



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, IIB-INCan

**“EFECTO DEL INHIBIDOR 17-DMAG SOBRE LA ACTIVACIÓN DE β -CATENINA MEDIADA
POR HSP90 α Y HSP90 β EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SILVIA GABRIELA MORALES GUADARRAMA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este proyecto, fueron presentados en la IV Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología (México, 2015); el XIX Congreso de Carteles Dr. Lino Díaz de León del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (México, 2015); en la Tercer Reunión del Colegio para la Investigación del Cáncer (México, 2016), en el Segundo Encuentro en Latinoamérica de Estrés Celular de la Sociedad Internacional de Estrés Celular (Bogotá, 2016) y en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica (Aguascalientes, 2016).

“Para las pequeñas criaturas como nosotros, la inmensidad es soportable sólo a través del amor”

Carl Sagan

Índice de Contenido

Capítulo	Página
Agradecimientos	1
Agradecimientos a título personal	2
Dedicatorias	3
Abreviaturas	6
Índice de figuras	13
Índice de tablas	14
1 Introducción	15
1.1 Papel de las proteínas de choque térmico en la salud y la enfermedad	15
1.2 Regulación de la actividad de Hsp90	18
1.3 Inhibición farmacológica de Hsp90 en la terapia contra el cáncer	21
1.4 Función específica de las isoformas Hsp90 α /Hsp90 β y eficiencia selectiva de los inhibidores	25
1.5 Función de β -catenina en los procesos de Migración Celular y Transición Epitelio Mesénquima	27
2 Antecedentes	32
3 Hipótesis	36
4 Objetivos	37
5 Materiales y Métodos	38
5.1 Mantenimiento de cultivo celular	38
5.2 Ensayo de migración celular	38
5.2.1. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG	39
5.2.2. Video-microscopía (time lapse)	39
5.3 Extracción de Proteínas	40
5.3.1. Proteínas totales	40
5.3.2. Enriquecimiento de Proteínas de Medio Extracelular	40
5.4 Co-Inmunoprecipitación de Hsp90 α y Hsp90 β	41
5.5 Inmunofluorescencias y co-inmunofluorescencias	41

5.6	Electroforesis y electro-transferencia de las proteínas extraídas en geles SDS-PAGE	43
5.7	Inmunodetección por ensayos de Western blot (WB).	43
6	Resultados	45
6.1	Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer de cérvix	45
6.2	Inversión del perfil de expresión entre Hsp90 α y Hsp90 β , y su participación diferencial sobre la activación de sus proteínas "cliente"	47
6.3	Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la localización subcelular y extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β	49
6.4	Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el patrón de co-localización e interacción de Hsp90 α y Hsp90 β con sus proteínas "cliente"	53
7	Discusión	57
7.1	Las líneas celulares de CaCu tienen una sensibilidad diferencial al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG.	58
7.2	El patrón de localización nucleoplásmica moteada de Hsp90 . se asocia a la sensibilidad o resistencia al efecto anti-migratorio del 17-DMAG	59
7.3	El patrón de localización extracelular de Hsp90 . se asocia al fenotipo invasivo de las células de cáncer cervical	61
7.4	El patrón de co-localización nuclear entre Hsp90 . con β -catenina se asocia al fenotipo invasivo de las células de cáncer cervical y a la sensibilidad/resistencia al del inhibidor 17-DMAG	62
8	Conclusiones	65
9	Literatura Citada	66

Agradecimientos

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo y el respaldo académico que me han brindado a lo largo de mi formación académica, al excelente cuerpo docente y administrativo por la orientación.

Agradezco por los apoyos recibidos durante estos años, al Programa Nacional de Posgrados de Calidad por el apoyo de manutención mediante las Beca CONACyT Nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo aprobado del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Gracias, también, a la Sociedad Internacional de Estrés Celular por el apoyo brindado para asistir al Second Latin America Chapter Conference of Cell Stress Society International, y al Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer por el apoyo para estancia/congreso nacional.

Al Instituto Nacional de Cancerología, a la Subdirección de Investigación Básica en Cáncer por el apoyo a lo largo de estos años y por su apoyo para las presentaciones en Congresos Institucionales y Simposios.

Al Doctor Luis Alonso Herrera Montalvo por confiar en mi trabajo y reconocer los esfuerzos realizados; sobre todo gracias por el apoyo para la realización de este proyecto y para su posterior continuación durante el Doctorado.

Al Doctor Alejandro Zentella Dehesa, por sus palabras de apoyo y los excelentes consejos; gracias por las críticas al proyecto y a mi trabajo, por aterrizarme en más de una ocasión y contribuir a mi crecimiento académico.

Finalmente, agradezco al Doctor Carlo César Cortés por nunca dejar de creer en mí y en la pasión que siento por hacer ciencia; gracias por mostrarme lo que es amar la ciencia y vivir apasionadamente cada oportunidad que la vida nos va dando.

A los que contribuyeron a la estructuración, desarrollo y comprensión de este proyecto, gracias por su tiempo brindado y la guía. Sin ustedes, mi formación no habría sido posible.

Agradecimientos a título personal

A mi comité tutor por confiar en mi avance y motivarme a seguir explotando el potencial que tengo al hacer lo que amo, ciencia.

Al grupo de Investigación del Laboratorio de Carcinogénesis por su apoyo y contribución a mi formación en la Investigación: Alejandro López Saavedra y José de la Luz Chávez, por su ayuda durante la estandarización de las técnicas de video-microscopía y las inmunofluorescencias.

A Fer Luna y al Colegio Mexicano de Investigación para el Cáncer por el apoyo y las oportunidades brindadas en este tiempo. Y en general, a todo el grupo del laboratorio de por integrarme a su dinámica, por su apoyo y sus valiosas observaciones al proyecto.

Gracias a los "Chaperonólogos" por su apoyo y paciencia estos años. Que siempre tengan un camino lleno de aprendizaje y calma para valorar las cosas importantes de la vida; gracias por las tardes noches de intenso trabajo, por tener la calma de escuchar mis largas y apasionadas explicaciones sobre mi proyecto y las chaperonas, particularmente a Eduardo Pérez Aquino por la ayuda brindada durante algunos de los experimentos.

A mis alumnitos y a mis compañeros del cuerpo docente en el Instituto de Educación Avanzada (Taxqueña), por enseñarme lo hermoso de la docencia, especialmente a la memoria del profesor Antonio Assaf, que durante el tiempo de vida que pude compartir con él siempre tuvo una sonrisa y palabras de ánimo en los días más cansados y difíciles. Espero que tu camino esté lleno de paz y luz.

Dedicatorias

A **mamá**, gracias por motivarme siempre a hacer lo que amo, lo mejor que me pudiste dar en esta vida es la libertad de ser lo que quiero. Te adoro.

A mis **abuelos Rafa y Silvia**, gracias por su apoyo incondicional y por nunca dejar de luchar, con ustedes yo soy invencible. Los amo su baby.

A **Belén y Óscar**, por sus consejos y su cariño, por darme siempre un motivo para sonreír y salir adelante, por apoyarme durante épocas difíciles; pero sobre todo gracias por el amor del bebé más bello y fuerte del planeta. Los quiero muchísimo.

A **Ted e Ixchel**, por sus grandes enseñanzas y sus excelentes recomendaciones para "saber sobrevivir" a la vida adulta. Gracias por sus muestras de apoyo y de cariño. Siempre los tengo presentes y los quiero mucho.

Al, hermanito, gracias por nunca dejar de sonreír, con eso yo puedo hacer de todo sin olvidar lo importante de la vida. Nunca dejes de creer en ti, saborea la vida y despierta porque se nos va en un abrir y cerrar de ojos, te amo con todo mi corazón.

A mis **bebés Layon y Rafita**, por devolver los colores y la vitalidad a la familia; gracias por acabar con mis energías juveniles pero sobre todo por acrecentar mi amor por la vida, y enseñarme a valorar aún más los momentos junto a ustedes. Los amo y sé que les espera un excelente futuro.

A mi familia sanguínea y no sanguínea, porque a pesar de la distancia nunca han dejado de creer en mí, ni de apoyarme. Gracias por ser la luz de mi vida y mi fuerza.

Este camino tuvo más obstáculos de los que esperaba y sin embargo, el maravilloso equipo y la gente bonita que me ha rodeado siempre me han ayudado a salir adelante. Gracias **a mis roomies**, por las pláticas nocturnas, por creer en mis súper poderes contra el cáncer, y por no abandonarme en los momentos más difíciles del posgrado; en verdad muchas gracias, los quiero solecitos.

Finalmente, a mis amigos que me han aguantado pese al poco tiempo y los contratiempos para vernos; al **middle** que siempre, aunque sea de lejos no han tenidos más que buenos deseos hacia mí; a mis babies de la FES-I, **Alancito** gracias por ser un pilar de apoyo en este trayecto, fue un placer regresar a las aulas a tu lado; a mi amiga **Marcela Hernández** por su incondicional apoyo y sus bonitas enseñanzas. Los quiero mucho.

Por último, a **Antonio** porque sin tu apoyo y tus sacrificios, no hubiera podido concluir esta etapa sin quebrarme. Gracias por la luz en mis ratos más oscuros en este camino, por la fuerza y el tiempo que me has dado; gracias por alimentar siempre mis sueños y los sueños que vamos cosechando juntos. Por tanto cariño y apoyo a manos llenas. Te amo.

"Quien busque el infinito, que cierre los ojos"
Milán Kundera

Unidades de medición

μg.- Microgramo(s)

kb.- Kilobases

kDa.- Kilodaltones

aa.- Aminoácidos

Proteínas

Hsp.- Proteína de Choque Térmico (del inglés, *Heat Shock Protein*)

Hsp40.- Proteína de Choque térmico de 40 kDa

Hsp60.- Proteína de Choque térmico de 60 kDa

Hsp70.- Proteína de Choque térmico de 70 kDa

Hsp90.- Proteína de Choque térmico de 90 kDa

Hsp90α.- Proteína de Choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa

Hsp90β.- Proteína de Choque térmico de 90 kDa, isoforma beta

Hsp90N.- Proteína de Choque térmico de 90 kDa asociada a membrana.

TRAP1.- Proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés *Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1*).

Grp94.- Proteína regulada por glucosa de 94 kDa (del inglés, *Glucose-regulated protein*)

Hsp100.- Proteína de Choque térmico de 100 kDa

CHIP.- Proteína de interacción con el dominio Carboxi-terminal de Hsc70 (del inglés, *Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*)

Hsc70.- Proteína 8 de Choque Térmico de 70 kDa (del inglés, *Heat Shock Cognate 71 kDa, Heat Shock 70 kDa Protein 8*)

HOP.- Proteína Organizadora de Hsp90 y Hsp70 (del inglés, *Hsp90-Hsp70 Organizing Protein*)

ATP.- Trifosfato de adenosina

ADP.- Difosfato de adenosina

ATPasa.- Fosfatasa de ATP y ADP.

Gsk3-β.- Glucógeno Sintetasa Cinasa 3β, (del inglés (*Glycogen-Synthase-Kinase 3β*).

pGsk3-β (Ser9).- Fosforilación de Gsk3-β en la Serina 9

MMP2.- Metaloproteínasa de Matriz Extracelular 2

c-Src.- Proteína Tirosina Cinasa Src (del inglés *Tyrosine-protein kinase Src*)

PKA.- Proteína Cinasa A (*Protein Kinase A*)

Ck2.- Caseína Cinasa 2 (*Casein Kinase 2*)

GCUNC45.- Proteína de interacción con el Receptor de Progesterona (*Progesterone Receptor-interacting protein GCUNC-45*)

Akt- Proteína cinasa B (*Protein Kinase B*)

pAkt^{Thr308}.- Fosforilación de Akt en el residuo de la Treonina 308

pAkt^{Ser473}.- Fosforilación de Akt en el residuo de la Serina 473

ARNm.- Ácido Ribonucléico Mensajero

APC.- Proteína de Poliposis Adenomatosa de colón (*Adenomatous polyposis coli protein*)

Wnt.- Gen/Proteína Wingless

Wnt/PCP.- Señalización de Wnt de Polaridad Planar Celular (*Planar Cell Polarity Wnt Signaling*)

Wnt/PKC-dependent.- Señalización de Wnt dependiente de la Proteína Kinasa C (*Protein Kinase C-dependent Wnt Signaling*)

TCF.- Factor de transcripción de células T (*T-Cell Factor*)

LEF.- Potenciador linfoide de unión al Factor 1 (*Lymphoid enhancer-binding factor-1*)

RTKs.- Receptores Tirosina Cinasas

PDGFR.- Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*)

PDGF.- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)

EGFR.- Receptor de Factor de Crecimiento Epitelial (*Epithelial Growth Factor Receptor*)

HDAC6.- Desacetilasa de Histonas 6 (*Platelet Derived Growth Factor*)

p300.- Acetiltransferasa de Histonas p300 (*Histone Acetyltransferase p300*)

p53.- Proteína supresora de tumor p53 (*Tumor Protein p53*)

CK1- α .- Caseína Cinasa Alfa (*Casein Kinase Alpha*)

CpG-B.- Proteína de unión a Islas CpG (*Binding protein CpG*)

Bcl-2.- Proteína de Linfoma Folicular de Células B (*B-cell lymphoma 2*)

LRP5.- Receptor 5 de lipoproteínas de baja densidad 5 (*Low density lipoprotein (LDL)-receptor 5*)

LRP6.- Receptor 6 de lipoproteínas de baja densidad 6 (*Low density lipoprotein (LDL)-receptor 6*)

Fzz.- *Frizzled*, Receptor acoplado a proteína G.

