no se vio significativamente alterada por la exposición previa de las células a HS. Sin embargo, no fue así en las células tratadas con citarabina, en las que el HS indujo una disminución adicional estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en la viabilidad celular con respecto a la disminución que había causado el tratamiento de citarabina por sí solo ($P < 0,05$) (Figura 45A). No obstante, el tratamiento combinado de HS y citarabina no superó los efectos que tuvo el HS por sí solo sobre la viabilidad celular. Por otro lado, la cuantificación de células con morfología apoptótica mantuvo el mismo patrón de resultados que la determinación de viabilidad. El HS no causó alteraciones en la acción proapoptótica inducida por estrés oxidativo (H_2O_2) o por etopósido ($P < 0,05$; Figura 45B); sin embargo, sí promovió un aumento significativo en la capacidad apoptogénica de citarabina sobre las células U-937 ($P < 0,05$; Figura 45B). Aunque de nuevo, el tratamiento combinado de HS y citarabina no superó los efectos que tuvo el HS por sí solo sobre el aumento del ratio de células U-937 con morfología apoptótica.

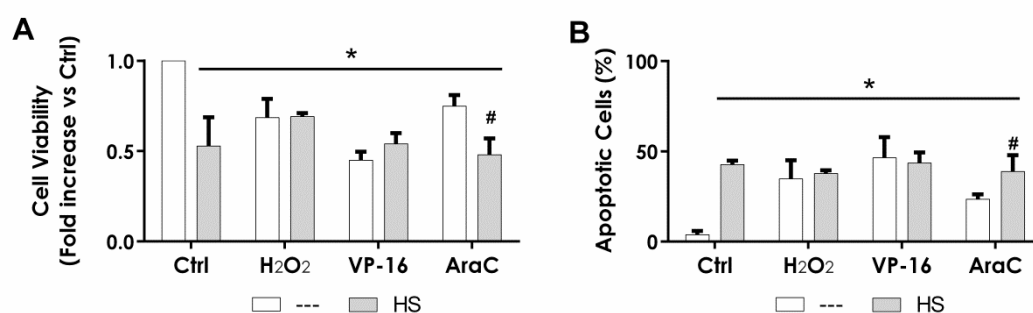


Figura 45. Efecto de la hipertermia (HS) frente al estrés celular causado por quimioterapéuticos y peróxido de hidrógeno en células U-937. Las células se sometieron a HS durante 1 h a 42 °C y 2 h después de su cese, se trataron con 500 μM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 50 μM de citarabina (AraC) o 50 μM de etopósido (VP-16) durante 4 h. A) La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT como se describe en Materiales y Métodos. B) Porcentaje de células con morfología nuclear apoptótica. Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor en ausencia de tratamiento (experimental/control). * $P < 0,05$ en comparación con el control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de los quimioterapéuticos en ausencia de estrés.

La hipertermia se ha aplicado con éxito como tratamiento único o combinado en diferentes tipos de cáncer [200]. Los resultados de nuestros estudios *in vitro* indican que los tratamientos combinados no presentan diferente capacidad antileucémica que el tratamiento de HS de manera independiente. No obstante, en este punto, nos planteamos valorar la toxicidad que podría derivar el tratamiento hipertérmico en combinación con los agentes quimioterapéuticos en leucocitos, como las células parentales sanas de la leucemia. A partir de sangre fresca (< 1 hora después de su extracción) aislamos leucocitos por centrifugación en gradiente de ficoll. Lavados los leucocitos fueron sometidos a las mismas condiciones de HS (1 h, 42 °C) y tras el cese se añadió a las células 500 μM H_2O_2 , 50 μM etopósido o 50 μM citarabina durante 4 h. Pasado el tiempo de tratamiento se cuantificaron los cambios en la viabilidad celular de los leucocitos por el método de exclusión de Trypan Blue en cámara de Neubauer. A diferencia del patrón de respuesta que tiene lugar en las células U-937, los resultados indican que HS, no sólo no causa aumento de la mortalidad en leucocitos sanos, sino que además, disminuye de manera significativa ($P < 0,05$) el daño causado por los agentes quimioterapéuticos a los leucocitos (Figura 46A). Para estudiar si la mortalidad inducida por la toxicidad de los tratamientos es de origen apoptótico analizamos la actividad de la caspasa-3 (Figura 46B). Los resultados indican que HS disminuyó de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) los valores de activación de caspasa-3 con respecto a los valores controles. De la misma manera, el aumento de la actividad caspasa-3 ($P < 0,05$) causado por los agentes quimioterapéuticos en leucocitos experimentó una drástica atenuación debido a la aplicación previa de HS ($P < 0,05$; Figura 14 B). Sin embargo, se puede observar que el tratamiento de hipertermia por sí solo no induce toxicidad alguna en leucocitos, a diferencia de los tratamientos combinados (Figura 46). Si tenemos en cuenta que sobre las células de leucemia U-937 el tratamiento de hipertermia, por sí solo, es tan efectivo como el combinado con agentes quimioterapéuticos (Figura 45), este último no resultaría ventajoso ya que presenta igual actividad antileucémica y una aparente mayor toxicidad sobre células sanas (Figura 46). Con esta afirmación estaríamos descuidando los resultados que indican una desorganización progresiva del mecanismo de “respuesta a estrés” relacionado con las proteínas HSP (Capítulos 1 y 2) que conllevaría una disminución de la tolerancia a estrés, y conduce la célula leucémica hacia la apoptosis. Lo cual podría explicar por qué estudios previos señalan que la terapia combinada de estrés térmico y a agentes quimioterapéuticos presenta una mayor tasa de apoptosis en células tumorales

[200]. Aunque estos resultados hasta ahora no se ajustan a nuestros valores obtenidos (Figura 45), no sería descartable que en si en células U-937 retrasásemos la adición de los tratamientos quimioterapéuticos, o insultos estresante adicionales, podríamos obtener resultados más efectivos al enfrentarnos a células más vulnerables (Figura 36). Como han demostrado otros estudios [212, 235] y se puede observar en nuestros resultados (Capítulos 1 y 2), los niveles de HSP van a determinar la resistencia o vulnerabilidad de las células a la quimioterapia. Así nuestros resultados instan a estudiar para cada tipo celular las condiciones adecuadas de hipertermia valorando las variaciones de los niveles de HSP. El objetivo sería ajustar los tratamientos combinados a una baja actividad HSP, y consecuentemente una mayor vulnerabilidad de la célula tumoral.

En cuanto a las células sanas, nuestros resultados apuntan hacia el HS como un tratamiento protector frente a los efectos tóxicos secundarios que presentan los tratamientos antileucémicos.

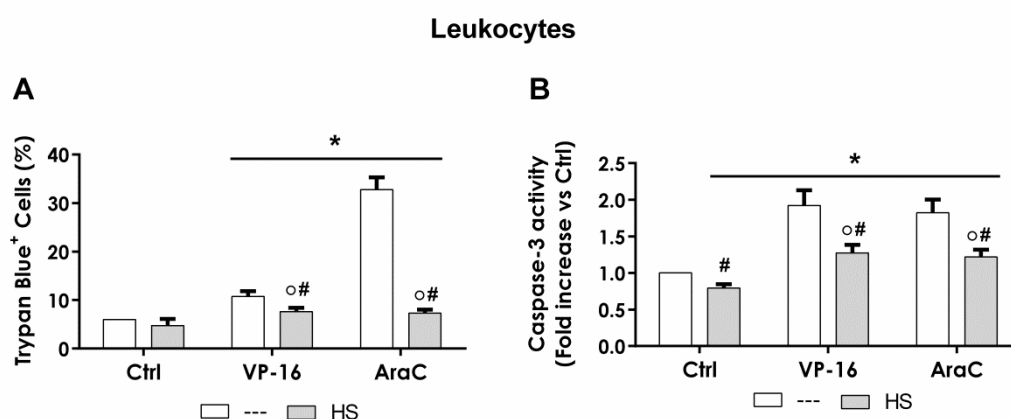


Figura 46. Efecto de la hipertermia (HS) frente al estrés celular causado por quimioterapéuticos y peróxido de hidrógeno en leucocitos. Los leucocitos se sometieron a HS durante 1 h a 42 °C y 2 h después de su cese, se trataron con 500 μ M de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 50 μ M de citarabina (AraC) o 50 μ M de etopósido (VP-16) durante 4 h. A) La viabilidad se evaluó mediante Trypan Blue tal y como se describe en Materiales y Métodos. B) Valores de activación de caspasa-3. La actividad enzimática de caspasa-3 se estimó como se describe en Materiales y Métodos. Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes y se expresan como un aumento del número de veces sobre el valor en ausencia de quimioterapéuticos (experimental/control). *P < 0,05 en comparación con los valores control. # P < 0,05 en comparación con los valores en ausencia de estrés térmico. oP < 0,05 en comparación con los valores en condiciones de estrés térmico (HS).

CAPÍTULO 4: PAPEL DE LA PROTEÍNA HSP70 EN LAS TERAPIAS COMBINADAS DE MELATONINA Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MONOCITARIA AGUDA U-937.

HSP70 es una chaperona que se sobreexpresa en condiciones de estrés celular. Niveles elevados y sostenidos en el tiempo de HSP70 están vinculados con la adquisición de tolerancia al estrés, facilitando la evasión de la apoptosis y generando condiciones ideales para el desarrollo de tumores. HSP70 se convierte por tanto en una excelente diana a la que apuntar con las estrategias anticáncer [14]. Por otro lado, resultados previos publicados por nuestro grupo de investigación demuestran que la melatonina posee efectos adyuvantes al combinarse con agentes quimioterapéuticos [435]. Este hecho, junto con los resultados anteriormente expuestos en esta Tesis en los que hemos caracterizado los efectos de la inhibición de HSP70 en células U-937 (Capítulo 1), nos llevó a plantearnos estudiar los posibles efectos de la inhibición de HSP70 en el tratamiento combinado de melatonina y agentes quimioterapéuticos en células de leucemia monocitaria aguda U-937.

En primer lugar, quisimos analizar el efecto de la melatonina y P- μ en la proliferación de las células U-937. Para ello, $0,5 \times 10^6$ células/mL se incubaron durante 24 h con 1 mM melatonina y 1 μ M P- μ . Los recuentos celulares en cámara de Neubauer tras 24 h de incubación indican que el control había duplicado la concentración celular en el cultivo, como era de esperar. Sin embargo, la melatonina inhibió de manera estadísticamente significativa ($P < 0,05$) la proliferación celular. El tratamiento de P- μ durante 24 h no causó alteraciones evidentes en el número de células tras 24 h, lo cual es coherente con los resultados anteriores (Figura 47). Cuando las células U-937 se coincubaron durante 24 h con melatonina y P- μ se obtuvo un efecto sensibilizador, dado que el tratamiento conjunto indujo una disminución de la proliferación significativamente más intensa que la melatonina y que P- μ de manera independiente ($P < 0,05$; Figura 47). Puesto que la inhibición de HSP70 por sí sola no presentaba ninguna modulación sobre la proliferación, estos resultados nos indican que no es una proteína imprescindible para la progresión del ciclo celular de las células U-937, aunque sí parece protegerlas de los efectos antiproliferativos de la melatonina.

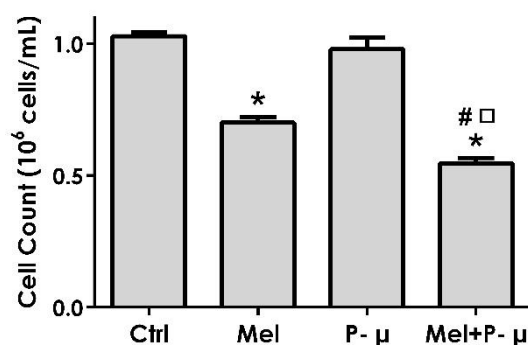


Figura 47. Papel de la inhibición de HSP70 en la proliferación de células U-937. Las células se trataron 24 horas con 1 mM de melatonina (Mel), 1 μ M de pifithrin (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl). La proliferación celular se evaluó tras 24 horas de incubación mediante cámara de Neubauer como se describe en Materiales y Métodos. Los valores del histograma se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina. $\square P < 0,05$ en comparación con los valores de pifithrin- μ .

