



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**INFLUENCIA DE LA LOCALIZACIÓN
EXTRACELULAR DE LAS ISOFORMAS DE HSP90,
HSP90 α Y HSP90 β , SOBRE LA MIGRACIÓN EN
RESPUESTA A LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE
HSP90 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JOSÉ EDUARDO PÉREZ AQUINO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ**

Ciudad universitaria, CDMX, 2018.



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.

1. Datos del alumno

Pérez
Aquino
José Eduardo
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310155395

2. Datos del tutor

Dr.
Carlo César
Cortés
González

3. Datos del sinodal 1

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis Alonso
Herrera
Montalvo

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Bertha
Molina Alvarez

6. Dr.

Marco Alonso
Andonegui
Elguera

7. Datos del Trabajo

Influencia de la localización extracelular de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , sobre la migración en respuesta a la inhibición farmacológica de Hsp90 en líneas celulares de cáncer.

67 P
2018



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología, en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradezco el apoyo académico del cuerpo docente de la facultad de ciencias de la UNAM, así como también al taller de “Bases moleculares del cáncer” a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

Agradezco el apoyo técnico, académico y personal del Dr. Carlo César Cortés González.

Finalmente agradezco y reconozco el trabajo de mi comité de sinodales que dedicaron tiempo en revisar, comprender y mejorar el presente trabajo a través de sus valiosas críticas y observaciones:

Dr. Carlo César Cortés González
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Instituto Nacional de Cancerología

M. En C. Bertha molina Alvarez
Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Marco Alonso Andonegui Elguera
Instituto Nacional de Cancerología

Tabla de contenidos.

ABREVIATURAS.	6
ÍNDICE DE FIGURAS.	9
ÍNDICE DE TABLAS.	11
RESUMEN.	12
INTRODUCCIÓN	14
i) Proteínas de choque térmico (Hsp).	14
ii) Proteínas de choque térmico de 90kDa (Hsp90), Hsp90 α y Hsp90 β .	15
iii) Estructura y conformación de la proteína Hsp90.	17
iv) Co-chaperonas de Hsp90.	18
v) Proteínas “cliente” de Hsp90 en condiciones fisiológicas y en cáncer.	19
vi) Funciones extracelulares de Hsp90.	20
vii) Migración celular asociada a eHsp90 y sus isoformas Hsp90 α y Hsp90 β .	23
viii) Hsp90 extracelular como blanco terapéutico en cáncer.	24
ix) Antecedentes particulares.	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
MATERIAL Y METODOS.	31
i) Reactivos.	31

ii) Cultivos celulares.	31
iii) Inhibición farmacológica de Hsp90 en líneas celulares de cáncer.	33
iv) Extracción de proteínas totales de líneas celulares de cáncer.	34
v) Enriquecimiento de proteínas extracelulares de sobrenadante de líneas celulares de cáncer.	34
vi) Inmunodetección de Hsp90 α y Hsp90 β por Western Blot (WB).	34
vii) Ensayos de migración celular.	35
viii) Ensayos de viabilidad celular.	36
ix) Inmuno-localización de Hsp90 en líneas celulares de cáncer.	36
x) Análisis estadístico.	37
 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	 37
 RESULTADOS	
i) Localización extracelular de las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular de líneas celulares de diversos tipos de cáncer.	40
ii) Efecto del inhibidor de Hsp90 (iHsp90), 17-DMAG sobre la migración en líneas celulares de cáncer de próstata.	43
iii) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer próstata.	45
iv) Perfil de expresión de los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β , intracelulares y extracelulares, basales e inducidos por el iHsp90, en líneas celulares de cáncer de próstata.	46
v) Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer renal.	48

vi) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer renal.	49
vii) Localización de Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular, inducida por el iHsp90 en líneas celulares de cáncer renal.	50
viii) Efecto del iHsp90 sobre la localización sub-celular (nuclear-citoplasmática) de Hsp90.	51

DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

i) Localización extracelular de las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular de líneas celulares de diversos tipos de cáncer.	53
ii) Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer de próstata.	54
iii) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer próstata.	56
iv) Perfil de expresión de los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β , intracelulares y extracelulares, basales e inducidos por el iHsp90, en líneas celulares de cáncer de próstata.	56
v) Efecto del iHsp90 sobre la localización subcelular (nuclear-citoplasmática) de Hsp90.	57
vi) Asociación de eHsp90 con la respuesta al iHsp90 en líneas celulares de cáncer renal sobre la viabilidad y migración celular.	57

CONCLUSIONES	59
--------------	-----------

PERSPECTIVAS	60
--------------	-----------

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
----------------------------	-----------

ANEXOS	65
--------	-----------

Abreviaturas

17-AAG	17-alil-demetoxi-geldanamicina.
17-DMAG	17-(2-dimetil-aminoetil)-amino-17-dimetoxi-geldanamicina.
aa	Aminoácidos.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Difosfato de Adenosina (por sus siglas en inglés: adenosine diphosphate).
AKT	Proteína cinasa B/Akt.
Aha1	Proteína activadora de la actividad ATPasa de Hsp90 (por sus siglas en inglés activator de ATPasa 1):
AR	Receptor de andrógenos.
ATP	Tri-fosfato de adenosina (por sus siglas en inglés: adenosine triphosphate).
DCT	Dominio carboxilo terminal.
DM	Dominio medio.
DNT	Dominio amino terminal.
Cdc37	Proteína ciclo división celular 25C (por sus siglas en inglés: cell división cycle, 37 homologue).
DAPI	6',6-Diamino-2-2Fenilindol, Dihidrocioruro.
DHT	Dihidrotestorona.
DMSO	Dimetil sulfoxido (por sus siglas en inglés: dimethyl sulfoxide).
DU145	Línea celular de cáncer de próstata, de Homo sapiens, derivada de sitio metastásico (cerebro), carcinoma.
eHsp90	Proteína de choque térmico de 90 KDa extracelular.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés epidermal growth factor receptor).
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (por sus siglas en inglés: glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase).
Grp94	Proteína reguladora por glucosa de 94 KDa (por sus siglas en inglés: glucose-regulated protein).
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (por sus siglas en inglés: human epidermal growth factor receptor 2).

HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa (por sus siglas en inglés: hipoxia inducible factor 1 alpha).
HOP	Proteína organizadora de Hsp70-Hsp90 (por sus siglas en inglés: Hsp70-Hsp90 organizing protein).
HSF-1	Factor de transcripción de choque térmico (por sus siglas en inglés: heat chock transcription factor 1).
HSP	Gen que codifica para las proteínas de choque térmico (por sus siglas en inglés heat shock protein).
Hsp	Proteína de choque térmico (por sus siglas en ingles heat shock protein).
Hsp27	Proteína de choque térmico de 27 KDa.
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 KDa, isoforma beta.
Hsp90N	Proteína de choque térmico asociada a membrana.
Hsp90T	Proteína de choque térmico de 90 KDa total.
Hsp100	Proteína de choque térmico de 100 KDa.
iHsp90	Inhibidor de Hsp90.
KDa	Kilodaltones.
LRP-1	Proteína asociada al receptor de LDL (por sus siglas en inglés: LDL receptor-related protein 1).
MDR	Proteína de resistencia a múltiples fármacos (por sus siglas en inglés: multidrug resistance protein).
MEEVD	Pentapeptido localizado en el dominio CTD, responsable de la interacción de Hsp90 con co-chaperonas que poseen el dominio TPR.
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz 2 (por sus siglas en inglés: matrix metalloproteinase 2).
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9 (por sus siglas en inglés: matrix metalloproteinase 9).
MTT	Metiltiazolildifenil-tetrazolio.
P23	Prostaglandina E sintas 3 (por sus soglas en inglés: protein E synthase 3)