VPH.- Virus del Papiloma Humano

VPH16.- Virus del Papiloma Humano, tipo 16

VPH18.- Virus del Papiloma Humano, tipo 18

eNOS.- Sintetasa de Óxido Nítrico Endotelial (*Endothelial Nitric Oxid Synthase*)

cyclin-D.- Ciclina D

c-myc.- Proto-oncogene C-myc

c-jun.- Proto-oncogene C-jun

Grupos funcionales y compuestos químicos

NH₂-t.- Amino-terminal

COOH-t.- Carboxi-terminal

NO₂.- Óxido nitroso

NO₃.- Óxido nítrico

OH.- Radical hidroxilo

NaCl.- Cloruro de sodio

Tris-NaCl.- Tris-amino-metano de cloruro de sodio

Aminoácidos

Thr.- Treonina (Threonine)

Tyr.- Tirosina (Tyrosine)

Ser.- Serina (Serine)

Secuencias/Dominios

HSE.- Elemento de respuesta a choque térmico (*Heat Shock Element*)

ARM.- Secuencia Armadillo de la proteína β -catenina

PEST.- Secuencia peptídica rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) que marca a las proteínas para su degradación rápida

MEEVD.- Secuencia de unión a co-chaperonas MEEVD

TRP.- Motivo repetido de tetratricopeptidos de unión a chaperonas

(Tetratricopeptide repeat)

CGPs.- Células germinales primordiales

Materiales/Métodos

PVDF.- Polifluoruro de vinilideno

DMEM.- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM F12.- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

SFB.- Suero Fetal Bovino

SDS-PAGE.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
(*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel for Electrophoresis*)

TBS-Tween.- Buffer Salino de Tris (*Tris-Buffered Saline*)

PrimAb.- Anticuerpo primario (*Primary Antibody*)

SecAb.- Anticuerpo secundario (*Secondary Antibody*)

Co-IP.- Co-inmunoprecipitación (*Co-Immunoprecipitation*)

Procesos

Céls.- Células

CaCu.- Cáncer cervicouterino

CC.- Cáncer cervical, cáncer de cérvix

TEM.- Transición Epitelio-Mesénquima

Índice de Figuras

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
<i>I.</i> Estructura química de la geldanamicina (GA).	23
<i>II.</i> Mecanismo de inhibición de Hsp90 por derivados de la geldanamicina.	23
<i>III.</i> Selectividad de los inhibidores de Hsp90, hacia células tumorales en contraste, con la baja afinidad que estos fármacos tienen hacia las células normales.	24
<i>IV.</i> Vías de señalización mediadas por β -catenina en una célula normal y una célula tumoral.	32
<i>1.</i> Efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG.	47
<i>2.</i> Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β	48
<i>3.</i> Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el perfil de activación/inactivación de las proteínas "cliente" de Hsp90.	52
<i>4.</i> Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90 sobre el patrón de localización intracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas de cáncer cervical tratadas con 17-DMAG [500nM]	53
<i>5.</i> Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG sobre la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β .	53
<i>6.</i> Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el patrón de co-localización e interacción de Hsp90 α y Hsp90 β , con su proteína "cliente" β -catenina, en la línea celular de cáncer cervical HeLa tratadas con 17-DMAG [500nM]	55
<i>7.</i> Efecto del inhibidor 17-DMAG [500nM], sobre el patrón de co-localización intracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , con su proteína "cliente" β -catenina, en la línea celular de cáncer cervical C33a	56

Tabla	Página
I. Lista de proteínas "cliente" de Hsp90 y desreguladas en cáncer: mecanismos de acción y tipos de tumores en donde la inhibición de Hsp90 es un potencial blanco terapéutico.	21
II. Principales inhibidores de Hsp90 derivados de la geldanamicina. (GA): Características generales, fase clínica y respuesta obtenida en pacientes.	25
III. Breve descripción de las líneas celulares neoplásicas de cérvix empleadas en el proyecto.	39
IV. Anticuerpos empleados para la obtención de los perfiles de expresión y localización.	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Papel de las proteínas de choque térmico en la salud y la enfermedad

El equilibrio entre el plegamiento, activación y degradación de las proteínas en la célula es el eje central del mantenimiento de la proteostásis celular. En la presencia de factores de estrés, las células poseen un mecanismo de respuesta al estrés en el que la estabilidad de las proteínas es mantenida por medio de un "control de calidad" de proteínas, el cual se encuentra dirigido por las principales chaperonas moleculares, las proteínas de choque térmico (Bakau et al., 2006).

De manera general, las proteínas de choque térmico, o Hsp por sus siglas en inglés componen una familia multigénica de proteínas que desempeñan funciones esenciales para cualquier célula, tales como: 1) plegamiento/replegamiento de proteínas; 2) ensamblaje de complejos multi-proteicos; 3) transporte de proteínas en compartimentos celulares; y 4) degradación de proteínas "cliente" vía proteosomal (Soti et al., 2005; Cortés-González et al., 2008; Wandlinger et al., 2008).

La regulación de la función o actividad de chaperona molecular de las diversas proteínas de choque térmico, depende de cuatro propiedades: 1) Estructura conformacional, 2) Patrón de interacción con chaperonas y co-chaperonas, 3)

Hidrólisis de nucleótidos, y 4) localización subcelular y extracelular de estas (Makhnevych y Houry, 2012; Clare y Saibil, 2013).

Existen diversos estresores capaces de comprometer o alterar el correcto funcionamiento de las chaperonas moleculares, resultando en la pérdida de funciones biológicas o la formación de agregados proteicos, derivando en procesos dañinos (Huang, et al., 2006; Pastorino et al., 2006; Lee et al., 2006; Tagawa, et al, 2007; Macario y Conway de Macario, 2007). La alteración de dicha función se ha asociado en diversos estudios con la patogénesis de enfermedades asociadas a la agregación de proteínas mal plegadas, afecciones inmunológicas, e incluso padecimientos como Parkinson, Alzheimer y cáncer (Luheshi et al., 2008; Mendillo et al., 2012; Stope et al., 2012).

El cáncer es un conjunto de enfermedades en el cual, diversas cascadas de señalización involucradas con los procesos de mantenimiento celular se encuentran desregulados; la estabilidad y activación de las proteínas involucradas en los procesos de transformación de las células tumorales, se encuentra a cargo de una amplia red de chaperonas moleculares, dentro de las cuales la subfamilia de 90 kDa (Hsp90), es una de las de mayor interés (Miyata et al., 2013).

Esta subfamilia comprende entre el 1-2% de la proteína total en una célula (Csermely et al., 1998); existen cinco isoformas en las células eucariotas de los organismos más complejos: las isoformas de Hsp90 citoplásmica (Hsp90 α y Hsp90 β), Hsp90 mitocondrial (TRAP1, del inglés: tumor necrosis factor receptor-

associated protein 1), Hsp90 asociada a membrana (Hsp90N) y Hsp90 del retículo endoplásmico (Grp94, del inglés: glucose-regulated protein), (Johnson, 2011).

Recientemente se ha descrito que las isoformas citosólicas, Hsp90 α y Hsp90 β , pueden llegar a secretarse al medio extracelular en donde llevan a cabo diversas funciones involucradas con la regulación de la matriz extracelular, las adhesiones celulares y la migración (Eustace et al., 2004; Tsen et al., 2013).

Puesto que un gran número de proteínas dependen de Hsp90 para adquirir una conformación activa, la subfamilia de Hsp90 es considerada como eje principal de la proteostasis (Taipale et al., 2010). A este grupo de proteínas cuya estabilidad, activación o localización intracelular depende de Hsp90, se les conoce como proteínas "cliente".

Dentro de la variada lista de proteínas "cliente" que posee Hsp90 se encuentran una cantidad considerable de proteínas mutadas y de otras tantas conocidas como oncoproteínas, por su papel oncogénico en una célula tumoral, destacando: p53^{mut}, EGFR^{mut}, KRAS^{mut}, entre otras (Blagosklonny, 2002).

Dentro de las proteínas "cliente" de Hsp90, las cinasas conforman el grupo más amplio. Las cinasas son enzimas encargadas de catalizar la transferencia de grupos fosfatos, que las posicionan como importantes reguladores de la transducción de señales. Entre esta clase de oncoproteínas "clientes" de Hsp90 se encuentran: PKB/Akt, Src, Lyn, Lck, Raf-1, EGFR, PDGFR y HIF-1, entre otras, (*Figura III*)

(Blagoskonny, 2002; Mahalingam et al., 2009; Hanahan y Weinberg, 2011; Miyata et al., 2013; Piccard, 2013;).

1.2. Regulación de la actividad de Hsp90

Las proteínas Hsp90 pueden presentarse en estructuras monoméricas, diméricas, oligoméricas, y heterodiméricas, entre los miembros de la misma subfamilia. La conformación activa de las Hsp90 se es la dimérica en condiciones fisiológicas; sin embargo, la estabilidad de la unión entre monómeros es dependiente del dominio COOH-t de cada isoforma (Minami et al., 1991; Nemoto y Sato, 1998). Cuando Hsp90 se encuentra en conformación dimérica, la hidrólisis de ATP de cada monómero es mutuamente dependiente de la del otro monómero, esto aumenta la eficiencia de la hidrólisis por lo que el dímero presenta mayor actividad (ATPasa) y mejor funcionalidad como chaperona (Vaughan et al., 2009). Sin nucleótidos de ATP, el dímero de Hsp90 se encuentra en una conformación abierta, y cuando el nucleótido se une a esta conformación induce un ligero cierre sobre el sitio de unión promoviendo la dimerización del N-terminal. En la conformación compacta y cerrada el *loop* flexible, del dominio medio de cada subunidad, hace contacto con su N-terminal e inicia la hidrólisis de ATP. Una vez que el ATP es hidrolizado, el dominio N-terminal se disocia y la conformación abierta es recuperada (Young et al., 1998; Shiau et al., 2006; Ali et al, 2006; Dollins et al, 2007).

Otro factor regulador de la actividad de Hsp90 es su interacción con proteínas co-chaperonas, las cuales son proteínas cruciales para dirigir el curso del ciclo de Hsp90-proteína "cliente". La unión a co-chaperonas ha sido identificada en procesos como la inhibición o activación de la actividad de ATPasa de la Hsp90, así como en el reclutamiento de proteínas "cliente" en específico (Li et al., 2012; Street et al., 2011; Retzlaff et al., 2009; Prodromou, 2012; Muller et al., 2013).

Además de su interacción con co-chaperonas, la actividad de Hsp90 es susceptible de ser regulada por medio de modificaciones postraduccionales, tales como: fosforilación, acetilación y S-nitrosilación, ubiquitinación, oxidación y metilación. La fosforilación de las Hsp90 es el mecanismo de regulación postraducciona l más estudiado, puesto que la activación de la chaperona o su unión a co-chaperonas tiene un gran impacto en la actividad de las proteínas "cliente". (Kundrat y Regan, 2010; Mollapour y Neckers, 2011; Li et al., 2011).

En diversos tipos de tumores, se ha reportado que las Hsp se encuentran sobre-expresadas, y sobre-activadas al igual que muchas de sus oncoproteínas "cliente", de las cuales, varias son blancos terapéuticos actuales (Mendillo et al., 2012; Stope et al., 2012). Ante esto la inhibición de Hsp90 ha surgido como un potencial blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer previniendo no sólo uno, sino varios de los "hallmarks" del cáncer (*Tabla 1*).

Tipo de Proteína	Proteína "cliente" de Hsp90	Tipos tumorales en donde es un potencial blanco	Mecanismo de acción de la inhibición de Hsp90
Receptores Tirosina Cinasa	EGFR mutada	Cáncer de Pulmón de células no pequeñas y Glioblastoma	Activación de las vías de supervivencia y evasión de apoptosis reguladas río abajo por las proteínas "cliente" P.e: PI3K-AKT y MAPK
	ErbB2/HER-2	Cáncer de mama	
	KIT	Tumores en estroma gástrico	
Moléculas de señalización o Cinasas	AKT	Diversos tipos de tumor	Previene la activación de proteínas anti-apoptóticas y supresión de proteínas pro-apoptóticas
	B-Raf mutante	Melanoma	Activa constitutivamente la señal de ERK
	MET	Gástricos y de pulmón	Involucrados en la proliferación celular, migración, invasión y morfogénesis.
Factores de Transcripción	CDK4	Tumores con sobreexpresión de CDK4	Fosforila e inactiva a Rb, permitiendo que el ciclo celular continúe sin control
	HIF-1 α	Cáncer Renal	Promueve angiogénesis
	RE- α	Cáncer de Mama	Regula genes involucrados en proliferación celular
Proteínas Quiméricas o de Fusión	p53	Mutado en, aproximadamente, el 50% de los tumores	Promueve la transcripción de genes involucrados en el arresto del ciclo celular o apoptosis
	BCR-ABL	Leucemia Mieloide Crónica	Activa transducción de señales durante la leucemiogénesis
	NPM-ALK	Linfoma Anaplásico	Induce transformación de las células y la proliferación
Otras	Telomerasa	Varios tipos de tumores	Previene el acortamiento de los telómeros
	Apaf-1		Crucial para la formación del apoptosoma
	Bcl-2	Linfoma folicular y Cáncer Pulmonar de Células pequeñas	Regula la vía mitocondrial de apoptosis
	MMP2	Sobreexpresada en diversos tipos de tumor	Facilita la invasión modificando las adhesiones celulares, el remodelamiento de la matriz extracelular y la migración.

Tabla 1. Proteínas "cliente" desreguladas en cáncer : mecanismos de acción y tipos de tumores en donde la inhibición de Hsp90 es un potencial blanco terapéutico.

1.3. Inhibición farmacológica de Hsp90 en la terapia contra el cáncer

Los antineoplásicos empleados en la terapia contra el cáncer han enfocado sus esfuerzos en dirigir las terapias a diversas proteínas o factores involucrados en la síntesis y reparación del ADN, suprimir la regulación de la división celular al inhibir la función de los microtúbulos, o restringiendo la progresión del ciclo celular; sin embargo pese a la efectividad de dichos tratamientos, los efectos secundarios y la falta de selectividad entre células normales y las células del tumor representan una limitante de la terapéutica actual (Lowe y Lin, 2000; Blagosklonny y Pardee, 2001; Kamal et al., 2004).

En la búsqueda de agentes quimioterapéuticos específicos, la geldanamicina (GA), la herbimicina A, y otros antibióticos derivados de levaduras fueron identificados como inhibidores de tirosin-quinasas; sin embargo, años más tarde se comprobó que la inhibición de estas cinasas era de manera indirecta. Cerca de una década tuvo que pasar para que se determinará que la GA y la herbimicina A no eran inhibidores de cinasas, sino de las chaperonas moleculares que se encargan de su maduración y activación: Las Hsp90 (Whitesell et al., 1994; Morimoto, et al., 1998).

La geldanamicina (GA) es una ansamicina benzoquinona que fue aislada por primera vez de *Streptomyces hygroscopicus* en 1970 (*Figura 1*), (Deboer et al., 1970); Tras ser confundido con un inhibidor de cinasas, se demostró de manera

experimental que la GA inhibe la actividad de ATPasa de Hsp90 al competir con el nucleótido por el sitio de unión a nucleótidos en el dominio N-terminal de la proteína (Prodromou et al.; 1997, Grenert et al, 1997).

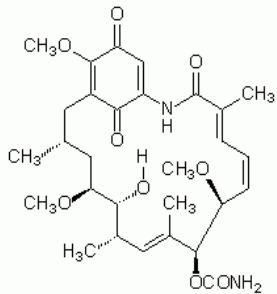


Figura I. Estructura química de la geldanamicina (GA). Este antibiótico se aisló a partir de una cepa fermentadora de *Streptomyces hygroscopicus* y su estructura ha sido el molde para el desarrollo de moléculas pequeñas que inhiben la actividad ATPasa de Hsp90.

Evidencia experimental, ha demostrado que la inhibición por competencia, de Hsp90 mediante la administración de GA y sus derivados, tiene como respuesta la disociación de las interacciones entre Hsp90 y sus proteínas "cliente", la consecuente inactivación y degradación proteosomal de las proteínas "cliente", promoviendo así la muerte de las tumorales (*Figura II*); (Holzbeierlein et. al., 2010; Cooper et al., 2011; Fukumoto y Kiang, 2011).



Figura II. Mecanismo de inhibición de Hsp90 por derivados de la geldanamicina. Modificada de Kamal y Burrows, 2004.

Pese a la abundancia de Hsp90 en las células en general, se ha demostrado que las células tumorales poseen sensibilidad a la inhibición de Hsp90 en contraste con células no neoplásicas, las cuales presentan una baja afinidad a los

inhibidores dada la presencia mayoritaria de Hsp90 en conformación "inactiva" en las células normales (Kamal et al., 2003).

Se ha observado que la actividad enzimática de Hsp90 es mantenida por su conformación activa la cual se sostiene principalmente por complejos multi-chaperónicos que promueven su actividad; en los tumores; estos complejos que la Hsp90 activa y en complejos multi-protéicos tenga 100 veces mayor afinidad de unión por 17-AAG en comparación con la forma inactiva de Hsp90 que reside en las células normales (*Figura III*) (Workman, 2003; Kamal y Burrows, 2004; Moser et al., 2009).