Conociendo las condiciones de proliferación en las que se encuentran las células U-937 a las 24 h de incubación con melatonina y P- μ , quisimos estudiar su respuesta a los agentes quimioterapéuticos citarabina (50 μ M), etopósido (50 μ M) y 5-fluorouracilo (1 mM), en dichas condiciones. Para ello, en las mismas condiciones de incubación con melatonina y P- μ , las células se trataron con dichos agentes quimioterapéuticos durante 4 h. Posteriormente se analizaron los valores de viabilidad celular por el método MTT. Los resultados obtenidos indican que la combinación de melatonina con citarabina presenta valores significativamente inferiores a los presentados por ambos tratamientos de manera independiente ($P < 0,05$; Figura 48A). El patrón de comportamiento fue similar cuando citarabina se sustituyó por etopósido o 5-fluorouracilo (Figura 48B y 48C). Por otro lado, cuando las células se pretrataron con P- μ , no presentaron una mayor sensibilidad a citarabina (Figura 16A), similares resultados se obtuvieron con etopósido (Figura 48B) o 5-fluorouracilo (Figura 48C). Es decir, no se apreciaron diferencias significativas en la viabilidad celular de la línea U-937 entre las células tratadas con agentes quimioterapéuticos en presencia y ausencia de actividad HSP70. Aunque el tratamiento combinado de melatonina con el inhibidor P- μ (Mel+P- μ) mostró una capacidad antiproliferativa superior a la obtenida por los compuestos de manera independiente (Figura 47), la viabilidad celular no disminuyó de manera significativa cuando las células se trataron combinando melatonina y P- μ con respecto al tratamiento con melatonina de manera independiente (Figura 47). Sin embargo, la incubación de las

células con melatonina y el inhibidor de HSP70 favoreció que el tratamiento con quimioterapéuticos indujese la mayor disminución ($P < 0,05$) de la viabilidad celular, superando los valores de melatonina, P- μ , quimioterapéuticos, el tratamiento combinado de melatonina con P- μ (Mel+P- μ), e incluso con respecto al efecto aditivo de la melatonina con quimioterapéuticos (Mel+Ara-C, Mel+VP-16, Mel+5-FU).

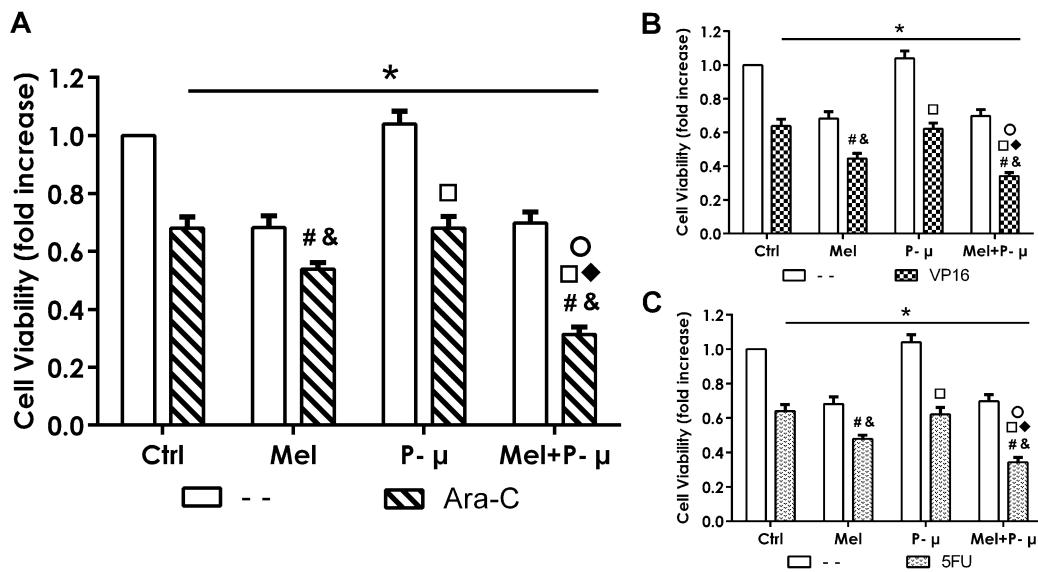


Figura 48. Papel de HSP70 en la viabilidad celular de células U-937 tratadas con melatonina y agentes quimioterapéuticos. Las células se trataron 24 horas con 1 mM de melatonina (Mel), 1 μ M pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl). Los agentes quimioterapéuticos 50 μ M de citarabina (Ara-C), 50 μ M de etopósido (VP-16) y 1 mM de 5-fluorouracilo (5FU) se incubaron 4 horas antes de evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. (A) Viabilidad celular en presencia de Ara-C. (B) Viabilidad celular en presencia de VP-16. (C) Viabilidad celular en presencia de 5FU. Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina. $\square P < 0,05$ en comparación con los valores de pifithrin- μ . & $P < 0,05$ en comparación con los valores de quimioterapéutico. $\circ P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina + quimioterapéuticos. $\blacklozenge P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina + pifithrin- μ .

Para concretar el efecto de la inhibición de HSP70 sobre el tratamiento combinado de la melatonina con los agentes quimioterapéuticos, llevamos a cabo la cuantificación del ratio de células que presentaban núcleos con morfología apoptótica. Para ello, con las mismas dosis y condiciones de incubación con melatonina y P- μ (24 h), se trataron las células con los agentes quimioterapéuticos 50 μ M citarabina, 50 μ M etopósido y 1 mM 5-fluorouracilo durante 4 h y a continuación se cuantificaron los porcentajes de células apoptóticas por microscopía. Los resultados evidencian un aumento significativo del tratamiento combinado de melatonina y los agentes quimioterapéuticos con respecto a los valores de estos compuestos por separado ($P < 0,05$; Figura 49). El P- μ por sí solo no causó alteraciones evidentes con respecto a los valores de apoptosis de las células control, sin embargo, cuando se combinó con agentes quimioterapéuticos se mantuvieron los valores del ratio de apoptosis con respecto a los valores inducidos por los agentes quimioterapéuticos por sí mismos. La incubación durante 24 h con melatonina y P- μ causó un aumento de la apoptosis con respecto al P- μ por sí sólo ($P < 0,05$). En estas condiciones de proliferación mínima que induce el tratamiento conjunto de melatonina y P- μ , cuando se añadió un agente quimioterapéutico, sólo etopósido mostró un aumento adicional significativo en el ratio de células con morfología nuclear apoptótica ($P < 0,05$; Figura 49B).

Si observamos en conjunto los valores de proliferación, viabilidad y apoptosis, la inhibición de HSP70 en células de leucemia monocitaria aguda U-937 favorece el efecto antiproliferativo de melatonina en combinación con agentes quimioterapéuticos. Además, se aprecia una disminución de la actividad metabólica y aumento de la apoptosis. Estos resultados indican que los efectos de los agentes quimioterapéuticos son potenciados por la melatonina, la administración adicional de P- μ mantuvo al menos las mismas condiciones proapoptóticas en situación de mínima proliferación (Figura 49).

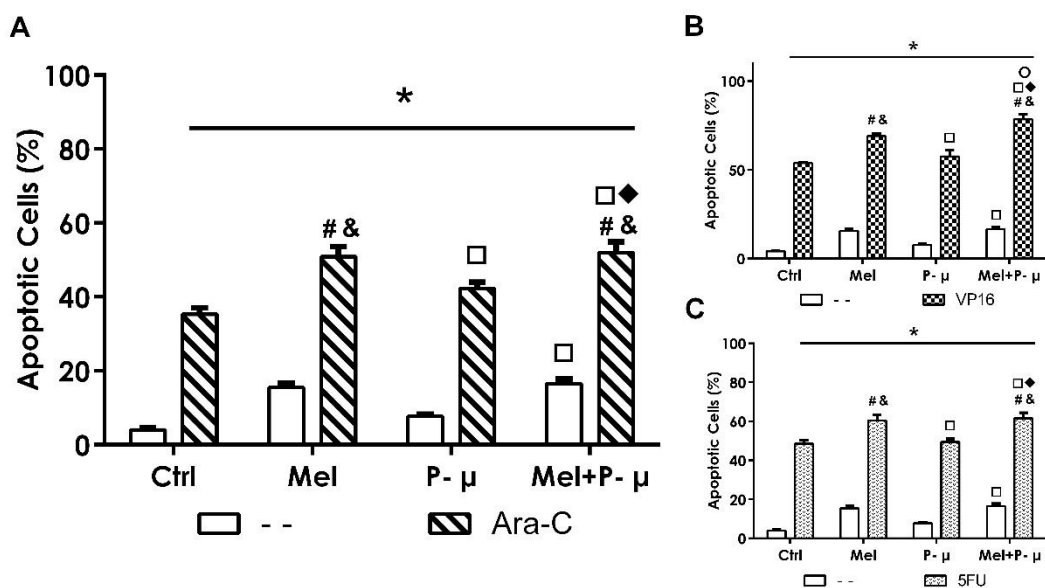


Figura 49. Papel de la HSP70 en la apoptosis de células U-937 tratadas con melatonina y agentes quimioterapéuticos. Las células se trataron 24 horas con 1 mM de melatonina (Mel), 1 μ M de pifithrin- μ (P- μ) o el vehículo (control, Ctrl). Los agentes quimioterapéuticos 50 μ M de citarabina (Ara-C), 50 μ M de etopósido (VP-16) y 1 mM de 5-fluorouracilo (5FU) se incubaron 4 horas antes de evaluar la morfología apoptótica. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, se visualizaron en un microscopio de fase de contraste Nikon Eclipse TS 100. El histograma muestra el porcentaje de células con morfología nuclear apoptótica (A) Morfología apoptótica en presencia de Ara-C, (B) Morfología apoptótica en presencia de VP-16 y (C) Morfología apoptótica en presencia de 5FU. Los valores se presentan como las medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina. $\square P < 0,05$ en comparación con los valores de pifithrin- μ . & $P < 0,05$ en comparación con los valores de quimioterapéutico. $\circ P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina + VP-16. $\blacklozenge P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina + P- μ .

De acuerdo con nuestros resultados previos, la melatonina potenció la capacidad antileucémica de los agentes quimioterapéuticos utilizados [435], disminuyendo la viabilidad celular y promoviendo la apoptosis. Esta capacidad potenciadora de los agentes quimioterapéuticos no la mostró el inhibidor de HSP70. P- μ tampoco incrementó la apoptosis cuando las células se trataron con la combinación de melatonina y agente quimioterapéutico (excepto en el caso de etopósido, Figura 49), sin embargo, sí disminuía la viabilidad celular por debajo de lo inducido por la combinación de melatonina y quimioterapéuticos (Figura 48). Este último efecto, probablemente sea debido a la gran capacidad citostática que presenta la melatonina sobre las células U-937 tratadas con el inhibidor de HSP70.

Aunque sea de manera transitoria, las células respondieron al estrés con un ligero aumento de los niveles de HSP70 (Figura 36, 37 y 42). Recientes estudios han indicado que la melatonina puede inhibir la resistencia generada por elevados niveles de HSP70 y HSP27 en células tumorales, pudiendo deberse a su actividad catalasa [456]. Existen evidencias que señalan una alteración redox como el inicio de la respuesta a estrés, elevando los niveles de HSP70 y HSP27. Debido a que la actividad catalasa de la melatonina impidió la elevación de HSP70 y HSP27, acentuando los efectos antileucémicos de la hipertermia [70].

La melatonina presenta actividad catalasa dentro de la célula, debido a su capacidad antioxidante neutraliza especies reactivas del oxígeno como el H_2O_2 , lo que normalmente se cumple en células no tumorales [457]. Sin embargo, una amplia literatura y nuestras evidencias experimentales indican que la melatonina presenta efectos prooxidantes tanto en células tumorales en general [433, 435], como en células leucémicas en particular [401, 458]. Por ello, hipotetizar que la melatonina mediante actividad catalasa evita la respuesta a estrés es una idea bastante controvertida y digna de ser estudiada. No obstante, permanece una coherencia entre nuestros resultados (Figura 41 y 42) y los de Beere y cols. en que la disminución de los niveles de HSP70 coinciden con una mayor activación de caspasas [459]. Es muy probable, que la bondad de la melatonina como agente potenciador o suplementario antileucémico radique en incidir en múltiples dianas dentro de célula tumoral [400]. Aunque aún se mantiene estudios de los mecanismos que utiliza la melatonina para impedir la respuesta a estrés en células leucémicas.

En resumen, el tratamiento combinado de agentes quimioterapéuticos y melatonina tiene una gran capacidad apoptogénica en células de leucemia monocitaria aguda U-937. Aunque esta capacidad de tratamiento combinado no se vea alterada por la inhibición de HSP70, sí favorece la quiescencia de células U-937 que presentasen resistencia a la apoptosis. Estos resultados instan a llevar a cabo la puesta a punto de tratamientos a largo plazo que conlleven una reducción progresiva del número de células viables. No obstante, la inhibición de HSP70 en el tratamiento combinado de melatonina y agentes quimioterapéuticos muestra efectos citostáticos y citotóxicos en células de leucemia U-937.

CAPÍTULO 5: PAPEL DE LA PROTEÍNA HSP90 EN LAS TERAPIAS COMBINADAS DE MELATONINA Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MONOCITARIA AGUDA U-937.