P53	Proteína de 53 KDa (por sus siglas en inglés: protein 53kDa)
PBS	Bufer salino de fosfatos (por sus siglas en inglés: phosphate buffered saline).
PC3	Línea celular de cáncer de próstata, de homo sapiens
pH	Potencial de hidrogeno
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa (por sus siglas en inglés: phosphoinositide 3-kinase)
PIP2	Fosfatidil-inositol (4,5)-bifosfato (por sus siglas en inglés: phosphatidyl-inositol (4,5) biphosphate)
PIP3	Fosfatidil-inositol (3,4,5)-bifosfato (por sus siglas en inglés: phosphatidyl-inositol (3,4,5) biphosphate)
PTEN	Supresor de tumor Fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato-3-fosfatasa. Fosfatasa y homólogo de tensina (por sus siglas en inglés: phosphatase and tensin homolog)
PVDF	Difluoro-polovinilideno (por sus siglas en inglés: polyvinylidene difluoride).
RAS	Proteína de sarcoma de rata (por sus siglas en inglés: rat sarcoma).
RB	Proteína retinoblastoma (por sus siglas en ingles:retinoblastoma).
RTK's	Receptores de tirosina cinasa (por sus siglas en inglés: receptors tyrosin Kinases).
SFB	Suero fetal bovino.
TBS-T	Búfer salino de tris con Tween.
TRAP-1	Proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (por sus siglas en inglés: tumor necrosis factor receptor-associated protein 1).
WB	Western blot

Índice de figuras

Figura 1	Procesos celulares en lo que está involucrada Hsp90 para el mantenimiento de la homeostasis proteica.	15
Figura 2	Estructura y conformación de Hsp90.	18
Figura 3	Actividad de eHsp90 en angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular.	22
Figura 4	Efecto sensibilizante de la inhibición de eHsp90 a la acción inhibitoria de Bevacizumab.	23
Figura 5	Efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG en líneas celulares de cáncer de cérvix.	27
Figura 6	Correlación del efecto anti-migratorio del 17-DMAG con la presencia extracelular de la isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en líneas celulares de cáncer de cérvix.	28
Figura 7	Panel de líneas celulares que se emplearon para explorar la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β .	38
Figura 8	Estrategia experimental empleada en las líneas celulares de cáncer seleccionadas.	39
Figura 9	Localización extracelular de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en distintos grupos de líneas celulares de cáncer.	41
Figura 10	Análisis de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer.	42
Figura 11	Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	44
Figura 12	Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata.	46

Figura 13	Cambio en el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β subcelular y extracelular inducida por el inhibidor 17-DMAG.	48
Figura 14	Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer renal.	49
Figura 15	Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer renal.	50
Figura 16	Cambio de perfil de expresión y localización de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer renal.	51
Figura 17	Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la localización de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata.	53

Índice de tablas.

Tabla 1	Clasificación y propiedades de las proteínas de choque térmico.	14
Tabla 2	Principales niveles de regulación de Hsp90 α Y Hsp90 β .	17
Tabla 3	Proteínas que conforman maquinaria chaperónica de Hsp90.	19
Tabla 4	Moléculas que se han utilizado para inhibir la actividad de Hsp90.	26
Tabla 5	Características de líneas celulares de cáncer de distintos tipos de cáncer.	33
Tabla 6	Condiciones en las que se mantuvieron las líneas celulares.	66