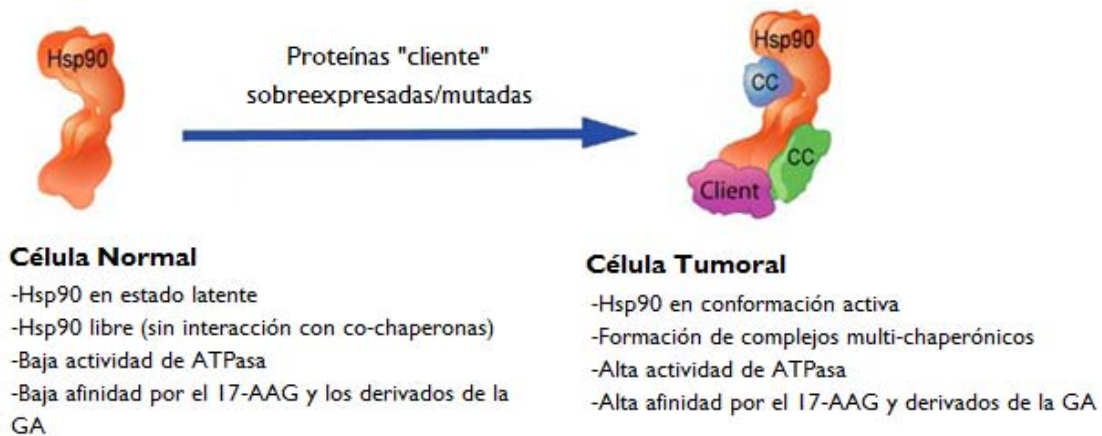


Figura III. Selectividad de los inhibidores de Hsp90, hacia células tumorales en contraste, con la baja afinidad que estos fármacos tienen hacia las células normales. Modificada de Kamal y Burrows, 2004.

La inhibición de Hsp90 es tan promisoriosa que incluso algunos de sus inhibidores ya se encuentran en estudios clínicos; en general los inhibidores de Hsp90 se pueden clasificar en función a la GA, el radicicol o los andamios de purinas (Jhaveri et al., 2012).

Dentro de los derivados de la GA más importantes, destacan dos que han sido probados en fases clínicas I, II y III, tanto en tumores sólidos como en algunas leucemias. En la *Tabla II* se muestran las características de cada uno de estos compuestos y la respuesta que se ha obtenido de su uso en la clínica (Jhaveri et al., 2012).

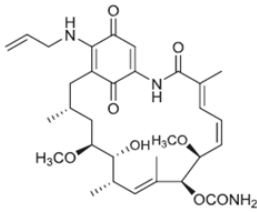
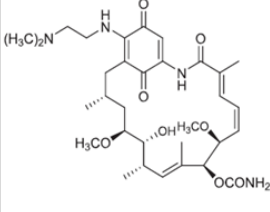
Nombre del Inhibidor	Características generales	Estructura	Fase Clínica	Respuesta en ensayos clínicos
Tanespimicina (17-AAG)	Derivado de la GA tras sustituir el grupo metoxi. Este compuesto fue el primer inhibidor de Hsp90 seleccionado para pruebas clínicas.		III	Respuesta limitada o nula como agente único. Se cree que el éxito limitado de este fármaco es debido a su baja solubilidad.
Alvespimicina (17-DMAG)	La sustitución del grupo metoxi C-17 de GM con N,N-dimetiletilamina. La presencia de un grupo amino ionizable resultó en un aumento del agua solubilidad, biodisponibilidad oral y mejor igual o mayor anti-tumoral actividad en comparación con 17-AAG		I	Se ha observado respuesta parcial, completa e incluso sobrevida libre de enfermedad en cáncer de mama, melanoma, cáncer renal, y leucemia mieloide aguda; sin embargo Kosan discontinuó su desarrollo en 2008.

Tabla II. Principales inhibidores de Hsp90, derivados de la geldanamicina. Características generales, fase clínica y respuesta obtenida en pacientes.

En las últimas décadas, diversos grupos de investigación científica y médica, así como la industria farmacológica, han reconocido a los inhibidores sintéticos de Hsp90 como una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer, tanto

como agentes individuales o en combinación con otras terapias (Heath et al., 2005; Modi et al., 2007; Solit et al., 2008).

1.4. Función específica de las isoformas Hsp90 α /Hsp90 β y eficiencia selectiva de los inhibidores

Dentro de la subfamilia de las proteínas Hsp90 tan sólo las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β componen el 80%; en abundancia, Hsp90 α se encuentra en menor proporción en comparación con Hsp90 β . En mamíferos, estas isoformas mantienen hasta un 85% de identidad a nivel de la proteína (Gupta et al., 1995; Passarino et al., 2003). Si bien las isoformas presentan un alto grado de homología, también existen una gran variedad de diferencias entre Hsp90 α y Hsp90 β . Se sabe que Hsp90 α se encuentra principalmente como heterodímero con Hsp90 β , al contrario de Hsp90 β la cual forma principalmente homodímeros (Perdew, 1993). Además de esto, por la cantidad de elementos de respuesta a estrés una de estas isoformas es constitutiva en citoplasma (Hsp90 β), mientras que la otra es inducible ante ciertos estímulos que provocan su sobreexpresión (Hsp90 α), (Sreedhar et al., 2004).

Se han descrito funciones diferenciales sobre la activación de ciertas proteínas "cliente" de Hsp90, así como la sensibilidad que Hsp90 α y Hsp90 β presentan a los inhibidores de Hsp90, como el radicicol y la geldanamicina, que a pesar de presentar una eficiencia similar, también se ha reportado que el efecto es

dependiente del tipo tumoral que se esté tratando (Chiosis, 2006; Millson et al., 2007; Chan et al., 2008).

Si bien, en las últimas décadas ha sido de gran importancia la investigación en torno al papel diferencial "intracelular" de Hsp90 α y Hsp90 β , recientemente se ha destacado su importancia y papel diferencial en función de la localización subcelular y extracelular de estas isoformas. Recientemente, se describió la asociación funcional del patrón de localización membranal y extracelular de Hsp90 con la invasión celular y la motilidad (Thomaidou y Patsavoudi, 1993; Eustace et al, 2004; Sidera et al., 2008).

Hay evidencia de la función como chaperona extracelular de Hsp90 α , principalmente activando y estabilizando proteínas "cliente" tales como MMP-2, o HER-2 en su dominio extracelular; la primera proteína es una enzima esencial para el remodelamiento de la matriz extracelular durante la transición epitelio-mesénquima (TEM), la migración y la invasión (Eustace et al., 2004; Passarino et al.; 2003). La proteína HER-2, por otra parte, son un tipo de receptores activadores de la transducción de señales importantes durante el proceso oncogénico, como la vía de las MAPK y la vía de PI3K-Akt (Sidera et al., 2008; Sidera y Patsavoudi, 2008).

En diversos estudios, se ha asociado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la invasión y metástasis; en dichos

modelos la inhibición de la localización extracelular de Hsp90 α se ha asociado al efecto anti-metastásico de la terapia, pues al prevenir los eventos de TEM, migración e invasión celular (Tsutsumi et al., 2008; no está Sidera et al., 2008).

1.5. Función de β -catenina en los procesos de Migración Celular y Transición Epitelio Mesénquima

La proteína citoplasmática β -catenina forma parte de la familia de las cateninas, dentro de las cuales hay tres miembros, α -catenina, β -catenina y γ -catenina. La proteína β -catenina consiste en una región central compuesta por 12 repetidos Armadillo (ARM), flanqueados por un dominio amino-terminal (NTD) y un dominio carboxi-terminal (CTD), entre el último repetido ARM y la región flexible del CTD se encuentra una hélice-C conservada (Córdova et al, 2009).

De manera constitutiva, β -catenina puede hallarse unida a la proteína de membrana E-cadherina. Dentro del complejo de uniones adherentes β -catenina se une a α -catenina y modula indirectamente la actina, participando como intermediario en la unión entre las moléculas de adhesión y el citoesqueleto (Valenta et al., 2011; Córdova et al., 2009).

Durante muchos años se pensó que β -catenina participaba únicamente como proteína estructural en las uniones adherentes; sin embargo, hace 3 décadas aproximadamente, se logró establecer una segunda función para β -catenina como proteína importante en la señalización intracelular participando de manera

activa en la transcripción de genes involucrados con la proliferación celular (Essers et al., 2005; Hoogeboom et al., 2008; Lee et al., 2010; Yang et al., 2011; Tenbaum et al., 2012; Tian et al., 2012; Nusse et al., 2012; Zhang et al., 2012).

En condiciones normales, la concentración de β -catenina es regulada por el complejo de degradación dirigido por Gsk3- β , en el citoplasma, y por las uniones a caderinas y otros tipos de catenina, en la membrana celular (Kimelman y Xu, 2006; Córdova et al., 2009), sin embargo, existen mecanismos de activación de β -catenina que en algunas patologías pueden llegar a encontrarse alterados. En los siguientes párrafos se describen dichas vías alternas de activación (*Figura IV*).

Recientemente, el estudio molecular de enfermedades como el cáncer, ha iniciado la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos de mayor eficacia y más específicos para ciertos grupos de pacientes. La vía de Wnt es una vía de señalización involucrada en importantes procesos biológicos, estos van desde la diferenciación hasta la proliferación celular y la organogénesis. La activación de la vía canónica de Wnt se considera como un paso decisivo en la carcinogénesis en diversos tipos de tumores, en donde se le ha relacionado con un aumento de la supervivencia celular y la invasión como resultado de la activación de los efectores finales de la señalización mediada por β -catenina (Pérez-Placencia, et al., 2008; Saifo et al., 2010).

Se han descrito otras vías que río arriba de la inactivación del complejo de degradación, permiten la activación de β -catenina, como la estimulación de

receptores tirosina-cinasa (RTKs) y algunos receptores de factores de crecimiento (PDGFR, EGFR, entre otros). Esta señalización, en cáncer, se asocia a la transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso de transdiferenciación importante en la progresión del cáncer (Purcell et al., 2011; Valenta et al., 2012; Kannan et al., 2013).

A la fecha, β -catenina representa una plataforma de interacciones con diversas proteínas en la célula, el patrón de localización de β -catenina es determinante para que esta proteína lleve a cabo determinada función ya sea como parte de un complejo estructural en la célula, o bien, como una proteína de señalización involucrada con la transcripción, lo que le confiere una dualidad funcional.

Para que β -catenina pueda actuar como molécula de señalización, es necesario que ésta se encuentre en el núcleo. Una vez en el núcleo, puede asociarse a factores de transcripción de la familia TCF/Lef y dirigir la transcripción de genes blanco, tales como: c-myc, c-jun, Ciclina-D, entre otros. La transcripción de genes mediada por el complejo de β -catenina/TCF/Lef puede ser independiente de la vía de Wnt, estimulada por receptores de tirosina-cinasa (MacDonald et al., 2009).

EGFR es un miembro de la familia de receptores tirosina-cinasa que se encuentra sobre-expresado en diversos tipos de cáncer, asociándose a un bajo pronóstico y progresión de la enfermedad. A nivel molecular, EGFR es capaz de impedir la adhesión celular mediada por el complejo de E-cadherina y β -catenina al

promover la fosforilación de β -catenina en la Tyr333 por Src, y facilitar así su acumulación en núcleo. Una vez en el núcleo, β -catenina participa en la transcripción de genes que promueven la proliferación y crecimiento celular como c-jun, c-myc, ciclina D, entre otros (Lee et al., 2010; Yang et al., 2011).

Sin embargo, otros factores de transcripción también pueden proveer a β -catenina de una plataforma de unión al ADN, entre estos se encuentra el factor transcripcional FOXO, el cual se encuentra sobre-expresado en condiciones de estrés oxidativo (Essers et al., 2005). FOXO se une directamente a β -catenina para promover la transcripción de los genes blanco de FOXO. Puesto que FOXO compite con TCF por su unión a β -catenina se ha observado que incluso llega a secuestrar a β -catenina del complejo con TCF. Mientras que en una célula no neoplásica la transcripción de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, en una célula tumoral los mecanismos de transcripción están sobrerregulados, por lo que se ha propuesto que el exceso de proteínas de reparación de ADN y de daño celular pueden llegar a generar resistencia a fármacos y metástasis en cáncer (Hoogeboom et al., 2008; Tenbaum et al., 2012).

Recientemente, se ha sugerido una posible interacción entre la vía de señalización estimulada por TGF- β y la vía de señalización estimulada por Wnt. TGF- β -1 en particular, induce la TEM al estimular a Smad3, la cual protege a β -catenina de su degradación y facilitar su traslocación al núcleo, promoviendo así la unión de β -catenina a Smad3, y no a LEF-1, junto con TCF. En esta vía, β -catenina ha sido

identificada como co-factor necesario para la TEM dirigida por TGF- β -1, importante en la migración e invasión de las células tumorales en cáncer (Zhang et al., 2012; Tian et al., 2012).

Algunos factores de crecimiento (IGF e EGFR) pueden activar la proteína cinasa Akt, la cual bloquea la actividad de FOXO, promoviendo la fosforilación de β -catenina en la Ser552, lo cual conlleva al bloqueo de la restauración de la transcripción dirigida por TCF/ β -catenina (Valenta et al., 2012).

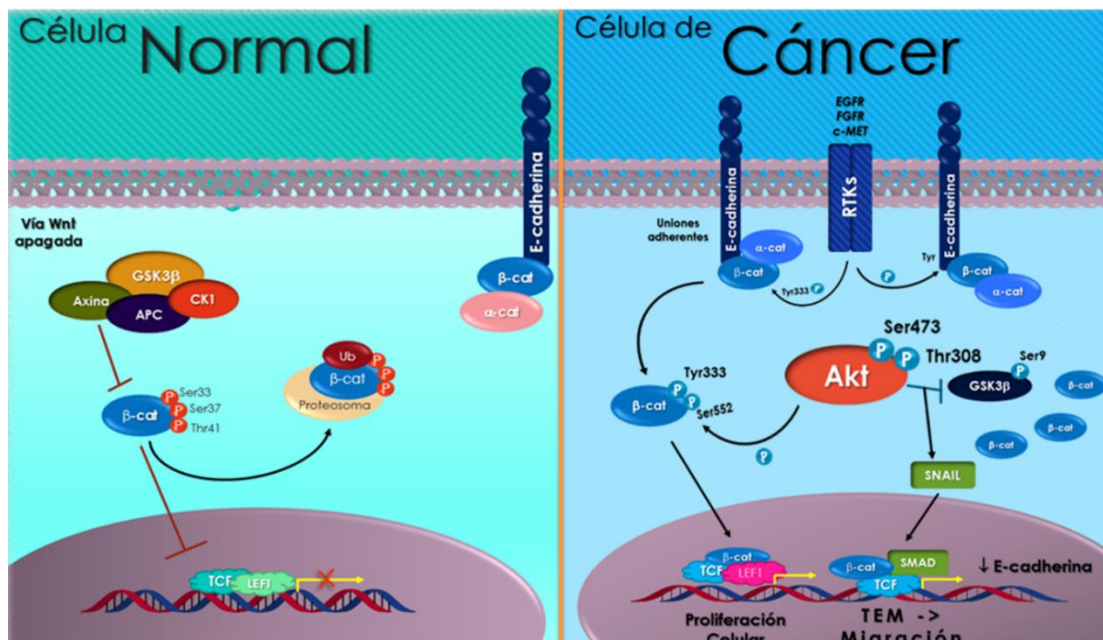


Figura IV. Vías de señalización mediadas por β -catenina en una célula normal y una célula tumoral. Dentro de la célula normal, la vía de Wnt se encuentra apagada y la concentración de β -catenina en citoplasma es regulada por el complejo de degradación dirigido por Gsk3- β ; estructuralmente se encontrará unida a cadherinas y α -catenina participando en uniones adherentes. En una célula tumoral, la señalización mediada por β -catenina suele ser independiente de Wnt y regulada por los complejos que forma en núcleo, donde podrá interactuar con TCF/Lef-1, TCF/Smad3, o con FOXO, que compite con TCF, (Hoogeboom et al., 2007; Lee et al., 2010; Yang et al., 2011; Tenbaum et al., 2012; Tian et al., 2013; Valenta et al., 2012 Zhang et al., 2013).