En condiciones normales, las células leucémicas sobreexpresan HSP90 como elemento de resistencia y evasión de la apoptosis [267]. El conocimiento de este hecho ha permitido situar a HSP90 en el punto de mira de ciertos tratamientos antileucémicos. No obstante, en ciertas ocasiones este tratamiento resulta inefectivo y las células muestran resistencia al mismo. Así, las terapias antitumorales combinadas cobran sentido porque abordan diversas dianas moleculares en el mismo momento y sobre el mismo sujeto. Estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación señalan la melatonina como un efectivo adyuvante en el tratamiento de células tumorales con agentes quimioterapéuticos [435]. Por ello, y conforme al estudio descrito en el Capítulo 4, nuestro objetivo ha sido estudiar los efectos de la inhibición de HSP90 en los tratamientos combinados de melatonina y agentes quimioterapéuticos clásicos como citarabina, etopósido y 5-fluorouracilo.

En primer lugar, evaluamos las condiciones de proliferación en las cuales se encontraban las células antes de adicionar los agentes quimioterapéuticos. Para ello, $0,5 \times 10^6$ células/mL se incubación durante 24 h con 1 mM melatonina y 500 nM 17-AAG, inhibidor de HSP90. Los recuentos en cámara de Neubauer muestran una duplicación de la población celular en este período, de acuerdo con la naturaleza de la línea celular U-937. De manera similar a los resultados del capítulo anterior, la melatonina disminuyó de manera estadísticamente significativa la concentración celular con respecto al control ($P < 0,05$; Figura 50). La inhibición de HSP90 por el 17-AAG durante 24 h también causó un descenso significativo de la proliferación, obteniéndose valores aproximados a la mitad del control ($P < 0,05$; Figura 50). Esto apunta hacia un bloqueo casi total de la proliferación celular, lo que concuerda con los valores expuestos en el Capítulo 2 (Figura 38), y donde la literatura sugiere que la proliferación celular sea muy dependiente de HSP90 [451]. Cuando las células U-937 se coincubaron durante 24 h con melatonina y 17-AAG se obtuvieron valores significativamente menores que con la melatonina por sí sola ($P < 0,05$), pero no diferentes a los de las células tratadas con 17-AAG. Esto indica que la inhibición de HSP90 es la causa principal del bloqueo de la proliferación cuando se tratan las células U-937 con melatonina y 17-AAG (Figura 50).

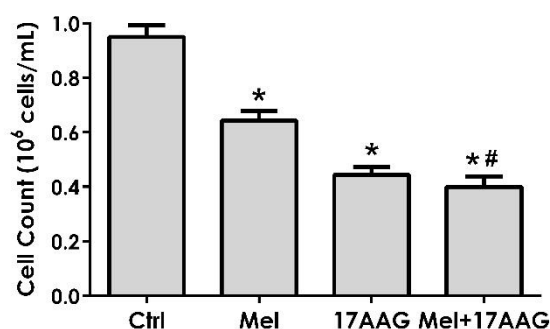


Figura 50. Papel de la inhibición de HSP90 en la proliferación de células U-937. Las células se trataron 24 h con 1 mM de melatonina (Mel), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl). La proliferación celular se evaluó tras 24 horas de incubación mediante cámara de Neubauer como se describe en Materiales y Métodos. Los valores del histograma se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina.

Para estudiar la participación de HSP90 sobre los efectos que el tratamiento combinado con melatonina y quimioterapéuticos tienen sobre las células U-937, llevamos a cabo la incubación de las células con 1 mM melatonina y 500 nM 17-AAG durante 24 h. Posteriormente, las células se incubaron durante 4 h con 50 μ M citarabina, 50 μ M etopósido y 1 mM 5-fluorouracilo. Los resultados indican que el tratamiento combinado de melatonina y quimioterapéuticos induce una disminución estadísticamente significativa comparada con la originada por dichos tratamientos de manera independiente ($P < 0,05$; Figura 51). En coherencia con los resultados de proliferación, la inhibición de HSP90 indujo una disminución de la viabilidad celular con respecto al control ($P < 0,05$; Figura 51). Estas células, en una situación de baja división y actividad metabólica inducida por 17-AAG, no sufrieron variaciones en sus valores de viabilidad celular cuando se les administró citarabina. Este efecto del tratamiento combinado (17-AAG + AraC) sobre la viabilidad celular es atribuible al inhibidor 17-AAG, ya que no se apreciaron diferencias significativas cuando el 17-AAG actuaba sobre las células por sí solo con respecto al combinado con este quimioterapéutico (Figura 51A).

Sorprendentemente, la combinación de melatonina y 17-AAG redujo de manera significativa los valores de viabilidad celular ($P < 0,05$; Figura 51A, séptima barra), incluso por debajo de los valores obtenidos en las células tratadas con 17-AAG y

citarabina ($P < 0,05$; Figura 51A, sexta barra). No se observaron variaciones en la viabilidad celular cuando las células se trataban con 17-AAG o con citarabina en presencia de melatonina (Figura 51A, cuarta vs séptima barra). Tampoco se apreciaron modificaciones de estos valores de viabilidad celular cuando se administró citarabina a las muestras incubadas con melatonina y 17-AAG. Igualmente, se analizó el efecto de agentes quimioterapéuticos etopósido y 5-fluorouracilo sobre la viabilidad celular de células U-937 tratadas el inhibidor de HSP90 y melatonina. Los resultados muestran un patrón similar, donde el tratamiento de inhibición de HSP90 tiene mayor respuesta ($P < 0,05$) sobre la viabilidad celular si se combina con melatonina que con etopósido o 5-fluorouracilo (Figura 51B y 51C). La adición de melatonina, y no los agentes quimioterapéuticos, fue capaz de conseguir un efecto adicional sobre la disminución de la viabilidad celular.

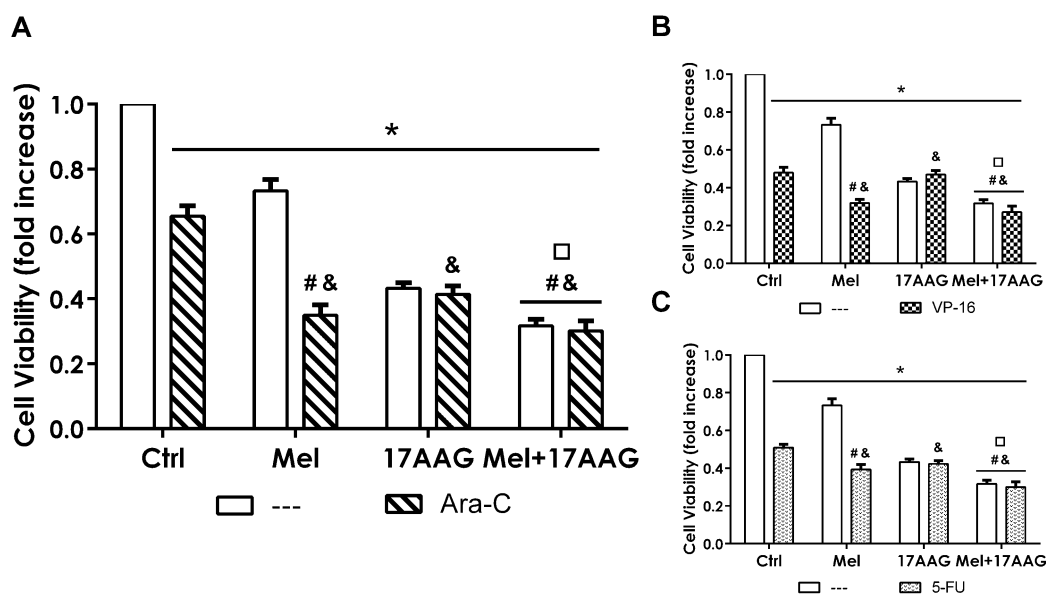


Figura 51. Papel de HSP90 en la viabilidad celular de células U-937 tratadas con melatonina y agentes quimioterapéuticos. Las células se trataron 24 horas con 1 mM de melatonina (Mel), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl). Los agentes quimioterapéuticos 50 μ M de citarabina (Ara-C), 50 μ M de etopósido (VP-16) y 1 mM 5-fluorouracilo (5FU) se incubaron 4 horas antes de evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. (A) Viabilidad celular en presencia de Ara-C, (B) Viabilidad celular en presencia de VP-16 y (C) Viabilidad celular en presencia de 5FU. Los valores se presentan como medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina. $\square P < 0,05$ en comparación con los valores de 17-AAG. & $P < 0,05$ en comparación con los valores de los quimioterapéuticos.

Para caracterizar los efectos antileucémicos que presentaban las diferentes combinaciones de tratamiento y tener mejor criterio en cuanto a la efectividad de los mismos en células U-937, llevamos a cabo la cuantificación del ratio de células que adoptan morfología nuclear apoptótica. Con las mismas condiciones experimentales que el ensayo anterior, es decir, incubación de las células con 1 mM melatonina y 500 nM 17-AAG (24 h), y posterior tratamiento con los agentes quimioterapéuticos 50 μ M citarabina, 50 μ M etopósido y 1 mM 5-fluorouracilo durante 4 h, se cuantificaron los porcentajes de células apoptóticas por microscopía.

Los resultados ponen de manifiesto un efecto proapoptótico aditivo cuando se combinan melatonina y los quimioterapéuticos, que resultó significativamente mayor que estos compuestos administrados de manera independientes ($P < 0,05$; Figura 52). Como ya se ha descrito en resultados anteriores, la inhibición de HSP90 induce un ligero aumento, aunque significativo ($P < 0,05$) en el ratio de células apoptóticas con respecto a los valores control. Interesantemente, y en concordancia con los resultados de viabilidad celular, no se apreció ningún efecto proapoptótico cuando las células se trataron con los quimioterapéuticos en presencia del inhibidor 17-AAG (Figura 52). El tratamiento combinado de melatonina y 17-AAG mostró un efecto apoptogénico significativamente mayor ($P < 0,05$) que el inducido por los quimioterapéuticos, en las mismas condiciones de inhibición de HSP90 (Figura 52). En condiciones de tratamiento con melatonina y 17-AAG, la adición del agente quimioterapéuticos no aportó un ulterior efecto observable en el ratio de células U-937 con morfología apoptótica (Figura 52). Los resultados también indican que el tratamiento con melatonina y 17-AAG es significativamente menos apoptogénico con respecto a la combinación de melatonina con cualquiera de los quimioterapéuticos ($P < 0,05$; Figura 52).

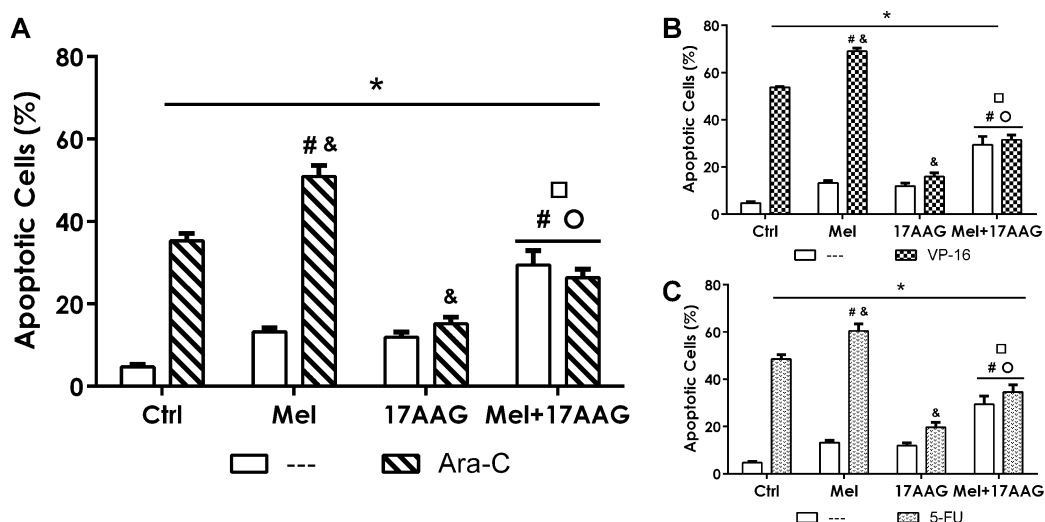


Figura 52. Papel de la HSP90 en la apoptosis de células U-937 tratadas con melatonina y agentes quimioterapéuticos. Las células se trataron 24 horas con 1 mM de melatonina (Mel), 500 nM de tanespimicina (17-AAG) o el vehículo (control, Ctrl). Los agentes quimioterapéuticos 50 μ M de citarabina (Ara-C), 50 μ M de etopósido (VP-16) y 1 mM de 5-fluorouracilo (5FU) se incubaron 4 horas antes de evaluar la morfología apoptótica. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342, se visualizaron en un microscopio de fase de contraste Nikon Eclipse TS 100. El histograma muestra el porcentaje de células con morfología nuclear apoptótica (A) Morfología apoptótica en presencia de Ara-C, (B) Morfología apoptótica en presencia de VP-16 y (C) Morfología apoptótica en presencia de 5FU. Los valores se presentan como las medias \pm SEM de 8 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con los valores de control. # $P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina. $\square P < 0,05$ en comparación con los valores de 17-AAG. & $P < 0,05$ en comparación con los valores de quimioterapéutico. $\circ P < 0,05$ en comparación con los valores de melatonina + quimioterapéutico.