Resumen

Introducción: Hsp90 representa una de las subfamilias más importantes y abundantes. Las funciones de Hsp90 están involucradas en procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis proteica tales como el plegado *de novo* de proteínas durante el proceso de síntesis ribosomal, la translocación de proteínas a través de membranas y el control de la calidad de las proteínas en el retículo endoplásmico. Bajo condiciones fisiológicas, Hsp90 llega a comprender del 1-2 % de la proteína total y esta cantidad llega a aumentar súbitamente hasta a un 15% en condiciones de estrés o en algunas patologías como el cáncer. La actividad de eHsp90 en cáncer fue descrita en torno a su actividad pro-invasiva, uno de los primeros hallazgos fue realizado por el grupo de Daniel G. Jay et al. En el año 2004, donde a partir de un tamizaje (screening) proteómico descubrieron que eHsp90 α es crucial para la invasión en dos líneas celulares de distinto tipo de cáncer (fibrosarcoma y cáncer de mama), lo que podría indicar que su rol puede ser común en otros tipos de cáncer. A partir de este hallazgo estudiaron a eHsp90 para elucidar sus funciones y los mecanismos de acción por los cuales promueven la migración e invasión en cáncer. En su primer reporte de las funciones extracelulares de Hsp90 en cáncer, concluyeron que: 1) Tanto Hsp90 α como Hsp90 β se secretan al medio extracelular, sin embargo, solo Hsp90 α es requerida para un fenotipo invasivo en dos líneas celulares de cáncer. 2) La actividad extracelular de Hsp90 es independiente a ATP y finalmente 3) proponen que eHsp90 α aumenta la capacidad invasiva promoviendo la activación de MMP-2. **Objetivo:** Evaluar la influencia de la localización extracelular de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β sobre el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG en líneas celulares de cáncer. **Metodología:** Evaluamos el efecto anti-migratorio del iHsp90, 17DMAG sobre líneas celulares de cáncer de próstata, mediante ensayos de herida, posteriormente seleccionamos dos dosis del iHsp90 [250 y 1000nM] con base a la susceptibilidad al efecto anti-migratorio determinado por ensayos de herida. Evaluamos a las 18 horas la viabilidad celular. Analizamos los niveles de proteína intracelular y extracelular en condiciones basales e inducidas por el iHsp90 en líneas celulares de cáncer, por western blot. Evaluamos la localización sub celular de Hsp90 en condiciones basa e inducidas por el iHsp90 por inmunofluorescencias. **Resultados:** el iHsp90, 17-DMAG provocó una disminución en la capacidad migratoria de la línea celular de cáncer de próstata PC3, con un fenotipo altamente metastásico. Dichos

cambios fueron asociados con los cambios en los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β . Por otro lado, el iHsp90 también provocó en esta misma línea celular que Hsp90 se translocará al núcleo cuando basalmente es exclusivamente citosólica. **Conclusiones:** En nuestro estudio se identificó la posible influencia del cambio de perfil de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en la línea celular PC3 con una baja citotoxicidad comparada con la línea celular DU-145. En la línea celular PC3 se pierde la localización de ambas isoformas por lo que se puede proponer como una causa de la disminución en la capacidad migratoria. Por otra parte, la localización nuclear inducida por el iHsp90 podría reflejar la actividad cooperativa de eHsp90 y Hsp90 subcelular.

Introducción

i) Proteínas de choque térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico o HSP (por sus siglas en inglés *Heat Shock Protein*) pertenecen a una familia multigénica, que se conserva evolutivamente en la mayoría de los organismos y se clasifican con base a su homología de secuencia y su peso molecular en 6 subfamilias: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp10 (Feder y Hofmann, 1999), (ver tabla 1).

Estas proteínas fueron descubiertas en la década de los sesentas por Ritossa *et al.* en las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, en este estudio observaron que el aumento súbito de la temperatura aumentaba la expresión de ciertas proteínas que más tarde se denominaron proteínas de choque térmico o proteínas de estrés, a partir de ese descubrimiento se abrió una nueva área en el campo de la investigación que se dedicó al estudio de las Hsp el cual involucraba áreas como la biofísica, biología estructural, biología molecular, biología celular entre otras con el fin de caracterizar estructural y funcionalmente a las Hsp y su implicación en procesos celulares. (Ritossa FA. 1962).

Subfamilia Hsp	Isoformas	Localización intracelular	Función intracelular
Hsp100	Hsp 104-110 ORP 150	Citosol, núcleo, retículo endoplásmico	Termo tolerancia, tolerancia, isquemia
Hsp90	Hsp90a Hsp90b TRAP-1 Grp94 Hsp90N	Citosol, mitocondria, retículo endoplásmico, núcleo	Interacción con receptores de hormonas esteroideas.
Hsp70	Hsp72 Hsc73 mtHsp70	Citosol, mitocondria, retículo endoplásmico	Termo tolerancia, plegamiento de proteínas
Hsp60	Hsp60	Citosol, mitocondria	Plegamiento de proteínas
Hsp40	Hsp40 Hsp47	Citosol, núcleo, retículo endoplásmico	Co-chaperonas de Hsp72, plegamiento de proteínas
Hsp Pequeñas	Ubiquitina Hsp10 Hsp 20-30	Citosol, núcleo, mitocondria	Degradación de proteínas, tolerancia al estrés, oxidativo, cofactor de Hsp60