2. ANTECEDENTES

La regulación de la estabilidad o activación de β -catenina, depende principalmente de dos proteínas "cliente" de Hsp90: 1) Gsk3- β , que interviene en la fosforilación de β -catenina al ser parte del complejo de degradación; y 2) Akt, que regula de manera positiva a β -catenina, ya sea inactivando a Gsk3- β o bien, fosforilando directamente a β -catenina (Kimelman y Xu, 2006; Valenta et al., 2011). Dentro de las proteínas involucradas en regular activación o degradación de la proteína β -catenina, se ha mostrado que Hsp90 es importante en este proceso de mantenimiento de la actividad de β -catenina. En estudios recientes se ha sugerido la posible modulación de la activación por fosforilación de β -catenina basado en el papel de Hsp90 como chaperona de la función cinasa de su proteína "cliente" Gsk-3 β (Kurashina, et. al, 2009).

También, se ha propuesto que el complejo de Axin1/fosfo- β -catenina/Hsp90 es un regulador central de la proliferación celular vía GSK-3 β / β -catenina y que la inhibición de Hsp90 se traduce en la detención de la proliferación celular, así como en la inactivación de β -catenina (Cooper, et. al., 2011).

Entre las más de 200 proteínas "cliente" de Hsp90, las cinasas son el grupo más importante debido a la importancia que tienen en la señalización celular; dentro de estas, la cinasa B, o Akt (PKB) es una cinasa cuya estabilidad y activación es regulada de manera diferencial por las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β (Cortés-González et al., 2010). Por ello el patrón de expresión de estas isoformas afecta

de manera directa la activación de sus proteínas cliente y por ende de la señalización mediada por ellas.

Considerando que la investigación en cáncer sobre la señalización mediada por β -catenina es relativamente reciente, el conocimiento aún es limitado. Actualmente, comunidades científicas y médicas han reconocido a los inhibidores sintéticos de Hsp90 (proteína de choque térmico de 90kDa) como una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer, tanto como agentes individuales o en combinación con otras terapias (Al-Lazikani B. et al. 2012). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, Hsp90 α y Hsp90 β , son proteínas que se encuentran sobre-expresadas en varios tipos de cáncer y que a pesar de mantener una actividad intrínseca como chaperonas moleculares idéntica, su capacidad de interactuar y de activar distintas coproteínas oncogénicas puede ser diferente (Piccard, 2013; Millson et al., 2007).

En estudios recientes se ha demostrado que la efectividad de los inhibidores farmacológicos derivados de la GA es dependiente del tipo celular así como de la dosis/tiempo (Jhaveri et al., 2012; Li et al., 2010). Recientemente, en datos no publicados del laboratorio, se ha observado que la inhibición aguda de Hs90 con 17-DMAG promueve una inversión en el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer renal y de próstata, además, la sensibilidad y el efecto que pueda llegarse a observar con el uso de este inhibidor son: dependientes de dosis/tiempo (Franco-Gallardo et al; Datos no publicados).

Así mismo, previamente habíamos observado que Hsp90 α y Hsp90 β juegan un papel importante en la regulación y activación de β -catenina, en líneas celulares de cáncer cervical humano; se identificaron dos patrones diferenciales de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en un mismo tipo de cáncer, y dichos patrones se asociaron a diferentes patrones de expresión y activación de sus proteínas cliente Akt/Gsk3 β / β -catenina (Morales-Guadarrama, 2014).

Uno de los papeles que nos interesa estudiar sobre la señalización que media β -catenina es su función en procesos tempranos de la invasión, como los procesos de transición epitelio-mesénquima y la migración. En la última década, se ha demostrado ampliamente que las células de tumores epiteliales pueden experimentar una transdiferenciación celular que convierte a células de fenotipo epitelial en células con fenotipo mesénquimal, las cuales tienen la capacidad de migrar gracias a la degradación proteolítica y el remodelamiento de la matriz extracelular (Mehlen y Puisieux, 2006).

Además de la función estructural de β -catenina, su participación en la transcripción es importante para entender de qué manera regula la TEM y la migración; de manera interesante, se ha visto que Hsp90 α y Hsp90 β juegan un papel determinante en el mismo proceso, si bien a nivel subcelular puede regular la activación y estabilidad de β -catenina, se ha visto que de manera extracelular puede desencadenar la activación de proteínas mediadoras de la migración, la

degradación de la matriz extracelular y su remodelamiento (Eustace et al., 2004; Sidera et al., 2008; Sidera y Parsavoudi , 2008).

Por lo anterior, en este estudio proponemos que la inhibición farmacológica aguda de Hsp90 con 17-DMAG promoverá la inversión del perfil de expresión de las isoformas y afectará la activación de sus oncoproteínas "cliente", lo cual se traducirá funcionalmente en una disminución de la migración celular en un modelo *in vitro* de cáncer cervical.

3. HIPÓTESIS

Considerando que las vías de señalización mediadas por β -catenina en cáncer son reguladas diferencialmente por dos proteínas "cliente" de Hsp90 (Akt y GSK3- β), proponemos que la sobre-expresión de Hsp90 α promoverá el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG al prevenir la activación de β -catenina, mientras que la sobre-expresión de Hsp90 β prevendrá dicho efecto.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto funcional del inhibidor 17-DMAG en la migración celular mediada por la activación de Akt/ β -catenina y regulada por Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer de cérvix.

4.1. Objetivos Particulares

- Determinar el efecto funcional del 17-DMAG sobre la migración celular en las líneas celulares de CC.
- Determinar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β y su relación con la activación de las proteínas "cliente" de interés.
- Identificar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el patrón de localización intracelular y extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de cáncer cervical.
- Determinar el efecto de la inhibición con 17-DMAG, sobre el patrón de co-localización e interacción de Hsp90 α y Hsp90 β con las proteínas "cliente" de interés.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Mantenimiento de cultivo celular

Se emplearon cuatro líneas celulares tumorales de cérvix (detalles en Tabla III), y la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, HaCat, ésta última se empleó como control. Los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM y DMEM-F12, respectivamente, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico penicilina/estreptomicina para su mantenimiento.

Línea celular	HeLa	C33a
<i>Tejido de origen</i>	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide de células escamosas
<i>VPH</i>	VPH18	VPH(-)
<i>p53</i>	p53+	p53mut
	Baja expresión	(Codón 273, cambio de Arg -> Cys)
		Alta expresión
<i># Céls por ensayo</i> <i>(85-90%)</i>	70, 000 céls	85,000 céls

Tabla III. Breve descripción de las líneas celulares neoplásicas de cérvix empleadas en el proyecto.

5.2. Ensayo de migración celular

Para cuantificar y determinar el efecto funcional de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular, se empleó la metodología del ensayo de cierre de herida y

vídeo-microscopía (time-lapse). Para realizar los ensayos, las células fueron sembradas en placas de 24 para quedar a una confluencia aproximada del 85-90%, debido a la diferencia de tamaños entre ambas líneas celulares, la cantidad de células varió entre una línea y otra. En la Tabla I, se muestra la cantidad requerida por cada línea celular para las placas de 24 pozos. Una vez que la morfología y la confluencia fueron las adecuadas para realizar el ensayo, se sincronizó el ciclo celular del cultivo mediante la deprivación de suero fetal bovino en el medio.

5.2.1. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG

Se emplearon dos concentraciones del inhibidor para evaluar el efecto anti-migratorio del 17-DMAG, las cuales fueron determinadas anteriormente a partir de resultados obtenidos de proliferación celular. Las concentraciones empleadas fueron [50nM] y [500nM]. Los tiempos de cierre de herida en el control y los tratamientos se determinaron mediante video-microscopía o time-lapse.

5.2.2. Video-microscopía (time lapse).

Con la finalidad de determinar el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG se llevaron a cabo diversos time-lapse empleando el microscopio invertido AxioVert 200M® (Carl Zeiss), las imágenes fueron editadas y analizadas en el software ZenBlue® (Carl Zeiss). El análisis de los datos recopilados se llevó a cabo

mediante un Macros para evaluar migración celular en el programa ImageJ®, mientras que el análisis estadístico se llevó a cabo en el software SigmaPlot ®

5.3. Extracción de proteínas

5.3.1. Proteínas totales

La extracción se realizó a partir de cajas de 10mm² con una confluencia del 80 al 90%, empleando el buffer de lisis celular NP40, (NaCl 150 Mm), NP-40 (1%) y Tris-Cl (50 mM, pH 8); se adicionó con inhibidor de proteasas y fosfatasas al 1x. La eficiencia de la extracción e integridad de las proteínas extraídas se corroboró mediante el corrimiento en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie, mientras que los perfiles de expresión se evaluaron por medio de Western blot. Para las células tratadas, la concentración del fármaco y el tiempo de extracción se determinó en función de los cambios observados en la migración.

5.3.2. Enriquecimiento de Proteínas de Medio Extracelular

El enriquecimiento de las proteínas del medio extracelular se realizó mediante tubos Amicon Ultra-4 centrifugal Filter ® de Millipore. Previo al ensayo, las células se cultivaron las líneas celulares en medio de cultivo sin SFB por 24h. Antes de la extracción y enriquecimiento; es necesario partir de aproximadamente 8 millones de células de cada línea celular y tratamiento no comprendo esta oración La eficiencia de la extracción e integridad de las proteínas extraídas se corroboró

mediante el corrimiento en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y su posterior tinción con azul de Coomassie. La concentración del inhibidor de Hsp90 y el tiempo de extracción se determinaron en función de los cambios obtenidos en los ensayos de migración celular. Los perfiles de expresión a nivel de proteína se evaluaron por ensayos de Western blot.

5.4. Co-Immunoprecipitación de Hsp90 α y Hsp90 β

A partir de 500 μ g de extracto total de cada grupo de interés (controles y tratadas), se realizaron ensayos de co-inmuprecipitación empleando perlas magnéticas (The Dynabeads® Protein G Immunoprecipitation Kit, #10007D de Novex®) las cuales fueron acopladas a 2 μ g de anticuerpo de Hsp90 α o Hsp90 β (Millipore). Los inmunocomplejos obtenidos fueron analizados por ensayos de Western blot y por SDS-PAGE teñido con Azul brillante de Coomassie. Para las células tratadas, la concentración del 17-DMAG y el tiempo de extracción se determinó en función de los cambios en la migración.

5.5. Inmunofluorescencias y co-inmunofluorescencias

A partir de monocapas de células fijadas en laminillas Chamber Slides de LabTek, se llevaron a cabo las inmunofluorescencias y co-inmunofluorescencias de cada línea celular y tratamiento. La confluencia para llevar a cabo cada ensayo fue del 80%, y las imágenes fueron obtenidas, empleando el microscopio de

epifluorescencia AxiolImage® (Carl Zeiss). Para el manejo y edición de las imágenes se empleó el software ZenBlue® (Carl Zeiss) y el análisis estadístico se llevó a cabo en SigmaPlot®. La concentración del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, y el tiempo de extracción se determinaron en función de los cambios observados en la migración.

Para comprender la implicación de las proteínas sobre dicho fenómeno, se evaluó la localización de las proteínas de interés en las células cercanas a la herida y las células de la monocapa. La integridad nuclear fue validada por medio de la tinción con DAPI, y para identificar la localización de las proteínas de interés se emplearon anticuerpos secundarios indicados en la *Tabla IV*.

<i>Anticuerpo Primario</i>	<i>Marca</i>	<i>Anticuerpo Secundario</i>	<i>Marcador fluorescente</i>
Hsp90 α	Millipore	Rabbit	AlexaFluor488 Cy3.5
Hsp90 β	Millipore	Goat	AlexaFluor488 AlexaFluor568
β -catenina Activada	Millipore	Mouse	AlexaFluor488 AlexaFluor568
p-AktSer473	Millipore	Mouse	AlexaFluor488
p-AktThr308	Millipore	Rabbit	AlexaFluor488 AlexaFluor568

Tabla IV. Anticuerpos empleados en las inmunofluorescencias y ensayos de Western blot

5.6. Electroforesis y electro-transferencia de las proteínas extraídas en geles SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles SDS-PAGE al 10% para los perfiles de expresión total y los perfiles de localización, y al 8% para los perfiles de interacción (inmunocomplejos). Uno de los geles por cada experimento fue empleado para teñir con Azul de Coomassie (Coomassie R-250, Sigma) para validar la integridad de los extractos; mientras que el otro fue empleado para llevar a cabo transferencia electroforética en cámaras semi-seca (BioRad) de las proteínas, a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) previamente permeabilizadas. Para corroborar la eficiencia de las electrotransferencias; previo al bloqueo, las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau (Ponceau S P-3504, Sigma).

5.7. Inmunodetección por ensayos de Western blot (WB).

Una vez transferido el gel de SDS-PAGE a membranas de PVDF, se procedió a bloquear la membrana en leche baja en grasa al 5% durante 190 37°C o toda la noche, dependiendo de la proteína a detectar.

En cada ensayo de WB, las membranas fueron incubadas con su anticuerpo primario durante una hora y media a 37°C o toda la noche, dependiendo de la proteína o el anticuerpo a analizar, los anticuerpos empleados se encuentran en

la *Tabla IV*. Al término de cada incubación se realizaron una serie de al menos 5 lavados, de 10 minutos cada uno, con TBS-Tween al 1%.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario específico (anti-goat #V805A de PROMEGA, anti-rabbit #AP132P, o anti-mouse #AP124P de Millipore) durante una hora a temperatura ambiente. Después de una serie de al menos ocho lavados, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (kit Chemiluminiscent HRP Substrate, Invitrogen) y reveladas en placas radiográficas (Kodak).

Para digitalizar las placas radiográficas de los Western blots obtenidos se empleó el programa LabScan™ 6.0 (Swiss Institute of Bioinformatics, GE Healthcare). Esto se llevó a cabo en el digitalizador ImageScanner III, GE Healthcare.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer de cérvix.

Para determinar el efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90 se evaluó, mediante ensayos de herida, la migración celular de las líneas celulares HeLa y C33a. Para ello se emplearon las concentraciones de 50nM y 500nM, del 17-DMAG, desde 0 horas y hasta el cierre de herida de las células sin tratamiento.

En la línea celular HeLa, el tiempo final de cierre de herida fue de 24 horas, mientras que para la línea celular C33a fue hasta las 72 horas (Figura 1a y 1c). En la línea celular HeLa, la inhibición con ambas dosis logró detener la migración celular con diferencias significativas, con respecto al control ($p < 0.001$), demostrando una sensibilidad a la inhibición sin efectos tóxicos (Figura 1b).

Por el contrario, en la línea celular C33a únicamente se observó un efecto a la concentración de 500nM del inhibidor 17-DMAG (Figura 1d). Si bien el efecto anti-migratorio del 17-DMAG tuvo significancia con respecto al control ($p < 0.001$), la inhibición de la migración en estas células fue menor a la observada en la línea celular HeLa, en donde la migración celular disminuyó hasta un 40%.