Claramente, los agentes quimioterapéuticos utilizados no ejercen ningún efecto en las condiciones de baja proliferación causada por la inhibición de HSP90. Este resultado está enmarcado en un contexto celular de baja replicación de ADN, que representa la diana de estos y mucho de los agentes quimioterapéuticos utilizados tradicionalmente. Sin embargo, en el mismo contexto la melatonina ejerce una acción apoptogénica mayor, ya que sus dianas antitumorales son variadas [400].

La inhibición de HSP90 en el tratamiento de 24 h combinado de melatonina y agentes quimioterapéutico, no aportó efectividad adicional con respecto al uso de melatonina y 17-AAG en células U-937. Sin embargo, y dado que la apoptosis inducida es mayor si la melatonina se combina con quimioterapéuticos que con el inhibidor de HSP90, podríamos pensar que el tratamiento en el primer caso es potencialmente más efectivo. No obstante, debemos tener en cuenta que la inhibición de HSP90 causa un bloqueo casi total de la proliferación celular (Figura 50), y que la melatonina aporta a la

inhibición de HSP90 un potente efecto apoptogénico, ya que es capaz de inducir apoptosis sobre células leucémicas quiescentes. Aunque los valores de viabilidad celular (Figura 51) nos indican que no hay diferencias entre los tratamientos de melatonina con quimioterapéuticos y melatonina con 17-AAG a las 24 h, serían necesarios más estudios a tiempos más largos para ver el progreso de ambos tratamientos. De este modo se podría esclarecer cual de las combinaciones, melatonina con quimioterapéuticos o melatonina con 17-AAG, presentaría mayor proliferación tras varios días. Además, sería de gran interés estudiar cómo la melatonina hace frente a la quimioresistencia y efectos secundarios generados por 17-AAG o agentes quimioterapéuticos, y el papel que juegan en ello las proteínas HSP participantes en la “respuesta a estrés”.

V. DISCUSIÓN GENERAL

Entre las leucemias agudas, la leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo más común y el que causa una alta mortalidad, presentando gran heterogeneidad biológica y clínica [463]. La relevancia del pronóstico resulta determinante y, aunque se ha avanzado en la búsqueda de marcadores, un alto porcentaje de pacientes carece de una anomalía específica que permita detectarla, por lo que el uso de tratamientos efectivos contra ella resulta crucial [1]. Aunque en la mayoría de los pacientes se logra una remisión completa de la enfermedad muchos de ellos sufren recaídas debido a la resistencia a la quimioterapia. Debido a esto, evitar la quimiorresistencia en la leucemia se ha convertido en uno de los principales objetivos en la actualidad para las investigaciones en este campo [464]. La línea celular U-937 es una línea celular leucémica aislada a partir del linfoma histiocítico de un paciente masculino de 37 años, usándose tradicionalmente para estudiar el comportamiento y la diferenciación de los monocitos [460]. Las células U-937 proliferan en cultivo en suspensión suplementado y tienen una tasa de división celular de 24 horas. Pertenecen a la serie mieloide, por lo que en presencia de estímulos adecuados pueden madurar y diferenciarse, adoptando la morfología y las características de los macrófagos maduros [461].

Las células tumorales, tienen la capacidad de eludir los puntos de control celular mediante diversos mecanismos con el fin de evitar el proceso de apoptosis y mantener su supervivencia. En este sentido, las proteínas de choque térmico (HSP), constituyen uno de los sistemas universales más antiguos de respuesta a gran diversidad de situaciones de estrés [6]. De entre todos sus miembros, HSP90, HSP70 y HSP27 se sobreexpresan en condiciones de estrés, presencia de quimioterapéuticos, presencia de especies reactivas o irradiación, lo que los hace ser buenos marcadores [14, 95].

Los estudios de los últimos años, aunque escasos, apuntan al uso de inhibidores de HSP como posible tratamiento antitumoral, sobre todo de HSP90, cuya evaluación preclínica se encuentra fase II/III. Aunque la efectividad de los inhibidores a modo de monoterapia ha sido documentada, es la terapia combinada con agentes quimioterapéuticos la que mejores resultados ofrece hasta la fecha. El modo de actuación puede variar aunque generalmente se produce una acción sinérgica entre los compuestos [465, 466] que inicia diferentes acciones, como la degradación de proteínas involucradas en las principales características del cáncer [467] o transformar tumores no inmunogénicos para mejorar su reconocimiento por parte del sistema inmunológico [468, 469].

En esta Tesis doctoral hemos querido estudiar el papel que desempeñan las HSP más relevantes en el proceso de apoptosis de las células tumorales de LMA, HSP27, HSP70 y HSP90, utilizando como modelo la línea celular U-937. Para ello, hemos hecho uso de diversos estímulos como hipertermia, peróxido de hidrógeno, agentes quimioterapéuticos y melatonina, así como de inhibidores específicos de estas proteínas, que nos han permitido esclarecer su implicación en mecanismos de supervivencia y muerte.

HSP70 y HSP90 resultan indispensables para el normal desarrollo de las células tumorales. El uso de inhibidores específicos de HSP90 (GA y 17-AAG) tuvo un efecto citostático en células de leucemia U-937. Cuando el inhibidor se combinó con hipertermia, además ocasionaba un efecto apoptogénico. Sin embargo, la inhibición de HSP70 (P-μ) aunque no tuvo efecto citostático potenció la capacidad apoptótica de la hipertermia. Similares conclusiones fueron realizadas por Samali et al. [23], quienes además sostienen que ante leves estímulos estresantes (no apoptogénicos) las células pueden desarrollar una tolerancia inmediata al mismo, pudiendo incluso crear resistencia frente a posteriores insultos ambientales.

La hipertermia como herramienta terapéutica consiste en producir un calentamiento entre 41 °C y 45 °C, que cuando se combina con agentes quimioterapéuticos se denomina termoquimioterapia [470]. Se ha visto que la hipertermia incrementa la sensibilidad del tumor a los agentes quimioterapéuticos [471] y actúa como adyuvante de la quimioterapia fomentando su acumulación en los tejidos tumorales [472]. Con objeto de ampliar la información obtenida en nuestro primer objetivo sobre la respuesta celular de la línea U-937 al estrés, y así comparar su comportamiento con respecto al HS por sí solo, decidimos utilizar terapias combinadas de hipertermia con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como molécula inductora de estrés oxidativo; y, con etopósido y citarabina como quimioterapéuticos [319]. En esta Tesis hemos utilizado una terapia citotóxica, consistente en administrar una única y elevada dosis de quimioterapéutico, como sugiere el grupo de Ghibelli [453], desencadenando en células leucémicas una respuesta celular a la citotoxicidad producida por el compuesto y promoviendo una rápida activación de la apoptosis [453, 462]. Asimismo, podemos observar que el tratamiento con hipertemia no modificaba la capacidad antileucémica de los quimioterapéuticos empleados o del peróxido de hidrógeno en células de leucemia monocitaria aguda U-937, sino que además parece actuar como

mecanismo protector frente a los efectos tóxicos secundarios que presentan los tratamientos antileucémicos, haciendo del HS un aliado eficaz en el uso de terapias combinadas como se describía al inicio de este párrafo.

Más allá de los roles fisiológicos habituales que desempeña la melatonina, esta indolamina tiene la capacidad de modular el proceso de apoptosis [473], destacando su acción dual como agente antioxidante, antiinflamatorio y “optimizador” del funcionamiento de la mitocondria en células no tumorales [474], que contrasta con su acción citotóxica en células tumorales, donde tiene efectos pro-apoptóticos y antiproliferativos [475, 476]. Durante los tratamientos contra el cáncer, la aplicación de la mayoría de agentes quimioterapéuticos o radiación inducen un aumento de la producción de ERO, con el consecuente daño celular y tisular. La terapia combinada de los agentes quimioterapéuticos con melatonina, actúa de forma sinérgica induciendo apoptosis en las células tumorales mientras que protege a las células sanas contra los efectos nocivos de estas terapias [405]. Además, la melatonina induce arresto del ciclo celular en las células tumorales [404]. Nuestros resultados muestran que el tratamiento combinado de agentes quimioterapéuticos y melatonina tiene una gran capacidad apoptogénica y antiproliferativa en células de leucemia monocitaria aguda U-937. Esta capacidad de tratamiento combinado no se ve afectada por la inhibición de HSP70 o HSP90. Además, cuando se aplicó monoterapia con melatonina ésta consiguió inducir apoptosis en células leucémicas quiescentes. Teniendo en cuenta estas evidencias, junto con la literatura ya existente, podría considerarse este tipo de terapias combinadas con melatonina para aumentar la tolerancia del paciente a una concentración mayor del agente anticancerígeno, aumentando así la efectividad del tratamiento y disminuyendo los efectos secundarios.

La complejidad de las vías moleculares utilizadas por las células tumorales para evadir la apoptosis, junto con la diversidad que presenta el desarrollo tumoral en cada paciente, suponen un desafío a la hora de encontrar características comunes que permitan diseñar tratamientos efectivos. El uso de monoterapias habituales que utilizan una única diana para combatir las células tumorales ha terminado por generar resistencia en las mismas, por lo que se hace necesario desarrollar nuevas terapias más efectivas. Las proteínas de estrés o HSP, se presentan como una estrategia transversal de supervivencia a tener en cuenta entre diferentes tipos de células tumorales. El uso de nuevas terapias combinadas permite abordar este problema desde varias perspectivas;

terapias sensibilizadoras a otras terapias, como la inhibición de HSP70; sinérgicas, como la inhibición de HSP90; protectoras, como la hipertermia; o bien, combinar todas estas acciones mediante el uso de melatonina. Si bien son necesarios muchos más estudios que arrojen luz a este tipo de terapias combinadas, nuestro estudio nos acerca a contar con medios más eficaces y/o menos agresivos para combatir la LMA.

VI. CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado terapias combinadas antileucémicas basándonos en el papel esencial desempeñado por las HSP en la célula tumoral, utilizando como modelo las células de leucemia monocitaria aguda U-937. En virtud de los resultados obtenidos podemos realizar las siguientes conclusiones:

1. La inhibición de HSP70 termosensibiliza las células de leucemia monocitaria aguda U-937, disminuye los niveles de HSP70 y HSP90, y favorece el proceso de apoptosis.
2. La inhibición de HSP90 interrumpe drásticamente la proliferación celular de células de leucemia monocitaria aguda U-937 aunque no altera los efectos proapoptóticos de un tratamiento de hipertermia posterior. Es decir, el uso combinado de inhibidores de HSP90 e hipertermia compagina un efecto citostático y apoptogénico en células de leucemia U-937.
3. El tratamiento de hipertemia no modifica la capacidad antileucémica de los quimioterapéuticos citarabina, etopósido o de agentes oxidantes en células de leucemia monocitaria aguda U-937, además actúa como mecanismo protector frente a los efectos tóxicos secundarios que presentan los tratamientos antileucémicos.
4. El tratamiento combinado de agentes quimioterapéuticos y melatonina tiene una gran capacidad apoptogénica en células de leucemia monocitaria aguda U-937. Aunque esta capacidad de tratamiento combinado no se ve alterada por la inhibición de HSP70, sí que favorece la quiescencia de células U-937 que presentan resistencia a la apoptosis.
5. La inhibición de HSP90 disminuye drásticamente la proliferación de las células U-937 y hace que los agentes quimioterapéuticos que interfieren en la replicación del ADN no ejerzan su acción antitumoral. Esto no ocurre en el caso de la melatonina, que sí consigue inducir apoptosis en células leucémicas quiescentes. Por tanto, el tratamiento combinado de melatonina e inhibición de HSP90 muestra efectos antiproliferativos y proapoptóticos en células de leucemia monocitaria aguda U-937.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1079-89.
- [2] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114:937-51.
- [3] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127:2391-405.
- [4] De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J* 2016; 6:e441.
- [5] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:463-99.
- [6] Carper SW, Duffy JJ, Gerner EW. Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. *Cancer Res* 1987; 47:5249-55.
- [7] Gupta RS, Golding GB. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J Mol Evol* 1993; 37:573-82.
- [8] Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993; 27:437-96.
- [9] Singh IS, Hasday JD. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia* 2013; 29:423-35.