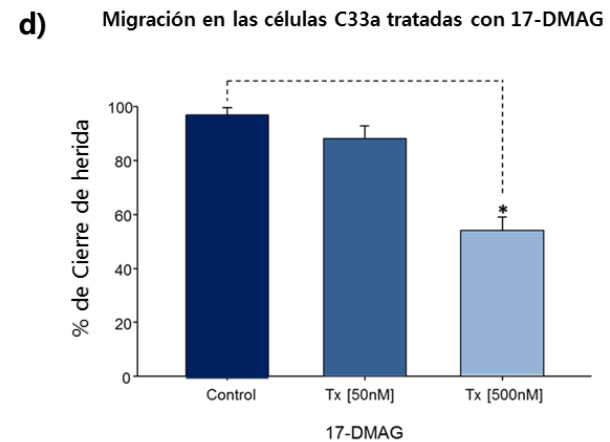
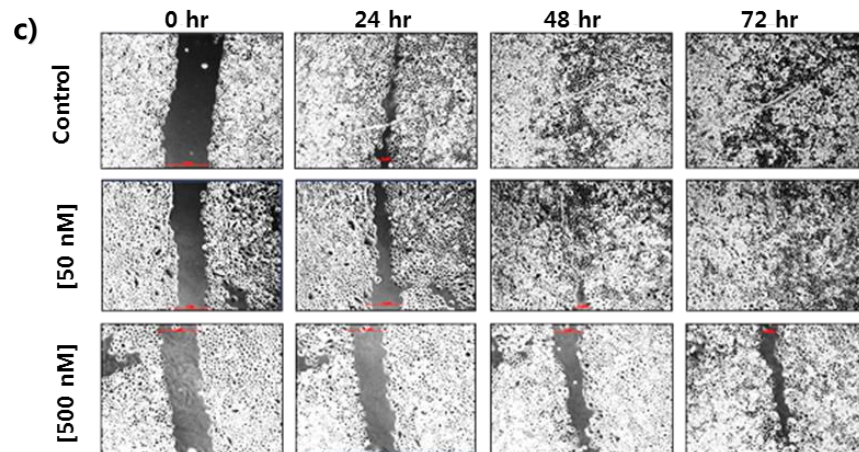
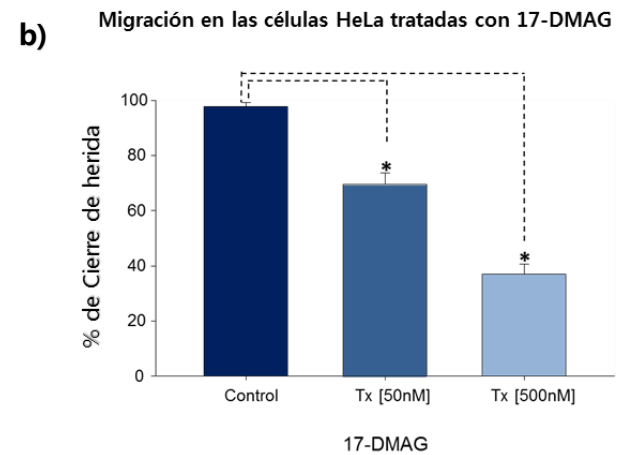
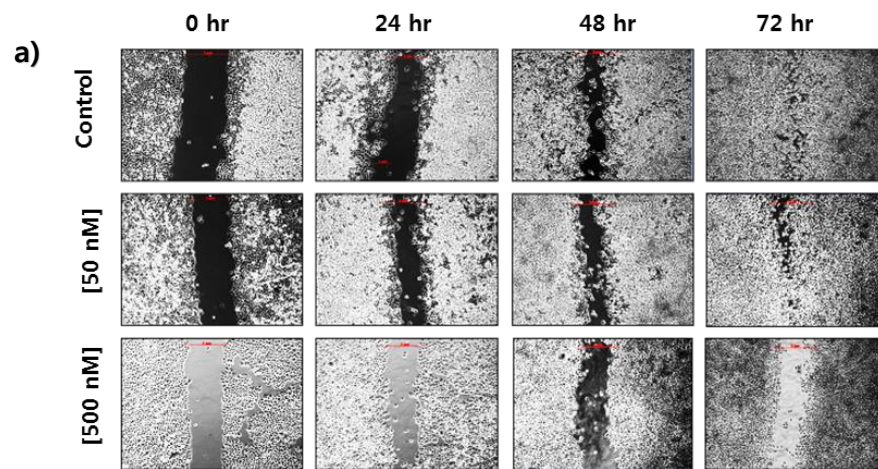


Figura 1. Efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG. *Figura 1a.* *Time-laps* representativos de los ensayos de herida, en la línea celular HeLa tratada con [50nM] y [500nM]. *Figura 1b.* Gráfica del porcentaje de cierre de herida en la línea celular HeLa tratada con 17-DMAG en concentraciones de [50nM] y [500nM]; ambos tratamientos presentaron diferencias significativas. *Figura 1c.* *Time-laps* representativos de los ensayos de herida, en la línea celular C33a tratada con [50nM] y [500nM]. *Figura 1d.* Gráfica del porcentaje de cierre de herida en la línea celular C33a tratada con el inhibidor 17-DMAG en concentraciones de [50nM] y [500nM]; únicamente se presentaron diferencias significativas en la dosis de [500nM]. Los experimentos se realizaron por triplicado, $p < 0.001$.

6.2. Inversión del perfil de expresión entre Hsp90 α y Hsp90 β , y su participación diferencial sobre la activación de sus proteínas "cliente"

Para explicar si el efecto anti-migratorio de la inhibición de Hsp90 se asociaba a un cambio en el patrón de expresión entre Hsp90 α y Hsp90 β , se evaluó por western blot la expresión de las isoformas y la activación/inactivación por fosforilación de sus proteínas "cliente". Dicho perfil se obtuvo a partir de extractos de las células sin tratamiento y con tratamiento de 17-DMAG [500nM], a los tiempos en donde se observaron cambios (24 hr para HeLa y 48 hr para C33a).

Los perfiles de expresión obtenidos muestran claramente que el inhibidor 17-DMAG afecta la expresión de Hsp90 α , más no la de Hsp90 β (*Figura 2*). En la línea celular HeLa se observó la disminución de la expresión de la isoforma Hsp90 α mientras que en la línea celular C33a se aprecia claramente el incremento de la expresión de esta misma isoforma.

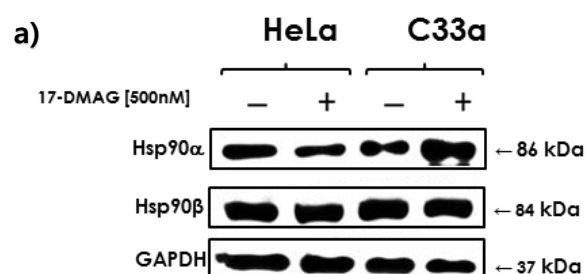


Figura 2. Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β . *Figura 2a.* Perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en las células HeLa y C33a, control y tratadas con 17-DMAG [500Nm], a 24 h y 48 h, respectivamente.

De manera interesante, la activación de β -catenina y los niveles de su forma fosforilada para degradación se asociaron al cambio en Hsp90 α promovido por el 17-DMAG. En la línea celular HeLa la disminución de Hsp90 α se asoció a una disminución notable de la β -catenina activada y una consecuente aparición de la fosforilación de β -catenina, cabe destacar que en estas células se observó sensibilidad al efecto anti-migratorio del 17-DMAG. Por otra parte, en la línea celular C33a el aumento de la isoforma Hsp90 α se asoció al mantenimiento de los niveles de β -catenina activada y la disminución de su forma fosforilada (*Figura 3a*).

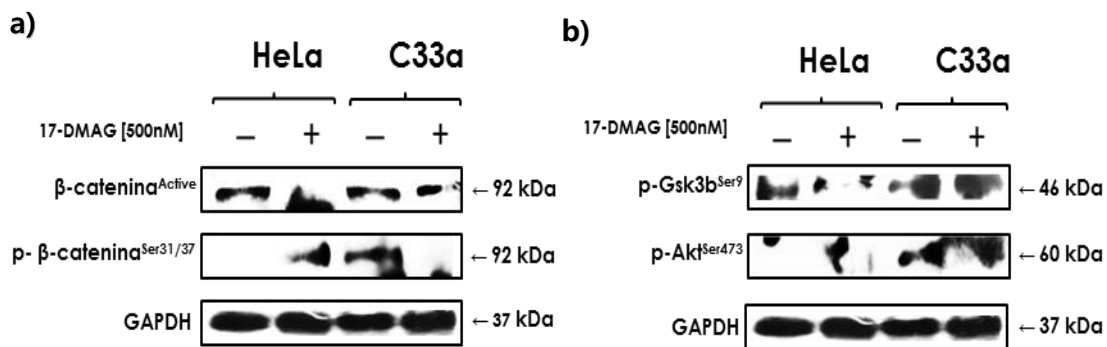


Figura 3. Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el perfil de activación/inactivación de las proteínas "cliente" de Hsp90. *Figura 3a.* Perfil de activación de β -catenina en las líneas celulares HeLa y C33a control y tratadas con 17-DMAG [500nM], a 24 h y 48 h, respectivamente. *Figura 3b.* Perfil de expresión de las proteínas "cliente" de Hsp90 fosforiladas, en las líneas celulares HeLa y C33a control y tratadas con 17-DMAG [500nM], a 24 h y 48 h, respectivamente.

El efecto del inhibidor sobre los reguladores de la activación/degradación de β -catenina, Gsk3- β y Akt únicamente se vieron asociados en la línea celular C33a, en donde se observó un aumento de la inactivación por fosforilación de Gsk3- β

en la Serina 9 y la activación de Akt por fosforilación en la Treonina 308, asociado a la disminución de la degradación de β -catenina y el mantenimiento de su activación (*Figura 3b*).

6.3. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la localización subcelular y extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β

El patrón de localización de las proteínas de choque térmico es de suma importancia puesto que condiciona su interacción con determinadas proteínas; por ello nos interesó conocer el patrón de localización intracelular y extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β y determinar si existía una asociación con el fenotipo de las líneas celulares. Por medio de inmunofluorescencia, se determinó la localización intracelular de ambas isoformas en las líneas celulares de cáncer cervical HeLa y C33a.

De manera constitutiva, las células HeLa presentaron fuerte marca nucleoplásmica homogénea y moteada, así como la marca citosólica –que era de esperarse– de Hsp90 α (figura 4a); por otra parte, el patrón de localización de Hsp90 β se observó exclusivamente a nivel del citosol y con mucho menor intensidad que la marca de la isoforma Hsp90 α .

El patrón de co-localización entre ambas isoformas fue bajo; sin embargo, el tratamiento promovió no sólo la disminución de la marca de Hsp90 α y un consecuente aumento en la isoforma Hsp90 β , sino también la pérdida de la marca

nucleoplásmica de Hsp90 α en estas células y un aumento en la co-localización de ambas isoformas (*figura 4b*).

De manera contrastante, en la línea celular C33a la isoforma Hsp90 α presentó un patrón granulado en el citosol, acumulación perinuclear y nucleoplásmico homogéneo; mientras que la isoforma Hsp90 β se observó marca citosólica y nucleoplásmica moteada. La proporción de la marca nucleocitoplasmática de Hsp90 α en la línea C33a fue menor, de manera significativa, que la observada en la línea celular HeLa ($p < 0.01$), (*figura 4c, 4e*).

Uno de los hallazgos más interesantes en este proyecto fue el efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el patrón de localización de estas proteínas, en la línea celular C33a, resistente al efecto anti-migratorio del 17-DMAG, se observó que la proporción de células con marca nucleoplásmica homogénea aumentó con la inhibición, además de incrementar la señal de Hsp90 α sobre la señal de Hsp90 β (*figura 4d*).

Este trabajo muestra, por primera vez, la asociación de la pérdida o ganancia de la isoforma Hsp90 α en núcleo con la sensibilidad o resistencia, respectivamente, al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90 (*figura 4b, 4c*).

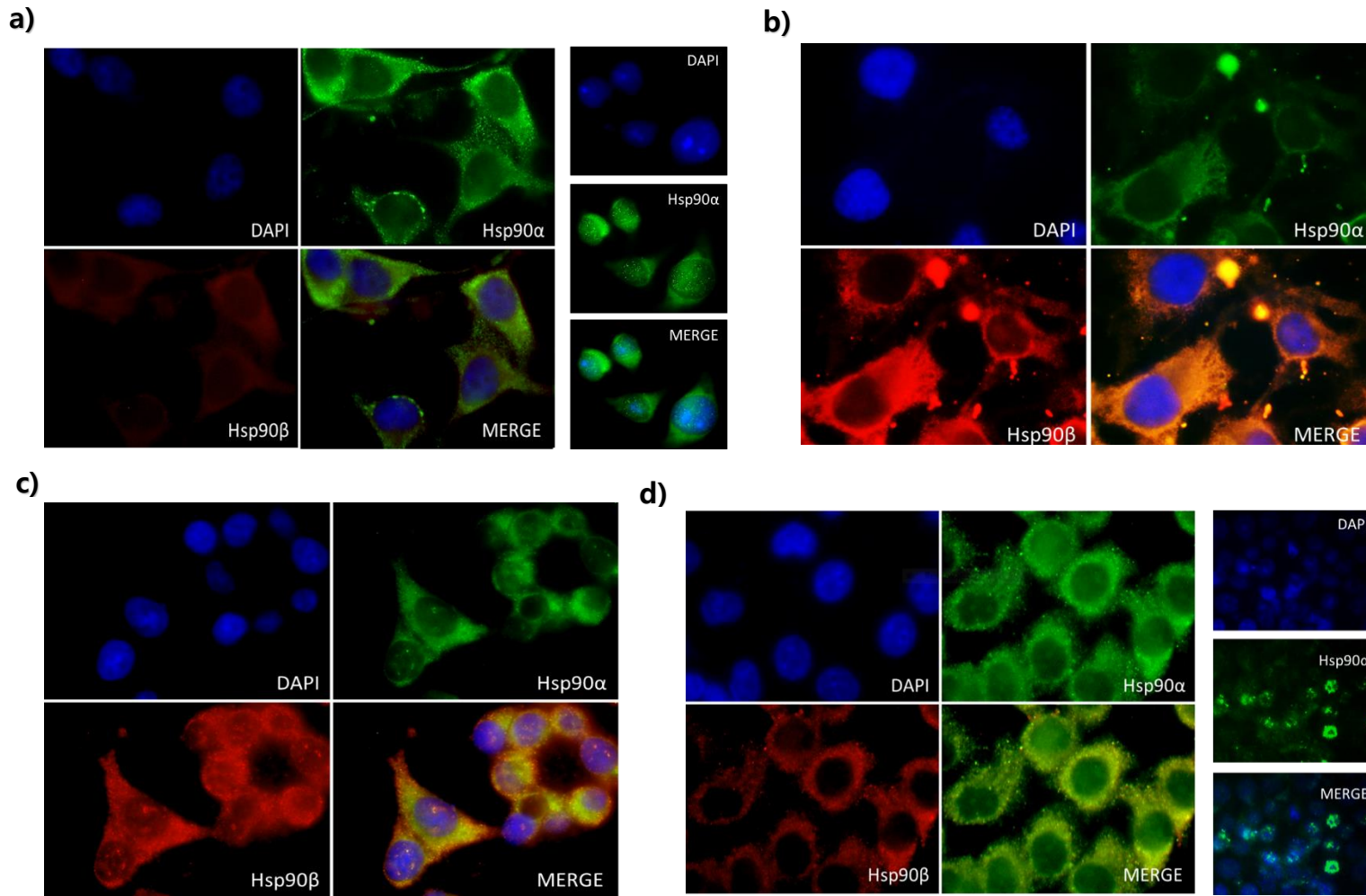


Figura 4. Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90 sobre el patrón de localización intracelular de Hsp90α y Hsp90β en líneas de cáncer cervical tratadas con 17-DMAG [500nM], Figura 4a. Perfil de localización de Hsp90α y Hsp90β en la línea celular HeLa sin tratar, *Figura 4b.* Cambio en el patrón de las isoformas, en la línea celular HeLa tras una exposición de 24 h a la concentración de [500nM]. *Figura 4c.* Perfil de localización de Hsp90α y Hsp90β en la línea celular C33a sin tratar, *Figura 4d.* Cambio en el patrón de las isoformas, en C33a tras una exposición de 48 h a la concentración de [500nM]. *Figura 4e,* Proporción de marca núcleo/citoplasma de la localización de Hsp90α

En el orden de conocer la presencia extracelular de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β y su asociación con la capacidad migratoria de las células de cáncer cervical, se detectó por western blot, la presencia de las isoformas en el medio extracelular.