- [10] Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18:571-3.
- [11] Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; 84:389-98.
- [12] Almeida MB, do Nascimento JL, Herculano AM, Crespo-López ME. Molecular chaperones: toward new therapeutic tools. *Biomed Pharmacother* 2011; 65:239-43.
- [13] Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:505–12.
- [14] Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: antiapoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006; 5:2592–601.
- [15] Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* 2010; 40:253-66.
- [16] Ulrich Hartl F. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381:571-80.
- [17] Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 1998; 379:245-59.
- [18] Nathan DF, Lindquist S. Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol. Cell. Biol* 1995; 15:3917-25.
- [19] Koyasu S, Nishida E, Kadowaki T, Matsuzaki F, Iida K, Harada F et al. Two mammalian heat shock proteins, Hsp90 and Hsp100 are actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8054-58.
- [20] Dokladny K, Myers OB, Moseley PL. Heat shock response and autophagy cooperation and control. *Autophagy* 2015; 11:200-13.

- [21] Milarski KL, Morimoto RI. Expression of human hsp70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:9517-21.
- [22] Morano KA, Thiele DJ. Heat shock function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expr* 1999; 7:271-82.
- [23] Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3:228-36
- [24] Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12:743-61.
- [25] Udono H, Ichiyanagi T, Mizukami S, Imai T. Heat shock proteins in antigen trafficking-implications on antigen presentation to T cells. *Int J Hyperthermia* 2009; 25:617-25.
- [26] Garrido C, Paul , Seigneuric R, Kampinga HH. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44:1588-92.
- [27] Klemenz R, Andres AC, Fröhli E, Schäfer R, Aoyama A. Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and α B crystallin in the absence of stress. *J Cell Biol* 1993; 120:639-45.
- [28] Li D, Gordon C, Stagg C, Udelsman R. Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord. *Shock* 1996; 5:320-3.
- [29] Gangalum RK, Horwitz J, Kohan SA, Bhat SP. α A-crystallin and α B-crystallin reside in separate subcellular compartments in the developing ocular lens. *J Biol Chem* 2012; 287:42407-16.
- [30] Leach IH, Tsang ML, Church RJ, Lowe J. Alpha-B crystalline in the normal human myocardium and cardiac conducting system. *J Pathol* 1994; 173:255-60.
- [31] Van de Klundert F, Gijsen M, van del Ijssel P, Snoeckx L, de Jong W. Alpha B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 1998; 75:38-45.

- [32] Miron T, Vancompernelle K, Vanderkerckhove J, Wilchek M, Geiger B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biol* 1991; 114:255-61.
- [33] Garrido C. Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ* 2002; 9:483-5.
- [34] Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:23463-71.
- [35] Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274:18947–56.
- [36] Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E et al. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* 2000; 19:4855-63.
- [37] Benjamin I, McMillan DR. Stress (Heat shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1998; 83:117-32.
- [38] Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet* 2014; 5:346.
- [39] Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today* 1996; 9:372-80.
- [40] Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry* 2002; 67:511–9.

- [41] Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJ, Konings AW, Landry J. Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204:1170-7.
- [42] Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* 1997; 16:221-9.
- [43] Shakoori AR, Oberdorf AM, Owen TA, Weber LA, Hickey E, Stein JL et al. Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 1992; 48:277-87.
- [44] Chaufour S, Mehlen P, Arrigo AP. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:225-35.
- [45] Ciocca D, Oesterreich S, Chamness G, McGuire W, Fuqua S. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp 27): a Review. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1558-70.
- [46] Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins RM. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress & Chaperones* 2003; 8:329-34.
- [47] Hopper CP, Meinel L, Steiger C, Otterbein LE (2018). Where is the Clinical Breakthrough of Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide Therapeutics?. *Current Pharmaceutical Design* 2018; 24:2264-82.
- [48] Abrahm NG, Pinto A, Levere RD, Mullane K. Identification of heme oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1987; 19:73-81

- [49] Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. A review on hemoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014; 2014:604981.
- [50] Elbirt K, Bonkovsky H. Heme Oxygenase: Recent Advances in Understanding Its Regulation and Role. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999; 111:438-47.
- [51] Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and molecular life sciences* 2006; 63:2560-70.
- [52] Song L, Zhang J, Li C, Yao J, Jiang C, Li Y et al. Genome-wide identification of hsp40 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. *PLoS One* 2014; 9:e115752.
- [53] Martinez-Yamout M, Legge GB, Zhang O, Wright PE, Dyson HJ. Solution Structure of the Cysteine-rich Domain of the Escherichia coli Chaperone Protein DnaJ. *Journal of Molecular Biology* 2000; 300:805-18.
- [54] Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J. Biol. Chem* 1996; 271:19617-24.
- [55] Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381:571-79.
- [56] Hasegawa T, Yoshida S, Sugeno N, Kobayashi J, Aoki M. Dna J/ Hsp40 Family and Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 2018; 11:743.
- [57] Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem Sci.* 1996; 21:22-26.

- [58] Dafforn TR, Della M, Miller AD. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:49310-9.
- [59] Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47 (Serpine H1), a collagen-specific molecular chaperone. *Semin Cell Dev Biol* 2017; 62:142-51.
- [60] Rocnik E, Chow LH, Pickering JG. Heat Shock Protein 47 Is Expressed in Fibrous Regions of Human Atheroma and Is Regulated by Growth Factors and Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circulation* 2000; 101:1229-33.
- [61] Morimo M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, et al. Specific expression of Hsp47 in human tumor cell lines in vitro. *In vivo* 1997; 11:17-21.
- [62] Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Shirakami T, Yoshimura M, Kiyosuke Y et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur. J. Biochem* 2002; 269:5931-8.
- [63] Ricci C, Carrotta R, Rappa GC, Mangione MR, Librizzi F, San Biagio PL et al. Investigation on different chemical stability of mitochondrial Hsp60 and its precursor. *Biophys Chem* 2017; 229:31-8.
- [64] Ranford JC, Coates AR, Henderson B. Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2:1-17.
- [65] Okamoto T, Yamamoto H, Kudo I, Matsumoto K, Odaka M, Grave E et al. HSP60 possesses a GTPase activity and mediates protein folding with HSP10. *Sci Rep* 2017; 7:16931.
- [66] Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL (November 1990). The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 1990; 348:455-8.

- [67] Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:23-8.
- [68] Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell* 1993; 4:555-63.
- [69] Mayer MP. Gymnastics of Molecular Chaperones. *Mol Cell* 2010; 39:321-31.
- [70] Flaherty KM, Deluca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70kDa heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346:623-28.
- [71] Wang TF, Chang JH, Wang C. Identification of the peptide binding domain of hsc70-18kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J. Biol. Chem* 1993; 268:26049-51.
- [72] Leung SM, Hightower LE. Mammalian Hsc70 and Hsp70 proteins. En: Gething, MJ (ed.) Oxford University Press, Sambrook & Tooze Imprint. Oxford: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysis; 1997. pp. 52-8.
- [73] Fernández-Fernández MR, Valpuesta, JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000Research* 2018; 7:1497.
- [74] McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, Bukau B. The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* 1995; 249:126-37.
- [75] Takayama S, Reed JC. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* 2001; 3:237-41.
- [76] Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 1995; 83:589-98.

- [77] Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H et al. Structure of TPR domain-peptide complex: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 2000; 101:199-210.
- [78] Nikolay R, Wiederkehr T, Rist W, Kramer G, Mayer MP, Bukau B. Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J. Biol. Chem* 2004; 279:2673-78.
- [79] Mashaghi A, Bezrukavnikov S, Minde DP, Wentink AS, Kityk R, Zachmann-Brand B et al. Alternative modes of client binding enable functional plasticity of Hsp70. *Nature* 2016; 539:448-51.
- [80] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295:1852-58.
- [81] Ryan MT, Pfanner N. Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv. Protein Chem* 2002; 59:223-42.
- [82] Wickner S, Hoskins J, McKenney K. Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:7903-07.
- [83] Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med* 1999; 31:261-71.
- [84] Craig EA, Kramer J, Kosic-Smithers J. SSC1, a member of the 70-kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 80:4156-60.
- [85] Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004; 1:274-79.
- [86] Giffard RG, Yenari MA. Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004; 16:53-61.

- [87] Franco L, Terrinca J, Rodríguez AB, Espino J, Pariente JA. Extracellular heat shock proteins protect U937 cells from H₂O₂-induced apoptotic cell death. *Mol Cell Biochem* 2016; 412:19-26.
- [88] Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ. Hsp70 reduces alfa-synuclein aggregation and toxicity. *J. Biol. Chem* 2004; 279:25497-502.
- [89] Zhang G, Brunham RC. Antigenic analysis of the chlamydial 75-kilodalton protein. *Infect. Immun* 1992; 60:323-28.
- [90] Roberts SP, Feder ME. Natural hyperthermia and expression of the heat shock Hsp70 affect developmental abnormalities in *Drosophila melanogaster*. *Oecologia* 1999; 121:323-9.
- [91] Njemini R, Abeele MV, Demanet C, Lambert M, Vandebosch S, Mets T. Age-related decrease in the inducibility of heat-shock protein 70 in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Immunol* 2002; 22:195-205.
- [92] Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM. The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Natl. Cell Biol* 2001; 3:100-5.
- [93] Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* 2017; 18 pii: E1978.
- [94] Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998; 79:129-68.
- [95] Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW, Watson DK et al. The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem* 2002; 277:8312-20.

- [96] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997; 89:239-50.
- [97] Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 1997; 90:65-75.
- [98] Young JC, Obermann WM, Hartl FU. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem* 1998; 273:18007-10.
- [99] Söti C, Rácz A, Csermely P. A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmasks a C-terminal binding pocket. *J. Biol. Chem* 2002; 277:7066-75.
- [100] Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998; 94:471-80.
- [101] Panner A, Murray JC, Berger MS, Pieper RO. Heat shock protein 90alpha recruits FLIPS to the death-inducing signaling complex and contributes to TRAIL resistance in glioma. *Cancer Res* 2007; 67:9482-9.
- [102] Pratt WB. The role of the Hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:297-326.
- [103] Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 2004; 40:41-58.
- [104] Davies TH, Ning YM, Sánchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 2002; 277:4597-600.
- [105] Lurje G, Lenz HJ. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* 2009; 77:400-10.

- [106] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997; 89:239-50.
- [107] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci* 2006; 31:164-72.
- [108] Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N et al. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res* 2002; 90:866-73.
- [109] Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat. Cell Biol* 2004; 6:507-14.
- [110] Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 1994; 372:475-78.
- [111] Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subject JR. Identification of a Major Subfamily of Large hsp70-like Proteins through the Cloning of the Mammalian 110-kDa Heat Shock Protein. *J. Biol. Chem* 1995; 270:15725-33.
- [112] Oh HJ, Easton D, Murawski M, Kaneko Y, Subject JR. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem* 1999; 274:15712-8.
- [113] Shaner L, Wegele H, Buchner J, Morano KA. The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J. Biol. Chem* 2005; 280:41262-9.
- [114] Schuermann JP, Jiang J, Cuellar J, Llorca O, Wang L, Gimenez LE et al. Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine. *Mol Cell* 2008; 31:232-43.
- [115] Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259:1409-10.

- [116] Abravaya K, Phillips B, Morimoto RI. Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factor and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol. Cell. Biol* 1991; 11:586-92.
- [117] Wu C. Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of heat-shock genes. *Nature* 1984; 309:229-34.
- [118] Harrison CJ, Bohm AA, Nelson HC. Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 1994; 263:224-7.
- [119] Sarge KD, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev* 1991; 5:1902-11.
- [120] Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002; 92:2177-86.
- [121] Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1991; 88:6906-10.
- [122] Mivechi NF, Murai T, Hahn GM. Inhibitors of tyrosine and ser/thr phosphatases regulate the heat shock response. *J Cell Biochem* 1994; 54:186-97.
- [123] Kim J, Nueda A, Meng YH, Dynan WS, Mivechi NF. Analysis of the Phosphorylation of Human Heat Shock Transcription Factor-1 by MAP kinase Family Members. *J. Cell. Biochem* 1997; 67:43-54.
- [124] Sistonen L, Sarge KD, Phillips B, Abravaya K, Morimoto RI. Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol* 1992; 12:4104-11.
- [125] Tanebe M, Kawazoe Y, Takeda S, Morimoto RI, Nagata K, Nakai A. Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J* 1998; 17:1750-8.
- [126] Nakai A, Tanebe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks peptides of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol* 1997; 17:469-81.

- [127] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- [128] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407:796-801.
- [129] Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:267-93.
- [130] Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53:451-65.
- [131] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
- [132] Yurinskaya V, Aksenov N, Moshkov A, Model M, Goryachaya T, Vereninov A. A comparative study of U937 cell size changes during apoptosis initiation by flow cytometry, light scattering, water assay and electronic sizing. *Apoptosis* 2017; 22:1287-95.
- [133] Rösl F. A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acid Res* 1992; 20:5243.
- [134] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
- [135] Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:95-113.
- [136] Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31:214-23.
- [137] Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M et al. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 1995; 21:275-83.

- [138] Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276:1071-7.
- [139] López JJ, Salido GM, Gómez-Arteta E, Rosado JA, Pariente JA. Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J Thromb Haemost.* 2007; 5:1283-91.
- [140] McConkey DJ, Nicotera P, Hatzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269:365-70.
- [141] Endersen PC, Prytz PS, Aarbakke J. A new flow cytometric method for discrimination of apoptotic cells and detection of their cell cycle specificity through staining of F-actin and DNA. *Cytometry* 1995; 20:162-71.
- [142] Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005; 37:719-27.
- [143] Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87:171.
- [144] Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002; 102:4489-500.
- [145] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22:8590-607.
- [146] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-6.
- [147] Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:20049-52.

- [148] Lavrik IN, Krammer PH. Life and death decisions in the CD95 system: Main pro- and anti-apoptotic modulators. *Acta Naturae* 2009; 1:80-3.
- [149] Yuan CQ, Ding ZH. Structure and function of caspases. *Guowai Yixue Fenzi Shengwuxue Fence* 2002; 24:146-51.
- [150] Krajewska M, Kim H, Shin E, Kennedy S, Duffy MJ, Wong YF et al. Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5462-71.
- [151] Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 1996; 3:619-25.
- [152] Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2239-44.
- [153] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Cell Biol* 2010; 11:621-32.
- [154] Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91:443-6.
- [155] Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:279-88.
- [156] Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R. The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 926:52-63.
- [157] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281:1305-8.

- [158] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:725-31.
- [159] Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:532-42.
- [160] Hu Y, Ding L, Spencer DM, Núñez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998; 273:33489-94.
- [161] Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to apaf-1. *J Biol Chem* 2000; 275:31199-203.
- [162] Shi Y. Apoptosome: The cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 2002; 10:285-8.
- [163] Fan TJ, Xia L, Han YR. Mitochondrion and Apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao* 2001; 33:7-12.
- [164] Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 2003; 22:4385-99.
- [165] Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:405-13.
- [166] Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005; 28:670-6.
- [167] Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett* 2006 11:488-505.
- [168] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006 7:880-5.

[169] Rosado JA, López JJ, Gomez-Arteta E, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA. Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. *J Cell Physiol* 2006; 209:142-52.

[170] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626-9.

[171] Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 2003; 9:196-205.

[172] Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005; 310:66-7.

[173] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341:233-49.

[174] Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 2007; 9:550-5.

[175] Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J* 2009; 276:6063-73.

[176] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-6.

[177] Vaux DL, Silke J. HtrA2/Omi, a sheep in wolf's clothing. *Cell* 2003; 115:251-3.

[178] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:139-63.

- [179] Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* 2010; 9:135.
- [180] Hetz CA. ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9:2345-55.
- [181] Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18:716-31.
- [182] Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; 18:3066-77.
- [183] Yao H, Guo L, Jiang BH, Luo J, Shi X. Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008; 27:77-88.
- [184] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70:200-14.
- [185] Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol* 1999; 188:203-55.
- [186] Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA. Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 2002; 39:191-207.
- [187] Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995; 82-83:969-74.
- [188] Kutschera U, Niklas KJ. Metabolic scaling theory in plant biology and the three oxygen paradoxa of aerobic life. *Theory Biosci* 2013; 132:277-88.
- [189] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: 1424-37.

- [190] Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:222-30.
- [191] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; 80:780-7.
- [192] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:7915-22.
- [193] Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria *Cell Death Differ*. 2007; 14:1243-7.
- [194] Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6:389-402.
- [195] Hall RE, Henriksson KG, Lewis SF, Haller RG, Kennaway NG. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* 1993; 92:2660-66.
- [196] Morgado S, Granados MP, Bejarano I, López JJ, Salido GM, González A, Pariente J.A. Role of intracellular calcium on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pancreatic acinar AR42J cells. *J Appl Biomed* 2008; 6:215-28.
- [197] Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, García JF, Paredes SD, Rodríguez AB, Pariente JA. Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertil Steril* 2008; 90:1340-7.
- [198] González D, Bejarano I, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Oxidative stress-induced caspases are regulated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Curr Signal Transduc Therapy* 2010; 5:181-6.
- [199] Nishimura S, Saeki H, Nakanoko T, Kasagi Y, Tsuda Y, Zaitu Y et al. Hyperthermia combined with chemotherapy for patients with residual or recurrent

oesophageal cancer after definitive chemoradiotherapy. *Anticancer Res* 2015; 35:2299-303.

[200] Shen J, Hughes C, Chao C, Cai J, Bartels C, Gessner T et al. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:3278-82.

[201] Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:647-56.

[202] Yamamoto T, Manome Y, Nakamura M, Tanigawa N. Down-regulation of surviving expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:2316-24.

[203] Yamauchi H, Adachi M, Sakata K, Hareyama M, Satoh M, Himi T et al. Nuclear BAG-1 localization and the risk of recurrence after radiation therapy in laryngeal carcinomas. *Cancer Lett* 2001; 165:103-10.

[204] Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 2003; 22:9041-47.

[205] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Res Inst* 2000; 92:1564-72.

[206] Duval A, Olaru D, Campos L, Flandrin P, Nadal N, Guyotat D. Expression and prognostic significance of heat-shock proteins in myelodysplastic syndromes. *Hematologica* 2006; 91:713-4.

[207] Tomkova K, Tomka M, Zajac V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma* 2008; 55:177-81.

[208] Thompson EB. The many roles of c-Myc apoptosis. *Annu Ver. Physiol* 1998; 60:575-600.

- [209] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006; 25:4798-811.
- [210] Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, Kappo AP. Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 11 pii: E2.
- [211] Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer* 1998; 79:468-75.
- [212] Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabindran SK et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am. J. Pathol* 2000; 156:857-64.
- [213] Carper SW, Rocheleau TA, Cimino D, Storm FK. Heat shock protein 27 stimulates recovery of RNA and protein synthesis following a heat shock. *J Cell Biochem* 1997; 66:153-64.
- [214] Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Molecular and Cellular Biology* 1997; 17:1595-606.
- [215] Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y et al. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Lett* 1997; 410:493-98.
- [216] Kluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132-36.

- [217] Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2000; 2:645-52.
- [218] Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expr* 2001; 9:195-201.
- [219] Concannon CG, Gorman AM, Samali A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8:61-70.
- [220] Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 1995; 154:363-74.
- [221] Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF alpha induced cell death. *EMBO J* 1996; 15:2695-706.
- [222] Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53:4443-8.
- [223] Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF et al. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1603-9.
- [224] Garrido C, Arrigo AP, Solary E. HSP27: A small heat shock protein with protective and tumorigenic effects. *Rec. Res. Dev. Cancer* 2000; 2:105-14.

[225] Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP et al. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58:5495-9.

[226] Cornforf PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60:7099-105.

[227] Baylot V, Andrieu C, Katsogiannou M, Taieb D, Garcia S, Giusiano S et al. OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* 2011; 2:e221.

[228] Spector NL, Ryan C, Samson W, Levine H, Nadler LM, Arrigo AP. Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL-60 cells. *J Cell Physiol* 1993; 156:619-25.

[229] Katoh M, Koninkx J, Schumacher U. Heat shock protein expression in human tumours grown in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Lett* 2000; 161:113-20.

[230] Keezer SM, Ivie SE, Krutzsch HC, Tandle A, Libutti SK, Roberts DD. Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock proteins 27 and cofilin. *Cancer Res* 2003; 63:6405-12.

[231] Arrigo AP, Gibert B. HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers (Basel)* 2014; 6:333-65.

[232] Bausero MA, Bharti A, Page DT, Perez KD, Eng JW, Ordonez SL et al. Silencing the hsp25 gene eliminates migration capability of the highly metastatic murine 4T1 breast adenocarcinoma cell. *Tumour Biol* 2006; 27:17-26.

[233] Kamada M, So A, Muramaki M, Rocchi P, Beraldi E, Gleave M. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells. *Mol. Cancer Ther* 2007; 6:299-308.

- [234] Hsu, HS, Lin JH, Huang WC, Hsu TW, Su K, Chiou SH, et al. Chemoresistance of lung cancer stemlike cells depends on activation of Hsp27. *Cancer* 2011; 117:1516-28.
- [235] Pelechano V, Pérez-Ortín JE. The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast* 2008; 25:85-92.
- [236] Jia Y, Wu SL, Isenberg JS, Dai S, Sipes JM, Field L et al. Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15: 165-81.
- [237] Minamiguchi K, Kumagai H, Masuda T, Kawada M, Ishizuka M, Takeuchi T. Thiolutin, an inhibitor of HUVEC adhesion to vitronectin, reduces paxillin in HUVECs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 2001; 93:307-16.
- [238] Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of bim-related members of the Bcl2 family induces bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 2003; 100:2432-7.
- [239] Zyllicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J.* 2001; 20:4634-89.
- [240] Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J. Exp. Med* 2004; 200:425-35.
- [241] Yang J, Hong Y, Wang W, Wu W, Chi Y, Zong H et al. HSP70 protects BCL2L12 and BCL2L12A from N-terminal ubiquitination-mediated proteasomal degradation. *FEBS Lett* 2009; 583:1409-14.
- [242] Creagh EM, Carmody RJ, Cotter TG. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res* 2000; 257:58-66.

- [243] Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H et al. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev* 2004; 18:1466-81.
- [244] Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem* 2010; 53:4585-602.
- [245] Volloch V, Gabai VL, Rits S, Sherman MY. ATPase activity of the heat shock protein hsp72 is dispensable for its effects on dephosphorylation of stress kinase JNK and on heat-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1999; 461:73-6.
- [246] Powers MV, Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle* 2009; 8:518-26.
- [247] Calderwood SK, Theriault JR, Gong J. Message is a bottle: role of the 70 kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur. J. Immunol* 2005; 35:2518-27.
- [248] Volloch VZ, Sherman MY. Oncogenic potential of Hsp72. *Oncogene* 1999; 18:3648-51.
- [249] Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T et al. Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev* 1998; 22:549-55.
- [250] Köhler G, Veelken H, Rosenthal F, Mackensen A, Lindemann A, Schaefer HE et al. Oncogene and HSP-70 expression in primary tumor cell cultures of renal cell carcinoma compared to their corresponding cell line. *Anticancer Res* 1997; 17:3225-31.
- [251] Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M et al. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res* 2002; 62:7139-42.

- [252] Ralham R, Kaur J. Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res* 1995;1:1217-22.
- [253] Stangl S, Gehrman M, Dressel R, Alves F, Dullin C, Themelis G, et al. In vivo imaging of CT26 mouse tumours by using cmHsp70.1 monoclonal antibody. *J. Cell Mol. Med* 2011; 15:874-87.
- [254] Powers MV, Jones K, Barillari C, Westwood I, van Montfort RL, Workman P. Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell Cycle* 2010; 9:1542-50.
- [255] Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, Daniels Z, Dokurno P, Drysdale MJ et al. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J. Med. Chem* 2009; 52:1510-13.
- [256] Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* 2008; 269:269-80.
- [257] Williams DR, Ko SK, Park S, Lee MR, Shin I. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. *Angew. Chem. Int. Ed Engl* 2008; 47:7466-9.
- [258] Otvos L Jr, O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 2000; 39:14150-9.
- [259] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787:414-20.
- [260] Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I et al. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol* 2006; 2:474-9.

- [261] Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol. Cell* 2009; 36:15-27.
- [262] Balaburski GM, Leu JI, Beeharry N, Hayik S, Andrade MD, Zhang G et al. A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent. *Mol. Cancer Res* 2013; 11:219-29.
- [263] French JB, Zhao H, An S, Niessen S, Deng Y, Cravatt BF et al. Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2013; 110:2528-33.
- [264] Pratt WB, Toft, DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 2003; 228:111-33.
- [265] Rutherford SL, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 1998; 396:336-42.
- [266] Sun J, Liao JK. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2004; 24:2238-44.
- [267] Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med.* 2004; 82:488-99.
- [268] Cardone MH, Roy N, Sennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282:1318-21.
- [269] Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:10832-37.
- [270] Jameel A, Skilton RA, Campbell TA, Chander SK, Coomers RC, Luqmani YA. Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 50:409-15.

- [271] Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5:921-29.
- [272] Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997; 273:L1-L9
- [273] Yufu Y, Nishimura J, Nawata H. High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human acute leukemia cells. *Leuk Res* 1992; 16:597-605.
- [274] Akalin A, Elmore LW, Forsythe HL, Amaker BA, McCollum ED, Nelson PS et al. A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase during prostate cancer progression. *Cancer Res* 2001; 61:4791-96.
- [275] Ogata M, Naito Z, Tanaka S, Moriyama Y, Asano G. Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch* 2000; 67:177-85.
- [276] Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 2000; 19:4310-22.
- [277] Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L et al. Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 2000; 275:10519-26.
- [278] Kim YS, Alarcon SV, Lee S, Lee MJ, Giaccone G, Neckers L et al. Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr Top Med Chem.* 2009; 9:1479-92.
- [279] Porter JR, Fritz CC, Depew KM. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Curr Opin Chem Biol* 2010; 14:412-20.