En la línea celular HeLa, de manera previa al tratamiento, se observó la presencia extracelular de Hsp90 α , sin embargo, dicha localización se perdió al dar el tratamiento con el inhibidor 17-DMAG [500nM], asociando este cambio en el patrón de localización a la sensibilidad al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90 (*figura 5*).

En la línea celular C33a se observó un efecto que el tratamiento con 17-DMAG también afecta la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β . Antes del tratamiento se encontró la presencia extracelular de Hsp90 β y no así de Hsp90 α , de manera interesante se observó que el tratamiento con 17-DMAG promueve la pérdida de Hsp90 β extracelular y la presencia extracelular de la isoforma Hsp90 α (*figura 5*).

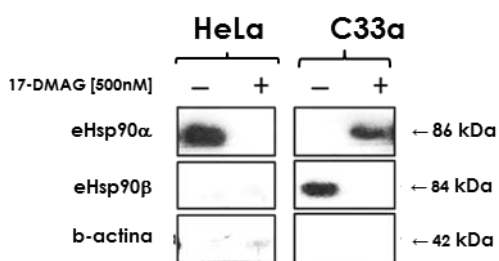


Figura 5. Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG sobre la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β . El inhibidor promueve la inversión del perfil de localización entre Hsp90 α y Hsp90 β en ambas líneas celulares de CC.

6.4. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre el patrón de co-localización e interacción de Hsp90 α y Hsp90 β con sus proteínas "cliente"

Finalmente, para determinar si la inhibición no sólo afecta la expresión y localización extracelular de las isoformas, sino su co-localización e interacción con sus proteínas "cliente", se procedió a evaluar la co-localización de Hsp90 α , Hsp90 β y β -catenina, por medio de ensayos de co-inmunofluorescencia.

En la figura 6 observamos que en la línea celular HeLa el patrón de co-localización para ambas proteínas "cliente" con Hsp90 α es a nivel del núcleo, en donde observamos una alta co-localización nucleoplásmica homogénea de Hsp90 α y β -catenina. Sin embargo, se observó que el tratamiento con el inhibidor de Hsp90 promueve la disminución de la marca nucleoplásmica moteada de β -catenina, así como la pérdida de co-localización con Hsp90 α (*figura 6a, 6c*).

En cuanto al patrón de co-localización de Hsp90 β con β -catenina, no se observaron cambios ni presencia de co-localización entre ambas proteínas ni antes ni después del tratamiento con 17-DMAG (*figura 6b, 6d*).

Para validar no sólo la co-localización sino la interacción de las isoformas con su proteína "cliente" β -catenina, se realizaron las co-inmunoprecipitaciones de Hsp90 α con β -catenina y Hsp90 β con β -catenina. Se observó que el tratamiento disminuye la interacción de entre Hsp90 α con β -catenina activada sin abatirla, mientras que Hsp90 β no presenta interacción antes ni después del tratamiento con β -catenina (*figura 6e*)

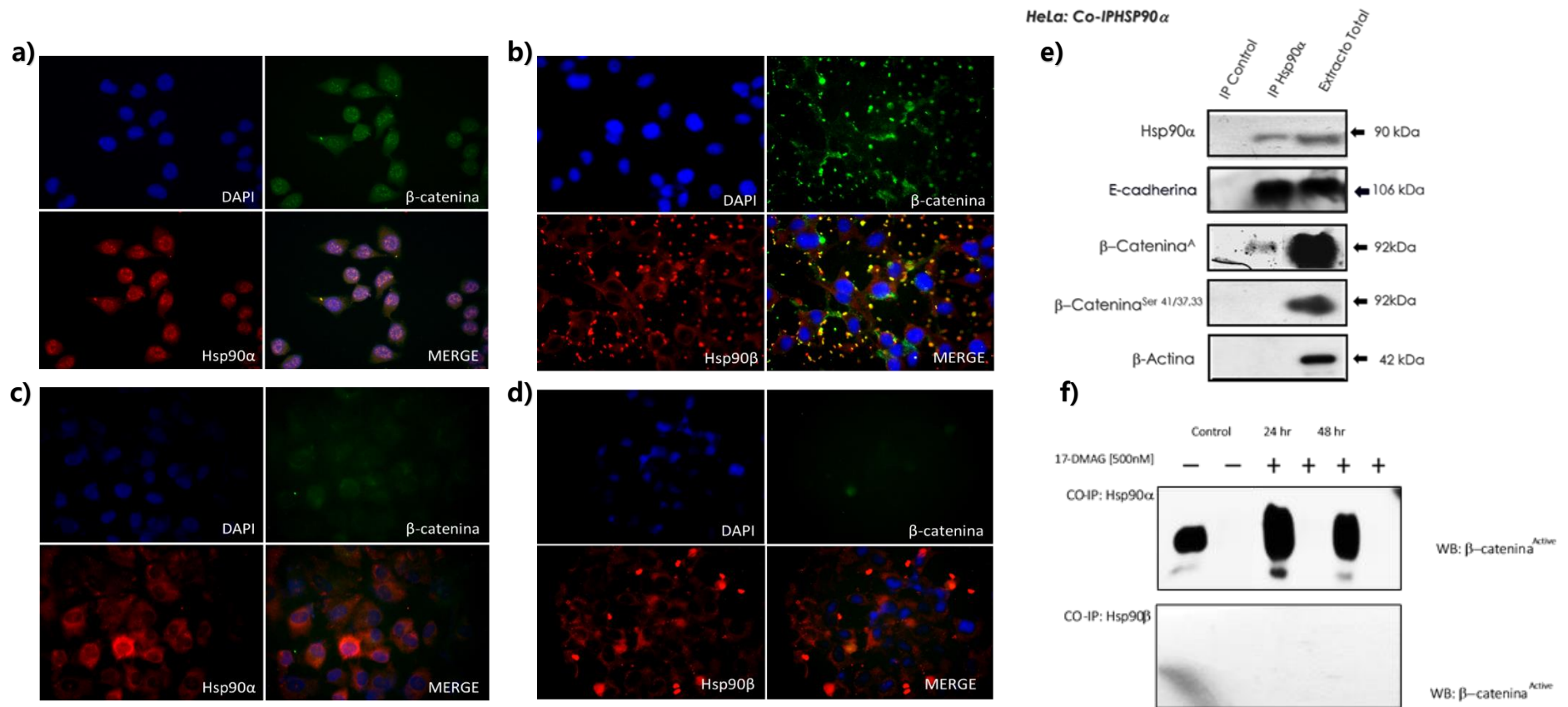


Figura 6. Efecto de la inhibición farmacológica de Hsp90, sobre el patrón de co-localización e interacción de Hsp90α y Hsp90β, con su proteína "cliente" β-catenina, en la línea celular de cáncer cervical HeLa tratadas con 17-DMAG [500nM], *Figura 6a*. Perfil de co-localización de Hsp90α y β-catenina en la línea celular HeLa sin tratar, *Figura 6b*. Perfil de co-localización de Hsp90β y β-catenina en células HeLa sin tratamiento. *Figura 6c*. Se muestra la pérdida de la localización constitutiva de las proteínas de interés, la co-localización entre Hsp90α y β-catenina, así como una disminución en la intensidad de la señal de la proteína "cliente" de Hsp90, β-catenina. *Figura 6d*. Se muestra la disminución de la señal de β-catenina y la pérdida de co-localización entre Hsp90β y β-catenina. *Figura 6e*, En la línea celular HeLa, Hsp90α interactúa exclusivamente con la forma activa más no con la degradada, así como con la E-cadherina. *Figura 6f*, La dosis empleada en los tratamientos de inhibición parecen únicamente disminuir paulatinamente la interacción de la chaperona molecular y su proteína "cliente"

De manera interesante, observamos que la isoforma Hsp90 α , interactúa exclusivamente con la forma activa de β -catenina y con E-cadherina, más no así con la forma fosforilada para degradación de β -catenina, mostrando la importancia de esta isoforma para la activación de su proteína "cliente" (figura 6e).

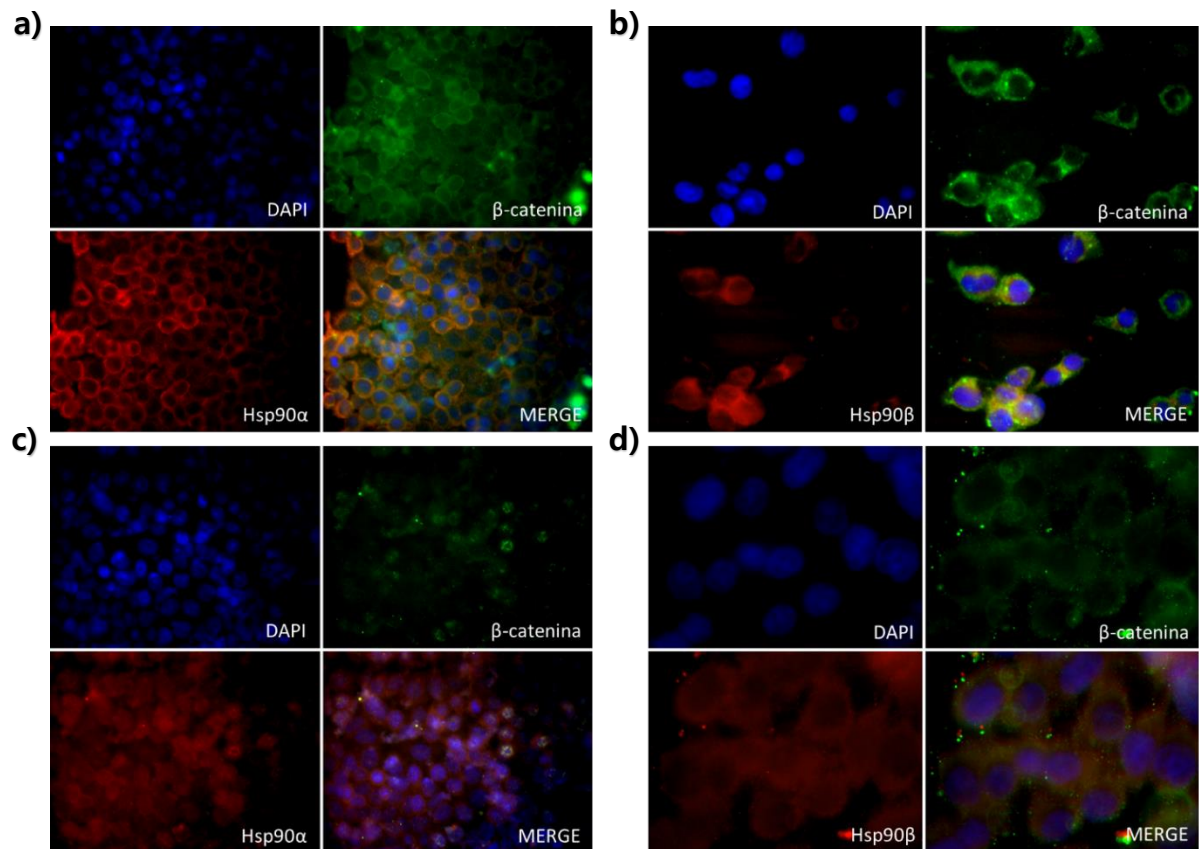


Figura 7. Efecto del inhibidor 17-DMAG [500nM], sobre el patrón de co-localización intracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , con su proteína "cliente" β -catenina, en la línea celular de cáncer cervical C33a. *Figura 7a.* Perfil de co-localización de Hsp90 α y β -catenina en la línea celular C33a sin tratamiento, *Figura 7b,* Perfil de co-localización de Hsp90 β y β -catenina en células C33a sin tratamiento. *Figura 7c.* Se muestra la pérdida de la localización constitutiva de las proteínas de interés, la co-localización entre Hsp90 α y β -catenina, si bien se observa no una disminución en la intensidad de la señal de la proteína "cliente" de Hsp90, β -catenina. *Figura 7d.* Se muestra la disminución de la señal de β -catenina sin pérdida total de co-localización entre Hsp90 β y β -catenina.

Por otro lado, en la línea celular C33a, observamos un patrón de co-localización entre Hsp90 α y β -catenina a nivel del citoplasma; si bien β -catenina presenta un patrón de localización nucleoplásmica, esta no co-localiza con la isoforma Hsp90 α (*figura 7a*). Sin embargo, el tratamiento con inhibidor 17-DMAG [500nM], promueve la co-localización entre Hsp90 α y β -catenina en un patrón nucleoplásmico moteado (*figura 7c*).

Respecto al patrón de co-localización de Hsp90 β con β -catenina se mantiene a nivel del citoplasma tanto en las células no tratadas como en las células expuestas al inhibidor 17-DMAG [500nM], esto se asocia con los perfiles de expresión de Hsp90 β y β -catenina en donde observamos que ambos niveles se mantienen de la misma forma (*figura 7d, 2a y 3a*).

Lo anterior demuestra la importancia de la isoforma se observó la ausencia de co-localización entre la isoforma Hsp90 α y Hsp90 β sobre la activación de β -catenina, y su asociación funcional con el proceso de migración celular, así como con el fenotipo de sensibilidad o resistencia a los inhibidores de Hsp90, como el 17-DMAG.

7. DISCUSIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades considerado como un problema de salud pública actualmente. Se sabe que es un padecimiento agresivo, sin embargo, se ha visto que en ocasiones la agresividad de los tumores puede variar pese a tratarse de tumores en el mismo órgano, esto se debe principalmente a la desregulación de las principales vías del mantenimiento celular mediante mutaciones o cambios en los patrones de expresión de los elementos involucrados en la señalización constitutiva de las células (NCI, 2016).

Uno de los elementos más importantes en la sobre activación sostenida de las vías desreguladas en cáncer es la subfamilia de proteínas de choque térmico de 90 kDa, Hsp90 (Taipale et al., 2010). Dentro de esta subfamilia multigénica de chaperonas, las isoformas citosólicas Hsp90 α y Hsp90 β son las más abundantes, han sido tema de investigación exhaustiva en recientes décadas debido a que pese a su alta homología pueden regular de manera diferencial a un conjunto de proteínas "cliente" dentro de las que se encuentran diversos transductores de señales, cinasas y factores de transcripción (citas).