- [280] Shimada Y, Ogawa T, Sato A, Kaneko I, Tsujita Y. Induction of differentiation of HL-60 cells by the anti-fungal antibiotic, radicicol. *J Antibiot (Tokyo)* 1995; 48:824-30.
- [281] Zhao JF, Nakano H, Sharma S. Suppression of RAS and MOS transformation by radicicol. *Oncogene* 1995; 11:161-73.
- [282] Chanmugam P, Feng L, Liou S, Jang BC, Boudreau M, Yu G et al. Radicicol, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide and in experimental glomerulonephritis. *J Biol Chem* 1995; 270:5418-26.
- [283] Oikawa T, Ito H, Ashino H, Toi M, Tominaga T, Morita I et al. Radicicol, a microbial cell differentiation modulator, inhibits in vivo angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 1993; 241:221-7.
- [284] Hadden MK, Lubbers DJ, Blagg BS. Geldanamycin, radicicol, and chimeric inhibitors of the Hsp90 N-terminal ATP binding site. *Curr Top Med Chem* 2006; 6:1173-82.
- [285] Lauria A, Ippolito M, Almerico AM. Inside the Hsp90 inhibitors binding mode through induced fit docking. *J. Mol. Graph. Model* 2009; 27:712-22.
- [286] Zhao R, Houry WA. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem. Cell Biol* 2005; 83:703-10.
- [287] Theodoraki MA, Caplan AJ. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823:683-8.
- [288] Esser C, Alberti S, Höhfeld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695:171-88.

- [289] Kim HR, Kang HS, Kim HD. Geldamycin induces heat shock protein expression through activation of HSF1 in K562 erythroleukemic cells. *IUBMB Life* 1999; 48:429-33.
- [290] Soga S, Akinaga S, Shiotsu Y. Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development. *Curr Pharm Des* 2013; 19:366-76.
- [291] Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. Preclinical pharmacological evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol* 1995; 36:305-15.
- [292] Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res* 2012; 18:64-76.
- [293] Munster P N, Tong W, Schwartz L, Larson S, Kenneson K, De La Cruz, A et al. Phase I trial of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) in patients (Pts) with advanced solid malignancies. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol* 2008; 14:7940-46.
- [294] Georgakis GV, Li Y, Younes A. The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. *Br J Haematol* 2006; 135:68-71.
- [295] Siegelin MD, Habel A, Gaiser T. 17-AAG sensitized malignant glioma cells to death-receptor mediated apoptosis. *Neurobiol Dis* 2009; 33:243-9.
- [296] Wagatsuma A, Takayama Y, Hoshino T, Shiozuka M, Yamada S, Matsuda R et al. Pharmacological targeting of HSP90 with 17-AAG induces apoptosis of myogenic cells through activation of the intrinsic pathway. *Mol Cell Biochem* 2018; 445:45-58.
- [297] Desale SS, Raja SM, Kim JO, Mohapatra B, Soni KS, Luan H et al. Polypeptide-based nanogels co-encapsulating a synergistic combination of doxorubicin with 17-AAG show potent anti-tumor activity in ErbB2-driven breast cancer models. *J Control Release* 2015; 208:59-66.

- [298] Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H et al. The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep* 2014; 31:619-24.
- [299] Krzykowska-Petitjean K, Małecki J, Bentke A, Ostrowska B, Laidler P. Tipifarnib and tanespimycin show synergic proapoptotic activity in U937 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138:537-44.
- [300] Workman P. Overview: translating Hsp90 biology into Hsp90 drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3:297-300.
- [301] Ge FF, Guo R, Tian WL, Gao FC, Sun L, Jiang ZX. Effect of Heat Shock Protein 90 Inhibitor 17-DMAG on Proliferation and Apoptosis of Acute Lymphocytic Leukemia Cell Line Jurkat. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2017; 25:1011-15.
- [302] Mellatyar H, Talaei S, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A. Targeting HSP90 Gene Expression with 17-DMAG Nanoparticles in Breast Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17:2453-7.
- [303] Ghadban T, Dibbern JL, Reeh M, Miro JT, Tsui TY, Wellner U et al. HSP90 is a promising target in gemcitabine and 5-fluorouracil resistant pancreatic cancer. *Apoptosis* 2017; 22:369-80.
- [304] Shimp SK 3rd, Parson CD, Regna NL, Thomas AN, Chafin CB, Reilly CM et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor- κ B pathways. *Inflamm Res* 2012; 61:521-33.
- [305] Lau S, Patnaik N, Sayen MR, Mestrlil R. Simultaneous overexpression of two stress proteins in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against ischemia-induced injury. *Circulation* 1997; 96:2287-94.
- [306] Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998; 92:351-66.

- [307] Gupta S, Knowlton AA. HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med* 2005; 9:51-8.
- [308] Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J* 1999; 18:2040-8.
- [309] Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R et al. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J* 1999; 18:2049-56.
- [310] Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE, Dillmann WH. Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation* 2001; 103:1787-92.
- [311] Mehrling T. Chemotherapy is getting 'smarter'. *Future Oncol* 2015; 11:549-52.
- [312] Harbers E, Chaudhuri NK, Heidelberger C. Studies on fluorinated pyrimidines. VIII. Further biochemical and metabolic investigations. *J Biol Chem* 1959; 234:1255-62.
- [313] Avendano C, Menendez JC. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Imprint: Elsevier Science Published; 2008. ISBN: 9780444528247.
- [314] Lee JH, Park JH, Jung Y, Kim JH, Jong HS, Kim TY et al. Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:3085-95.
- [315] Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 78:447-64.

- [316] Mayer P, Harjung A, Breinig M, Fischer L, Ehemann V, Malz M et al. Expression and therapeutic relevance of heat-shock protein 90 in pancreatic endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19:217-32.
- [317] Langer R, Ott K, Specht K, Becker K, Lordick F, Burian M et al. Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2008; 14:8279-87.
- [318] Malve H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioallied Sci* 2016; 8:83-91.
- [319] Jones BC, McGuigan C, Riley PA. Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-cancer drug araC. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:7195-201.
- [320] Chhikara BS, Parang K. Development of cytarabine prodrugs and delivery systems for leukemia treatment. *Expert Opin Drug Deliv* 2010; 7:1399-414.
- [321] Chen SH, Liang DC, Liu HC. High-dose cytarabine-containing chemotherapy with or without granulocyte colony-stimulating factor for children with acute leukemia. *Am J Hematol* 1998; 58:20-3.
- [322] Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: current status and controversies. *Oncology (Williston Park)* 2004; 18:837-44, 847; discussion 847-50, 853-4.
- [323] DeAngelis LM. Current diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis. *J Neurooncol* 1998; 38:245-52.
- [324] Mazzella FM, Schumacher HR. Acute erythroleukemia, M6b. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124:330-1.

- [325] Press OW, Livingston R, Mortimer J, Collins C, Appelbaum F. Treatment of relapsed non-Hodgkin's lymphomas with dexamethasone, high-dose cytarabine, and cisplatin before marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1991; 9:423-31.
- [326] Peters GJ, Schornagel JH, Milano GA. Clinical pharmacokinetics of anti-metabolites. *Cancer Surv* 1993; 17:123-56.
- [327] Lauter CB, Bailey EJ, Lerner AM. Assessment of cytosine arabinoside as an antiviral agent in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6:598-602.
- [328] Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur. J. Cancer* 1998; 34: 1514-21.
- [329] Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol* 2010; 17: 421-33.
- [330] Gordaliza M, García PA, del Corral JM, Castro MA, Gómez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon* 2004; 44: 441-59.
- [331] Ho AD, Brado B, Haas R, Hunstein W. Etoposide in acute leukemia. Past experience and future perspectives. *Cancer* 1991; 67:281-4.
- [332] Freund M, De Boben M, Diedrich H, Ganser A, Heil G, Heyll A et al. Treatment of relapsed acute lymphocytic leukemia in adults. *Haematol Blood Transfus* 1990; 33:432-6.
- [333] Johnson BE. Management of small cell lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23:225-39.
- [334] Trimble EL. Innovative therapies for advanced ovarian cancer. *Semin Oncol* 2000; 27:24-30.
- [335] Nichols CR. Testicular cancer. *Curr Probl Cancer* 1998; 22:187-274.

[336] Caniato R, Filippini R, Piovan A, Puricelli L, Borsarini A, Cappelletti E. Melatonin in plants. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527:593-7.

[337] Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori N, Hass R et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc* 1958; 80:2587.

[338] Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12:151-80.

[339] Faillace MP, Cutrera R, Keller-Sarmento MI, Rosenstein RE. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport* 1995; 6:2093-95.

[340] Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51: 945-53.

[341] Launay JM, Lamaitre BJ, Husson HP, Dreux C, Hartmann L, Da Prada M. Melatonin síntesis by rabbit platelets. *Life Sci* 1982; 31:1487-94.

[342] Finocchiaro LM, Arzt ES, Fernandez-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE. Serotonin and melatonin síntesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res* 1998; 8:705-16.

[343] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1472: 206-14.

[344] Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniwski A et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 2002; 16:896-8.

- [345] Itoth MT, Ishizuka B, Kuribayashi A, Amemiya A, Sumi Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mo. Hum Reprod* 1999; 5:402-8.
- [346] Simonneau V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharm. Reviews* 2003; 55:325-95.
- [347] Tan DX. Melatonin and Brain. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8:161.
- [348] Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Morino S, Reiter RJ et al. Evidence of melatonin synthesis in human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004; 18:537-9.
- [349] Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003; 34:75-8.
- [350] Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1980; 34:1761-3.
- [351] Cubero J, Valero V, Narciso D, Rivero M, Marchena JM, Rodríguez AB et al. L-tryptophan administered orally at night modifies the melatonin plasma levels, phagocytosis and oxidative metabolism of ringdove (*Streptopelia roseogrisea*) heterophils. *Mol Cell Biochem* 2006; 293:79-85.
- [352] Paredes SD, Terrón MP, Marchena AM, Barriga C, Pariente JA, Reiter RJ et al. Tryptophan modulates cell viability, phagocytosis and oxidative metabolism in old ringdoves. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101:56-62.

- [353] Paredes SD, Terrón MP, Cubero J, Valero V, Barriga C, Reiter RJ et al. Tryptophan increases nocturnal rest and affects melatonin and serotonin serum levels in old ringdove. *Physiol Behav* 2007; 90:576-82.
- [354] McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 1997; 138:627-34.
- [355] Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Matín V, Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1706-13.
- [356] Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6133-7.
- [357] Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 1995; 15:1003-15.
- [358] Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:387-96.
- [359] Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:7037-40.
- [360] Dubocovich ML. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends in Pharmacological Sciences* 1995; 16:50-6.
- [361] Nosjean O, Ferro M, Cogé F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275:31311-7.

- [362] Stankov B, Fraschini F, Reiter RJ. Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Brain Ver* 1991; 16: 245-56.
- [363] Lee PPN, Pang SF. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals* 1993; 2:181-93.
- [364] Yie SM, Niles LP, Younglai EV. Melatonin receptors on human granulose cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1747-9.
- [365] Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acaad Sci USA* 1990; 87: 6200-3.
- [366] Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JÁ. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT#/QR2. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61:1369-79.
- [367] Dubocovich L, Riviera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Bioci* 2003; 8:1093-108.
- [368] Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832-40.
- [369] Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997; 65:430-42.
- [370] Benítez-King G, Antón-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49:635-41.
- [371] Benítez-King G, Soto-Vega E, Ramírez-Rodríguez G. Melatonin modulates microfilament phenotypes in epithelial cells: implications for adhesion and inhibition of cancer cell migration. *Histol Histopathol* 2009; 24:789-99.

- [372] Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:181-97.
- [373] Hardeland R, Poeggeler B. Melatonin beyond its classical functions. *Open Physiol J* 2008; 1:1-23.
- [374] León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M et al. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol* 2000; 58:967-75.
- [375] Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 1999; 13:1537-46.
- [376] Radogna F, Sestili P, Martinelli C, Paolillo M, Paternoster L, Albertini MC et al. Lipoxygenase-mediated pro-radical effect of melatonin via stimulation of arachidonic acid metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238:170-7.
- [377] Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1-9.
- [378] Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S et al. Melatonin induces gammaglutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:838-47.
- [379] Paredes SD, Bejarano I, Terrón MP, Barriga C, Reiter RJ, Rodríguez AB. Melatonin and tryptophan counteract lipid peroxidation and modulate superoxide dismutase activity in ringdove heterophils in vivo. Effect of antigen-induced activation and age. *Age* 2009; 31:179-88.

- [380] Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; 49:248-55.
- [381] Cabrera J, Quintana J, Reiter RJ, Loro J, Cabrera F, Estévez F. Melatonin prevents apoptosis and enhances HSP27 mRNA expression induced by heat shock in HL-60 cells: possible involvement of the MT2 receptor. *J Pineal Res* 2003; 35:231-8.
- [382] Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, Chakraborty SB. Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFκB pathway. *Biol Res* 2018; 51:17.
- [383] Deng SL, Sun TC, Yu K, Wang ZP, Zhang BL, Zhang Y et al. Melatonin reduces oxidative damage and upregulates heat shock protein 90 expression in cryopreserved human semen. *Free Radic Biol Med* 2017; 113:347-54.
- [384] León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38:1-9.
- [385] Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 2002; 18:869-71.
- [386] Hardeland R, Poeggeler B, Pappolla M A. New vistas on mitochondrial electron flux rates and aging. *Cell* 2008; 132:171-6.
- [387] Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N et al. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297:H1487-93.

- [388] Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA et al. Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age* 2011; 33:497-507.
- [389] Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ et al. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol* 2010; 233:105-18.
- [390] Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jiménez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallàs M. Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res* 2008; 45:497-505.
- [391] Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:1407-26.
- [392] Engel P. Wachstumsbeeinflussende Hormone und Tumorwachstum. *Z Krebsforsch* 1935; 41:488-96.
- [393] Bergmann W, Engel P. Über den Einfluss von Zirbelextrakten auf Tumoren bei weißen Mäusen und bei Menschen. *Wien Klin Wschr* 1950; 62:79-82.
- [394] Hofstätter R. Versuche der postoperativen Krebsbehandlung mit Zirbelstoffen. *Krebsarzt* 1959; 14:307-16.
- [395] Lapin V, Ebels I. The role of the pineal gland in neuroendocrine control mechanisms of neoplastic growth. *J Neural Transm* 1981; 50:275-82.
- [396] Lapin V. Influence of simultaneous pinealectomy and thymectomy on the growth and formation of metastases of the Yoshida sarcoma in rats. *Exp Pathol* 1974; 9:108-12.

- [397] Bindoni M. Relationship between the pineal gland and the mitotic activity of some tissues. *Arch Sci Biol* 1971; 55:3-21.
- [398] Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467:247-64.
- [399] Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem* 2010; 17:4462-81.
- [400] Bejarano I, Espino J, Marchena AM, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB et al. Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Mol Cell Biochem* 2011; 353:167-76.
- [401] Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C et al. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; 46:392-400.
- [402] Joo SS, Yoo YM. Melatonin induces apoptotic death in LNCaP cells via p38 and JNK pathways: therapeutic implications for prostate cancer. *J Pineal Res* 2009; 47:8-14.
- [403] Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008; 45:532-40.
- [404] Mao L, Cheng Q, Guardiola-Lemaître B, Schuster-Klein C, Dong C, Lai L et al. In vitro and in vivo antitumor activity of melatonin receptor agonists. *J Pineal Res* 2010; 49:210-21.
- [405] Scott AE, Cosma GN, Frank AA, Wells RL, Gardner HS Jr. Disruption of mitochondrial respiration by melatonin in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 171:149-56.

- [406] Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, Pizzicannella J, Caputi S, Di Primio R. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathways activation. *J Pineal Res* 2005; 39:425-31.
- [407] González A, Del Castillo-Vaquero A, Miro-Moran A, Tapia JA, Salido GM. Melatonin reduces pancreatic tumor cell viability by altering mitochondrial physiology. *J Pineal Res* 2011; 50:250-60.
- [408] Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sciences* 2000; 68:387-99.
- [409] Wölfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K, Liebmann PM. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Lett* 2001; 502:127-31.
- [410] Albertini MC, Radogna F, Accorsi A, Uguccioni F, Paternoster L, Cerella C et al. Intracellular pro-oxidant activity of melatonin deprives U937 cells of reduced glutathione without affecting glutathione peroxidase activity. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1091:10-6.
- [411] Martín V, García-Santos G, Rodríguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez A, Antolín I et al. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett* 2010; 287:216-23.
- [412] Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res*. 2008; 45:532-40.
- [413] Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171:472-8.

- [414] Pirozhok I, Meye A, Hakenberg OW, Fuessel S, Wirth MP. Serotonin and melatonin do not play a prominent role in the growth of prostate cancer cell lines. *Urol Int* 2010; 84:452-60.
- [415] Cos S, Mediavilla MD, Fernández R, González-Lamuño D, Sánchez-Barceló EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res* 2002; 32:90-6.
- [416] Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J Pineal Res* 2006; 41:116-23.
- [417] González A, Alvarez-García V, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ et al. In vivo inhibition of the estrogen sulfatase enzyme and growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010; 10:279-86.
- [418] Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. Effects of melatonin on the cell kinetics and 'estrogen-rescue' of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res*. 1991;10:36-42
- [419] Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, Muraoka H, Blask DE. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett*. 1992; 64:249-56.
- [420] Cos S, Álvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martínez-Campa C. Melatonin modulation of crosstalk among malignant epithelial, endothelial and adipose cells in breast cancer (Review) *Oncol Lett*. 2014; 8:487-92.
- [421] Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ et al. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther*. 2012; 11:293-303.

[422] Granzotto M, Rapozzi V, Decorti G, Giraldi T. Effects of melatonin on doxorubicin cytotoxicity in sensitive and pleiotropically resistant tumor cells. *J Pineal Res.* 2001; 31:206-13.

[423] Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander AS et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PLoS One.* 2014; 9:e85311.

[424] Li W, Fan M, Chen Y, Zhao Q, Song C, Yan Y et al. Melatonin induces cell apoptosis in AGS cells through the activation of JNK and P38 MAPK and the suppression of nuclear factor-kappa B. A novel therapeutic implication for gastric cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 37:2323-38.

[425] Ju HQ, Li H, Tian T, Lu YX, Bai L, Chen LZ et al. Melatonin overcomes gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma by abrogating nuclear factor- κ B activation. *J Pineal Res.* 2016; 60:27–38.

[426] Büyükavci M, Ozdemir O, Buck S, Ravindranath Y, Savaşan S. Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukemia cells. *In Vivo.* 2011; 25:405-9.

[427] Yun M, Kim EO, Lee D, Kim JH, Kim J, Lee H et al. Melatonin sensitizes H1975 non-small-cell lung cancer cells harboring a T790M-targeted epidermal growth factor receptor mutation to the tyrosine kinase inhibitor gefetinib. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34:865-72.

[428] Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ et al. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther.* 2012; 11:293-303.

[429] Chen CC, Chen CY, Wang SH, Yeh CT, Su SC, Ueng SH et al. Melatonin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Chemotherapy Through Long Non-Coding RNA RAD51-AS1-Mediated Suppression of DNA Repair. *Cancers (Basel).* 2018; 10. pii: E320.

- [430] Shokrzadeh M, Ghassemi-Barghi N. Melatonin Loading Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles: Application in Attenuating Etoposide-Induced Genotoxicity in HepG2 Cells. *Pharmacology*. 2018; 102:74-80.
- [431] Anwar MM, Mahfouz HA, Sayed AS. Potential protective effects of melatonin on bone marrow of rats exposed to cytotoxic drugs. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998; 119A: 493-501.
- [432] Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *J Pineal Res.* 2012; 53:91-8.
- [433] Pariente R, Bejarano I, Espino J, Rodríguez AB, Pariente JA. Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017; 80:985-998.
- [434] Pariente R, Bejarano I, Rodríguez AB, Pariente JA, Espino J. Melatonin increases the effect of 5-fluorouracil-based chemotherapy in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro. *Mol Cell Biochem.* 2018; 440:43-51.
- [435] Pariente R, Pariente JA, Rodríguez AB, Espino J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res.* 2016; 60:55-64.
- [436] Del Fabbro E, Dev R, Hui D, Palmer L, Bruera E. Effects of melatonin on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and cachexia: A double-blind placebo controlled trial. *J Clin Oncol.* 2013; 31:1271-6.
- [437] Berk L, Berkey B, Rich T, Hrushesky W, Blask D, Gallagher M et al. Randomized phase II trial of high-dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119) *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68:852-7.

- [438] Bojková B, Kubatka P, Qaradakhi T, Zulli A, Kajo K. Melatonin May Increase Anticancer Potential of Pleiotropic Drugs. *Int J Mol Sci.* 2018; 19:3910.
- [439] Yu DY, Zhao QL, Wei ZL, Shehata M, Kondo T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by sanazole in human lymphoma U937 cells. *Int J Hyperthermia.* 2009; 25:364-73.
- [440] Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988; 22:631-77.
- [441] Guzhova IV, Shevtsov MA, Abkin SV, Pankratova KM, Margulis BA. Intracellular and extracellular Hsp70 chaperone as a target for cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 2013; 29:399-408.
- [442] Kaiser M, Kühnl A, Reins J, Fisher S, Orftiz-Tanchez J, Schlee C et al. Antileukaemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukaemia. *Blood Cancer J* 2011; 1:e28.
- [443] Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; 223:163-70.
- [444] Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukaemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005; 65:10536-44.
- [445] Chehab M, Caza T, Skotnicki K, Landas S, Bratslavsky G, Mollapour M et al. Targeting Hsp90 in urothelial carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6:8454-73.
- [446] Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J.* 1994; 13:6099-106.

- [447] Prince T, Sun L, Matts RL. Cdk2: a genuine protein kinase client of Hsp90 and Cdc37. *Biochemistry*. 2005; 44:15287-95.
- [448] Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2004; 3:1530-6.
- [449] Barrott JJ, Haystead TA. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer. *FEBS J*. 2013; 280:1381-96.
- [450] Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther*. 2002; 2:3-24.
- [451] Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 2000; 275:25665-71.
- [452] Bruni E, Reichle A, Scimeca M, Bonanno E, Ghibelli L. Lowering Etoposide Doses Shifts Cell Demise From Caspase-Dependent to Differentiation and Caspase-3-Independent Apoptosis via DNA Damage Response, Inducing AML Culture Extinction. *Front Pharmacol*. 2018; 9:1307.
- [453] Bezombes C, Plo I, Mansat-De Mas V, Quillet-Mary A, Nègre-Salvayre A, Laurent G et al. Oxidative stress-induced activation of Lyn recruits sphingomyelinase and is requisite for its stimulation by Ara-C. *FASEB J*. 2001; 15:1583-5.
- [454] Bejarano I, Espino J, González-Flores D, Casado JG, Redondo PC, Rosado JA et al. Role of Calcium Signals on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells. *Int J Biomed Sci*. 2009; 5:246-56.
- [455] Quintana C, Cabrera J, Perdomo J, Estévez F, Loro JF, Reiter RJ et al. Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J Pineal Res*. 2016; 61:381-95.

- [456] Espino J, Bejarano I, Paredes SD, González D, Barriga C, Reiter RJ et al. Melatonin counteracts alterations in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010; 107:590-7.
- [457] Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 108:14-20.
- [458] Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000; 2:469-75.
- [459] Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976; 17:565-77.
- [460] Jensen HA, Yourish HB, Bunaciu RP, Varner JD, Yen A. Induced myelomonocytic differentiation in leukemia cells is accompanied by noncanonical transcription factor expression. *FEBS Open Bio.* 2015; 5:789-800.
- [461] Bezombes C, Plo I, Mansat-De Mas V, Quillet-Mary A, Nègre-Salvayre A, Laurent G et al. Oxidative stress-induced activation of Lyn recruits sphingomyelinase and is requisite for its stimulation by Ara-C. *FASEB J.* 2001; 15:1583-5.
- [462] Zeisig BB, Kulasekararaj AG, Mufti GJ, So CW. SnapShot: Acute myeloid leukaemia. *Cancer Cell.* 2012; 22:698.
- [463] Zebisch A, Hatzl S, Pichler M, Wölfler A, Sill H. Therapeutic resistance in acute myeloid leukaemia: the role of non-coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17:2080.
- [464] Kryeziu K, Bruun J, Guren TK, Sveen A, Lothe RA. Combination therapies with HSP90 inhibitors against colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019; 1871:240-7.

- [465] Lazarev VF, Sverchinsky DV, Mikhaylova ER, Semenyuk PI, Komarova EY, Niskanen SA et al. Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell Death Dis.* 2018; 9:41.
- [466] Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:9-14.
- [467] Solárová Z, Mojžiš J, Solár P. Hsp90 inhibitor as a sensitizer of cancer cells to different therapies (review). *Int J Oncol.* 2015; 46:907-26.
- [468] Kumar S, Stokes J 3rd, Singh UP, Scissum Gunn K, Acharya A, Manne U et al. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* 2016; 374:156-66.
- [469] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002; 3:487-97.
- [470] Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D et al. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res.* 2000; 60:6950-7.
- [471] Oyama T, Kawamura M, Abiko T, Izumi Y, Watanabe M, Kumazawa E et al. Hyperthermia-enhanced tumor accumulation and antitumor efficacy of a doxorubicin-conjugate with a novel macromolecular carrier system in mice with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2007; 17:653-9.
- [472] Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ, Vaillancourt C. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 348:1-11.
- [473] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011; 51:1-16.
- [474] Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18. pii: E843.

[475] Liu S, Madu CO, Lu Y. The Role of Melatonin in Cancer Development. *Oncomedicine*. 2018; 3:37-47.