En el presente trabajo, se muestra por primera vez, la asociación de la expresión y localización diferencial de Hps90 α y Hsp90 β a la migración celular y el fenotipo agresivo de las líneas de cáncer cervical HeLa y C33a. Además, se muestra de manera novedosa, la asociación del patrón de localización e interacción entre

Hsp90 α y β -catenina con la resistencia o sensibilidad al efecto anti-migratorio del inhibidor farmacológico de Hsp90, 17-DMAG.

7.1. Las líneas celulares de CaCu tienen una sensibilidad diferencial al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG.

Si bien se ha descrito la sobreexpresión de Hsp90 en cáncer como una cualidad distintiva de las células tumorales, el conocimiento referente al papel diferencial de las isoformas aún es limitado. Este estudio muestra evidencia de que la expresión diferencial de Hsp90 α y Hsp90 β se asocia al fenotipo invasivo de las líneas celulares de CaCu empleadas en el presente trabajo.

Previamente, se habían determinado dos patrones diferenciales de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares HeLa y C33a, asociados a la sensibilidad al efecto anti-proliferativo de la inhibición de Hsp90, con 17-DMAG, (Morales-Guadarrama, 2014).

Se ha reportado que la sobre-expresión de la isoforma de Hsp90 α se asocia a mayor invasividad y promoción de metástasis en tumores de cáncer colorectal, mama, melanomas y leucemias, entre otros (Eustace, et. al., 2004; Milicevic, 2008; Wang, 2009); consistente con lo anterior, observamos que la línea celular HeLa, que de manera constitutiva sobre-expresa Hsp90 α , presenta mayor capacidad de migración y, de manera interesante, también presenta mayor sensibilidad al efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG.

Lo anterior posiblemente se explique por lo obtenido en los ensayos de inhibición, en donde la disminución de la expresión de Hsp90 α y el mantenimiento de la expresión de Hsp90 β fue el patrón de inversión asociado a la sensibilidad al inhibidor farmacológico de Hsp90.

Por otra parte, Hsp90 β se ha reportado asociada a un mal pronóstico y la promoción de metástasis linfática en cáncer de pulmón, además de que la sobreexpresión de esta isoforma suele presentarse en carcinomas menos diferenciados (Milicevic et al., 2008; Biaoxue et al., 2012). En este proyecto, la línea celular C33a exhibió mayor expresión de Hsp90 β y pese a que el fenotipo es menos invasivo que el de la línea celular HeLa (figura 1) las células presentaron resistencia al efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG.

En este modelo celular donde la línea celular mostró resistencia al efecto del inhibidor, dicho fenotipo se asoció a la inversión en la expresión de las isoformas en el cual, la isoforma Hsp90 α aumentó notablemente tras el tratamiento. Además de lo anterior, la resistencia observada en estas líneas es consistente con lo reportado sobre la presencia de genes de resistencia a fármacos, *MDRs* en la línea celular C33a, (Hines et al., 2007).

7.2. El patrón de localización nucleoplásmica moteada de Hsp90 α se asocia a la sensibilidad o resistencia al efecto anti-migratorio del 17-DMAG

Uno de los patrones importantes que definen la función de una proteína es la localización que pueden tener en los diferentes compartimentos celulares, si bien las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β se consideran principalmente citosólicas, se ha visto que pueden llegar a localización en membrana (Eustace et al., 2004; Milicevic et al., 2012) y en núcleo (Leclerc et al., 1999; Dittmar y Pratt, 1997).

La participación nuclear de Hsp90 se ha asociado principalmente a la regulación de factores de transcripción, principalmente se ha visto su relación con receptores de hormonas esteroideas (Longer et al., 2003; Samakovli et al., 2014); se ha estudiado que incluso existen secuencias en el dominio C-terminal que previene la traslocación nuclear, por lo que ésta depende enteramente de la interacción con sus co-chaperonas o bien, con sus proteínas "cliente" (Passinen et al., 2001; Longshaw et al., 2004).

Uno de los fenómenos más relevantes de este estudio, fue el descubrimiento de la asociación de la localización nuclear de Hsp90 α con la sensibilidad al tratamiento con el inhibidor 17-DMAG en la línea celular HeLa. En esta línea celular se observó un patrón nucleocitoplásmico homogéneo y moteado en el 90% de las células, el cual, tras el tratamiento con 17-DMAG, desapareció y disminuyó la proporción de marca citoplásmica; se ha reportado que la administración de la Geldanamicina (en este caso de un derivado de ella) provoca la pérdida de la función nuclear de Hsp90 α cuando esta regresa a citosol, en donde puede ser inhibido por la GA (Samakovli et al., 2014).

De manera interesante, la línea celular C33a que presentó resistencia al inhibidor adquiere la localización nuclear de Hsp90 α tras la administración del 17-DMAG; se ha reportado que la función de las chaperonas en núcleo depende de su interacción con las proteínas "cliente" y no por cuestiones estructurales de la proteína (Longshaw et al., 2004).

7.3. El patrón de localización extracelular de Hsp90 α se asocia al fenotipo invasivo de las células de cáncer cervical

En recientes años ha tomado importancia la presencia extracelular de algunas proteínas de choque térmico, en particular de Hsp90. En su mayoría se ha visto la presencia de Hsp90 α en cáncer gástrico, colorectal y de mama, en donde su localización se ha asociado a la invasividad de los tumores (Eustace et al., 2008; Sidera, 2008; Sidera y Patsavoudi, 2008).

En esta investigación identificamos por primera vez la presencia extracelular de Hsp90 α en líneas celulares de CaCu; la línea celular HeLa que presentó un fenotipo invasivo encontramos Hsp90 α con localización extracelular, sin embargo, el tratamiento previno la presencia extracelular Hsp90 α , lo cual se asoció a la sensibilidad observada en esta línea celular al efecto anti-migratorio del 17-DMAG.

De manera contrastante, la línea C33a presentó la localización extracelular de Hsp90 β más no la de Hsp90 α previo al tratamiento; la administración del

inhibidor 17-DMAG provocó la inhibición de la localización de Hsp90 β en el medio extracelular y favorecimiento de la localización extracelular de Hsp90 α .

En 2013, Tsen y colaboradores reportaron que la presencia extracelular de Hsp90 α se asocia a la activación de Akt de manera intracelular, este patrón es consistente con lo observado en la línea C33a tanto en los ensayos de Western blots de extractos totales como en la co-inmunofluorescencia

La inversión del patrón de localización de Hsp90 Hsp90 α en la línea celular C33a y su asociación a la adquisición de un fenotipo más invasivo y resistente al efecto anti-migratorio del 17-DMAG, podría explicarse por el tipo de fármaco empleado. El 17-DMAG es un inhibidor competitivo del ATP por el sitio de unión a ATP, sin embargo, se ha demostrado que la función extracelular de Hsp90 es independiente de la hidrólisis de nucleótidos (Sims et al., 2011).

7.4. El patrón de co-localización nuclear entre Hsp90 α con β -catenina se asocia al fenotipo invasivo de las células de cáncer cervical y a la sensibilidad/resistencia al del inhibidor 17-DMAG

Para contribuir a entender el papel diferencial de las isoformas sobre la activación de sus proteínas "cliente", se determinó el efecto del inhibidor sobre la interacción y la co-localización de Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de cáncer cervical.

En este trabajo se demostró que la localización nucleocitoplásmica de Hsp90 α es importante para la activación de β -catenina y la presencia de mayor migración celular; se ha reportado que la localización nuclear de β -catenina es importante para el proceso de transición epitelio-mesénquima de las células tumorales y posteriormente para la invasión de las mismas (Brabletz et al., 2005; Couffignal et al., 2006; Fang et al., 2007; Charbonney et al., 2011).

En la línea celular HeLa no sólo se demostró la presencia de co-localización nucleoplásmica sino también de interacción entre Hsp90 α y β -catenina, asociada a un fenotipo invasivo y sensible al inhibidor de Hsp90. La sensibilidad al efecto anti-migratorio del 17-DMAG se asoció en esta línea celular, con la pérdida del patrón de co-localización nucleoplásmico entre Hsp90 α y β -catenina.

De manera contraria, el fenotipo resistente al efecto anti-migratorio del 17-DMAG se asoció con la ganancia del patrón de co-localización nucleoplásmico entre Hsp90 α y β -catenina. Aún es necesario realizar ensayos de interacción para validar que dicho fenotipo se debe a la interacción de Hsp90 α con β -catenina en la línea C33a.

Las asociaciones anteriormente descritas son de suma importancia tanto para la investigación básica como para la clínica, análisis y estudios más profundos se requieren para poder comprender el papel intracelular y extracelular de dichas

isoformas, pues queda claro que las diferencias de Hsp90 α y Hsp90 β sobre la activación de sus proteínas "cliente" es diferencial.

8. CONCLUSIONES

- El presente trabajo, muestra por primera vez, la asociación de Hsp90 α con la sensibilidad al efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG.
- La ganancia de expresión de Hsp90 α y su localización nucleoplásmica mostró asociación con la resistencia al efecto anti-migratorio del 17-DMAG, en la línea celular C33a.
- La presencia extracelular de Hsp90 α se asoció a un fenotipo invasivo, la pérdida de dicha localización promovió una disminución significativa de la migración celular en la línea celular de CaCu, HeLa.
- Para validar el papel diferencial de Hsp90 α y Hsp90 β es necesaria la realización de ensayos de expresión en donde se silencie o se sobre-exprese una de las dos isoformas.

9. LITERATURA CITADA

[Ali et al., 2006]

Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, Prodromou C, Pearl LH. 2006. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*, 440(7087):1013-1017.

[Al-Lazikani et al., 2012]

Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. 2012. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*. 30(7):679-692.

[Bakau, 2003]

Bakau B. 2003. Molecular chaperones and folding catalyst: Regulation, cellular functions and mechanism. CRC Press. 680p.

[Biaoxue et al., 2012]

Biaoxue R, Xiling J, Shuanying Y, Wei Z, Xiguang C, Jinsui W, Zhang M. 2012. Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 31:70.

[Cagatay T, Ozturk M. 2002]

Cagatay T, Ozturk M. 2002. p53 mutation as a source of aberrant β -catenina accumulation in cancer cells. *Oncogene*, 21:7971-7980.

[Chadli et al., 2008]

Chadli A, Graham JD, Abel MG, Jackson TA, Gordon DF, Wood WM, Felts SJ, Horwitz KB, Toft D. 2008. GCUNC-45 is a novel regulator for the Progesterone Receptor/Hsp90 chaperoning pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5):1722-1730.

[Chang et al., 2006]

Chang YS, Lo CW, Sun FC, Chang MDT, Lai YK. 2006. Differential expression of Hsp90 isoforms in geldanamycin-treated 9L cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344: 37-44.

[Clare y Saibil, 2013]

Clare DK, Saibil HR. 2013. ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers*, 99(11):846-859.

[Cohen-Saidon et al., 2006]

Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. 2006. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood*, 107:1413-1420.

[Cooper et al., 2011]

Cooper LC, Prinsloo E, Edkins AL, Blatch GL. 2011. Hsp90 α/β associates with the GSK3 β /axin1/phospho- β -catenin complex in the human MCF-7 epithelial breast cancer model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(4):550-554.

[Córdova et al., 2009]

Córdova AT, Navarro MMC, Rosado GA. 2009. Catenina beta: Características estructurales y funcionales. *Contactos*, 75:15-20.

[Cortés-González et al., 2008]

Cortés-González CC, Ramírez-González V, Ariza AC, Bobadilla NA. 2008. Functional significance of heat shock protein 90. *Revista de Investigación Clínica*, 60(4):311-320.

[Cortés-González et al., 2010]

Cortés-González CC, Barrera-Chimal J, Ibarra-Sánchez M, Gilbert M, Gamba G, Zentella A, Flores ME, Bobadilla NA. 2010. Opposite effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cell Physiology Biochem*, 26(4-5):657-668.

[Csermely et al., 1998]

Csermely P, Schneider T, Solti C, Prohászka Z, Nardai G. 1998. The 90-kDa molecular chaperone family: Structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 79(2):129-168.

[Da Silva y Ramos, 2012]

Da Silva VCH, Ramos CHI. 2012. The network interaction of the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *Journal of Proteomics*, 75:2790-2802.

[Dollins et al., 2007]

Dollins DE, Warren JJ, Immormino RM, Gewirth DT. 2007. Structure of Grp94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between Hsp90 chaperones.

[Dihlman et al., 2005]

Dihlman S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel DM. 2005. Regulation of Akt1 expression by β -catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 26(9):1503-1512.

[Essers et al., 2005]

Essers MA, De Vries-Smith LM, Barker N, Polderman PE, Burgering B,, Korswagen HC. 2005. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*, 308(5725):1181-1184.

[Eustace et al. 2004]

Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, IlagLL, Jay DG. 2004. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for Hs90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nature Cell Biology*, 6(6):507-514.

[Fang et al., 2007]

Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. 2007. Phosphorylation of β -catenin by Akt promotes β -catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282:11221-11229.

[Feder y Hofmann, 1999]

Feder ME, Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews of Physiology*, 61:243-282.

[Fukumoto y Kiang, 2011]

Fukumoto R, Kuang JG. 2011. Geldanamycin analog 17-DMAG limits apoptosis in human peripheral blood cells by inhibition of p53 activation and its interaction with heat-shock protein 90 kDa after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*, 176(3):333-345.

[Gupta, 1995]

Gupta RS. 1995. Phylogenetic analysis of the 90-kDa heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12:1063-73.

[Hainzl et al., 2009]

Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K. 2009. The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22559-22567.

[Hanahan y Weinberg, 2000]

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.

[Hanahan y Weinberg, 2011]

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.

[Heath et al., 2005]

Heath E, Gaskins M, Pitot HC, Pili R, Tan W, Maschke R, Liu G, Hillman D, Sarkar F, Sheng S, Erlichman C, Ivy P. 2005. A phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Cinical Protate Cancer*, 4(2):138-141.

[Hines et al., 2007]

Hines R, Boyapati A, Zhang D-E. 2007. Cell type dependent regulation of multidrug resistance-1 gene expression by AML-1ETO. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 39 (3):297-306.

[Holzbeierlein et al., 2010]

Holzbeierlein JM, Windsperger A, Vielhauer G. 2010 Hsp90: a drug target? *Current Oncology Reports*, 12(2):95-101.

[Hoogeboom et al., 2008]

Hoogeboom D, Essers MAG, Polderman PE, Voets E, Smits LMM, Burgering MT. 2008. Interaction of FOXO with β -catenin inhibits β -catenin/T Cell factor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283:9224-9230.

[Huber y Weis, 2011]

Huber AH, Weis WI. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*, 105(3):391-402.

[Jaggi et al., 2005]

Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. 2005. Aberrant expression of E-cadherin and β -catenin in human prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 23(6):402-406.

[Jego et al., 2010]

Jego G, Hazoum  A, Seigneuric R, Garrido C. 2010. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*, 332 (2): 275-285.

[Jhaveri et al., 2012]

Jhaveri K, Taldone T, Modi S, Chiosis G. 2012. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1823(3):742-755.

[Jhonson, 2012]

Jhonson JL. 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823:607-613.

[Kamal et al., 2003]

Kamal A, Thao L, Sensintaffer J, Zhang J, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumor selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425: 407-410.

[Kannan et al., 2013]

Kannan A, Krishnan A, Mohammed A, Subramaniam S, Halagowder D, Sivasithamparam ND. 2013. Caveolin-1 promotes gastric cancer progression by up-regulating epithelial to mesenchymal transition by crosstalk of signalling mechanisms under hypoxic condition. *European Journal of Cancer*, 50(1):204-215.

[Kimelman y Xu, 2006]

Kimelman D, Xu W. 2006. Beta-catenin destruction complex: in sights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. 25:7582-7491.

[Kuo et al., 2007]

Kuo CC, Liang CM, Lai CY, Liang SM. 2007. Involvement of heat shock protein (Hsp) 90 beta but not Hsp90 alpha in antiapoptotic effect of CpG-B oligodeoxynucleotide. *Journal of Immunology*, 178(10):6100-6108.

[Kundrat y Regan, 2010]

Kundrat L, Regan L. 2010. Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by cochaperone CHIP. *Journal of Molecular Biology*, 395:587-594.

[Kurashina et al., 2009]

Kurashina R, Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Zhang Y, Hirano T, Ohyashiki K. 2009. Anti-proliferative activity of heat shock protein (Hsp) 90

inhibitors via beta-catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells.

Cancer Letters, 284(1):62-70.

[Langer et al., 2003]

Langer T, Rosmus S, Fasfold H. 2003. Intracellular localization of the 90 kDa heat shock protein (HSP90 α) determined by expression of a EGFP—HSP90

α -fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells. *Cell International Biology*, 27 (1): 47-52.

[Leclerc et al., 1998]

Leclerc P, Jibard N, Meng X, Schweizer-Groyer G, Fortin D, Rajkowski K,

Kang K, Catelli MG, Baulieu EE, Cadepond F. 1998. Quantification of the

nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein

(Hsp90 α) and glucocorticosteroid receptor (GR). *Experimental Cell Research*, 242(1):255-264.

[Lee et al., 2010]

Lee CH, Hung HH, Hung PH, Shieh YS. 2010. Epidermal growth factor receptor regulates β -catenin location, stability, and transcriptional activity

in oral cancer. *Molecular Cancer*, 9:64.

[Li et al., 2009]

Li Y, Zhang T, Sun D. 2009. New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Update*, 12(1-2): 17-27.

[Li et al., 2011]

Li J, Ritcher K, Buchner J. 2011. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1):61-66.

[Lindquist, 1986]

Lindquist S. 1986. The Heat-Shock Response. *Annual Reviews Biochemistry*, 55:1151-1191.

[Liu et al., 1999]

Liu XL, Xiao B, Yu ZC, Guo JC, Zhao QC, Xu L, Shi YQ, Fan DM. 1999. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distribution and increase drug sensitivity of tumor cells. *World Journal of Gastroenterology*, 5(3): 199-208.

[Luheshi et al., 2008]

Luheshi LM, Crowther DC, Dobson CM. 2008. Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1):25-31.

[MacDonald et al., 2009]

MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1):9-26.

[Mahalingam et al., 2009]

Mahalingam, D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bahalla K, Giles FJ. 2009. Targeting Hsp90 for cancer therapy. *British Journal of Cancer*, 100:1523-1529.

[Makhnevych y Houry, 2012]

Makhnevych T, Houry WA. 2012. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823(3):674-682.

[McCready et al., 2014]

McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. 2014. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer*, 10:294.

[McCready et al., 2014]

McCready J, Wong DS, Burlison JA, Ying W, Jay DG. 2014. An Impermeant Ganetespib Analog Inhibits Extracellular Hsp90-Mediated Cancer Cell Migration that Involves Lysyl Oxidase 2-like Protein. *Cancers (Basel)*, 6(2): 1031-1046.

[Mehlen y Puisieux, 2006]

Mehlen P y Puisieux A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Reviews Cancer*, 6:449-458.

[Meng et al., 1996]

Meng X, Devin J, Sullivan WP, Toft D, Baulieu EE, Catelli MG. 1996. Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: dimer disruption does not impede 'in vivo' interaction with estrogen receptor. *Journal of Cell Science*, 109 (7):1677-1687.

[Meyer et al., 2003]

Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH. 2003. Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90. Implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Molecular Cell*, 11(3):647-658.

[Milicevic et al., 2008]

Milicevic Z, Bogojevic D, Mihalovic M, Petrovic M, Krivokapic Z. 2008. Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression.. *International Journal of Oncology*, 32 (6): 1169-1178.

[Millson et al., 2007]

Millson SH, Truman AW, Rácz A, Hu B, Panaretou B, Nuttal J, Mollapour M, Söti C, Piper PW. 2007. Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the alpha and beta isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS Journal*, 274(17):4453-4463.

[Minami et al., 1991]

Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, Suzuki K, Yahara I. 1991. Analysis of native forms and isoforms compositions of the mouse 90-kDa Heat Shock Protein, Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16):10099-10103.

[Miyata et al., 2013]

Miyata Y, Nakamoto H, Neckers L. 2013. The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current Pharmaceutical Design*, 19(3):347-365.

[Modi et al., 2007]

Modi S, Stopeck AT, Gordon MS, Mendelson D, Solit DB, Bagatell R, Ma W, Wheler J, Rosen N, Norton L, Cropp GF, Johnson RG, Hannah AL, Hudis AC. 2007. Combination of Trastuzumab and Tanespimycin (17-AAG, KOS-953) is safe and active in Trastuzumab-Refractory HER-2 overexpressing breast cancer: A phase I Dose-Escalation study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(34):5410–5417.

[Mollapour y Neckers, 2011]

Mollapour M, Neckers L. 2011. Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823:648-655.

[Morales-Guadarrama, 2014]

Morales-Guadarrama, SG. 2014. Perfil de expresión de las proteínas de choque térmico de 90 kDa Hsp90 α y Hsp90 β , en líneas celulares de

carcinoma cervical y su implicación en la vía de señalización de β -catenina, (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

[Morimoto, 1993]

Morimoto RI. 1993. Cell in Stress: Transcriptional activation of Heat Shock Genes. *Science*, 259(5100):1409-1410.

[Muller et al., 2013]

Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, Vojtesk B. 2013. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*, 32:3101-3110.

[Nanbu et al., 1996]

Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, Koshiyama M, Mori T. 1996. Expression of Hsp70 and Hsp90 in endometrial carcinomas: Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression. *Cancer*, 77(2):330-338.

[NCI, 2013]

NCI. 2013. What is cancer? Defining cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>

[Nemoto y Sato, 1998]

Nemoto T, Sato N. 1998. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochemical Journal*, 330:989-995.

[Nusse et al., 2012]

Nusse R, Clevers H, Shen K, Niehrs C, Basler K, Polakis P. 2012. Three decades of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, Focus Issue 2012.

[Orsulic et al., 1999]

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and b-catenin LEF1-mediated trtransactivation. *Journal of Cell Science*, 112:1237-1245.

[Park et al., 1998]

Park M, Kang CY, Krishna P. 1998. *Brassica napus* Hsp90 can autophosphorylate and phosphorylate other protein substrates. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 185:33-38.

[Park et al., 2010]

Park CS, Joo IS, Song SY, Kim DS, Bae DS, Lee JH. 2010. An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, p53, and estrogen receptor status in carcinoma of teh uterine cérvix. *Gynecologic Oncology*, 74:53.

[Peng et al., 2001]

Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J. 2001. Inhibition of MDM2 by Hsp90 contributes to mutant p53 stabilization *Journal of Biological Chemistry*, 276(44):40583-40590.

[Perez-Placencia et al., 2008]

Perez-Placencia C, Duenas-González A, Alatorre-Tavera B. 2008. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *International Archives of Medicine*, 1:1-10.

[Perdew et al., 1993]

Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ. 1993. Localization and characterization of the 86- and 84-kDa Heat Shock Proteins in Hepa 1c1c7 Cells. *Experimental Cell Research*, 209:350-356.

[Perotti et al., 2008]

Perotti C, Lin R, Parusel CT, Böcher N, Schultz J, Bork P, Pfitzner E, Groner B, Shemanko C. 2008. Heat shock protein-90-alpha, a prolactin-STAT5 target gene identified in breast cancer cells, is involved in apoptosis regulation. *Breast Cancer Research*, 10:R94.

[Piccard, 2013]

Piccard D. Diciembre 2013. Hsp90 facts & literatura: Cytosolic heat-shock protein. <http://www.piccard.ch/downloads/Hsp90facts.pdf>

[Pick et al., 2007]

Pick E, Kluger Y, Giltnane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. 2007. High Hsp90 expression is associated with decrease survival in breast cancer. *Journal of Cancer Research*, 67(7):2932-2937.

[Prodromou, 2012]

Prodromou C. 2012. The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1823(3):614-623.

[Purcell et al., 2011]

Purcell R, Childs M, Maibach R, Miles C, Turner C, Zimmermann A, Sullivan M. 2011. HGF/c-Met related activation of β -catenin in hepatoblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:96.

[Retzlaff et al., 2009]

Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H, Buchner J. 2009. Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Reports*, 10(10):1147-1153.

[Ritcher et al., 2007]

Ritcher K, Hendershot LM, Freeman BC. 2007. The cellular world according to Hsp90. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14:90-94.

[Saifo et al., 2010]

Saifo MS, Rempinski DR, Rustum YM, Azrak RG. 2010. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers. *Molecular Cancer*, 9:310.

[Sain et al., 1996]

Sain N, Krishnan B, Ormerod MG, De Rienzo A, Liu WM, Kaye SB, Workman O, Jackman AL. 2006. Potentiation of paclitaxel activity by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human

ovarian carcinoma cell lines with high levels of activated Akt, *Molecular Cancer Therapy*, 5(5):1197-1208.

[Samakovli et al., 2014]

Smakovli D, Margaritopoulou T, Prassinos C, Miloni D, Hatzopoulos P. 2014. Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytologist*, 203 (3): 743-757.

[Senju et al., 2006]

Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, Tominaga M, Irie K, Hayashi S, Sueoka E. 2006. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cells. *Journal of Cancer Research*, 132:150-158.

[Shiau et al., 2006]

Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA. 2006. Structural analysis of *E. coli* Hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell*, 127(2):329-340.

[Sidera et al., 2008]

Sidera K, Gaitanou M, Stellas D, Marsas R, Patsavoudi E. 2008. A critical role for Hsp90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER2. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 45379-45388.

[Sidera y Patsavoudi, 2008]

Sidera K, Patsavoudi E. 2008. Extracellular Hsp90: conquering the cell surface. *Cell cycle*, 7:1564-1568.

[Solit et al., 2008]

Solit DB, Osman I, Polsky D, Panageas KS, Daud A, Goydos JS, Teircher J, Wolchok JD, Germino J, Krown SE, Coit D, Rosen N, Chapman PB. 2008. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 14(24):8302–8307.

[Soti et al., 2005]

Soti C, Nagy E, Giricz Z, Vigh L, Csermery P, Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 146: 769-780.

[Sreedhar et al., 2004]

Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1-3): 11-15.

[Stellas et al., 2010]

Stellas D, El Hamidich A, Patsavoudi E. 2010. Monoclonal antibody 4C5 prevents activation of MMP2 and MMP9 by disrupting their interaction with extracellular Hsp90 and inhibits formation of metastatic breast cancer cell deposits. *BMC Cell Biology*, 11:51.

[Street et al., 2011]

Street TO, Lavery LA, Agard DA. 2011. Substrate binding drives large-scale conformational changes in the Hsp90 molecular chaperone. *Molecular Cell*, 42(1):96-105.

[Szalmás et al., 2013]

Szalmás A, Gyöngyösi E, Ferenczi A, László B, Karosi T, Csomor P, Gergely L, Veress G, Kónya J. 2013. Activation of Src, Fyn and Yes non-receptor tyrosine kinases in keratinocytes expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 oncoprotein. *Virology Journal*, 10:79

[Taherian et al., 2008]

Taherian AA, Krone P, Ovsenek N. 2008. Different interactions of Hsp90 α and Hsp90 β with different substrates. *Biochemical Cell Biology*, 86:37-45.

[Tian et al., 2013]

Tian X, Zhang J, Tan TK, Lyons JG, Niu B, Lee SR, Tsatralis T, Zhao Y, Wang Y, Cao Q, Wang Y, Lee VW, Kahn M, Zheng G, Harris DC. 2013. Association of β -catenin with P-Smad3 but not LEF-1 dissociates in vitro profibrotic from anti-inflammatory effects of TGF- β 1. *Journal of Cell Science*, 126(1):67-76.

[Tiroli-Cepeda y Ramos, 2011]

Tiroli-Cepeda AO y Ramos CH. 2011. An overview of the role of molecular chaperones in protein homeostasis. *Protein Peptide Letters*, 18(2):101-109.

[Tsen et al., 2013]

Tsen F, Bhatia A, O'Brien K, Cheng CF, Chen M, Hay N, Stiles B, Li WW. 2013. Extracellular Hsp90 signals through subdomain II and the NPVY motif of LRP-1 Receptor to Akt1 and Akt2: a circuit essential for promoting skin cell migration in vitro and wound healing in vivo. *Molecular and Cell Biology*, 33(24): 4947-4959.

[Valenta et al., 2011]

Valenta T, Gay M, Steiner S, Draganova K, Zemke M, Hoffmans R, Cinelli P, Aguet M, Sommer L, Basler K. 2011. Probing transcription-specific outputs of β -catenin in vivo. *Genes & Development*, 25(4):2631-2643.

[Valenta et al., 2012]

Valenta T, Hausmann G, Basler K. 2012. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO Journal*, 31(12):2714-2736.

[Vanmuyulder et al., 2012]

Vanmuyulder N, Werry-Huet A, Rooze M, Louryan S. 2002. Heat shock protein HSP86 expression during mouse embryo development, especially in the germ line. *Anatomy and Embryology*, 205(4):301-306.

[Vaughan et al., 2009]

Vaughan CK, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C. 2009. A common conformationally coupled ATPase mechanism for yeast and human cytoplasmic Hsp90s. *FEBS Journal*, 276:199-209.

[Walboomers et al., 1999]

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, FX B, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Parthology*, 189(1):12-19.

[Wandlinger et al., 2008]

Wandlinger K, Ritcher K, Buchner J. 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 18473-18477.

[Wang et al., 2009]

Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, Tong M, Chang G, Luo Y. 2009. The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy. *Proceeding of the National Academy of Science*. 106:50.

[Yang et al., 2011]

Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. 2011. Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature*, 480:118-122.

[Yano et al., 1999]

Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G. 1996. Expression and roles of Heat shock proteins in human breast cancer. *Journal of Cancer Research*, 87:908-915.

[Young et al., 1998]

Young JC, Obermann WMJ, Hartl FU. 1998. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12 kDa domain of Hsp90. *Journal of Biological Chemistry*, 273:18007-18010.

[Zhang et al., 2013]

Zhang J, Li J, Liu B, Zhang L, Chen J, Lu M. 2013. Genome-wide analysis of the populus Hsp90 gene family reveals differential expression patterns, localization and heat stress responses. *Biomedical Central Genomics*, 14:532.

[Zeng et al., 2005]

Zheng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature*, 438(7069):873-877.

[Zubriené et al., 2010]

Zubriené A, Malgorzata G, Matuliené J, Chaleckis R, Michailoviené V, Voroncova A, Venclovas C, Zylicz A, Zylicz M, Matulis D. 2010. Thermodynamics of radicicol binding to human Hsp90 alpha and beta isoforms. *Biophysical Chemistry*, 152: 153-163.