Tabla 1.- Clasificación y propiedades de las proteínas de choque térmico. Se presentan las seis subfamilias de Hsp, sus isoformas, su localización intracelular y sus principales funciones.

ii) **Proteínas de choque térmico de 90kDa (Hsp90), Hsp90α y Hsp90β**

Dentro de las proteínas de choque térmico, Hsp90 representa una de las subfamilias más importantes y abundantes, además de que sus isoformas se localizan prácticamente en todos los organelos de la célula, actualmente se han descrito 5 isoformas: Hsp90α, Hsp90β, Grp94, TRAP-1 y Hsp90N, estas isoformas se diferencian por su localización intracelular. Las funciones de Hsp90 están involucradas en procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis proteica tales como el plegado *de novo* de proteínas durante el proceso de síntesis ribosomal, la translocación de proteínas a través de membranas y el control de la calidad de las proteínas en el retículo endoplásmico (figura 1). Bajo condiciones fisiológicas, Hsp90 llega a comprender del 1-2 % de la proteína total y esta cantidad llega a aumentar súbitamente hasta a un 15% en condiciones de estrés o en algunas patologías como el cáncer (Wegele H., Müller L., Buchner J. 2004 y Whitesell L., Lindquist S.L. 2005). Hsp90 se define como una “Chaperona molecular” por el conjunto de procesos que lleva a cabo dentro de la célula para mantener la homeostasis proteica, para ello requiere de una maquinaria chaperónica que representa una llave reguladora de la proteostasis bajo condiciones fisiológicas y de estrés en células eucariontes, los componentes de esta maquinaria involucran a otras proteínas que regulan y hace más específica la actividad chaperonica de Hsp90 sobre los cientos de proteínas cliente. (Schopf, *et al.* 2017).

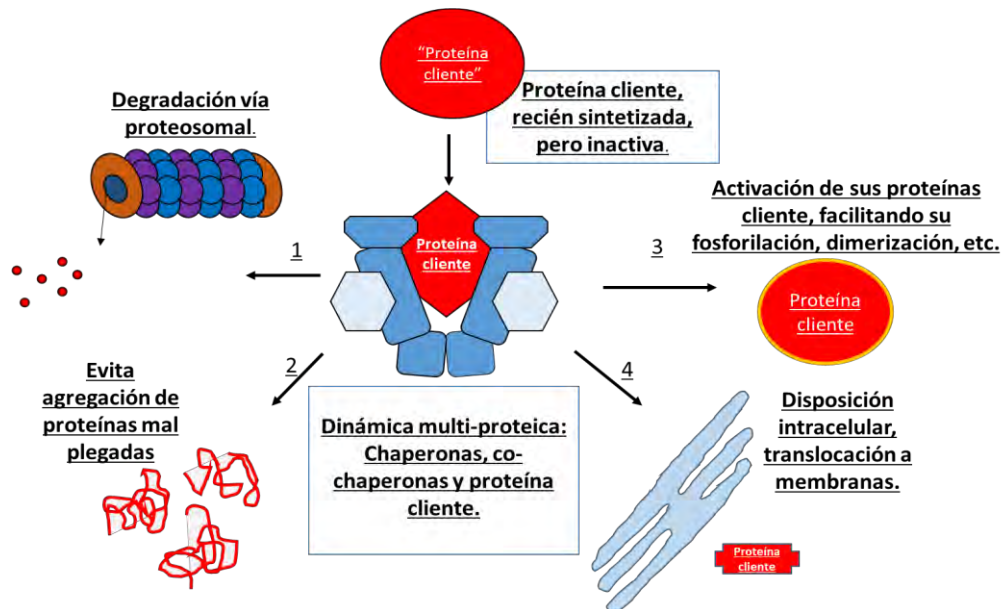


Figura 1.- Procesos celulares en lo que está involucrada Hsp90 para el mantenimiento de la homeostasis proteica. 1) facilita la degradación proteosomal de algunas proteínas mediante la regulación del plegamiento de ubiquitinas ligasas, 2) evita la agregación de proteínas mal plegadas, 3) estabiliza a proteínas en el citoplasma para su disposición en organelos dentro de la célula y 4)

activa a sus proteínas *cliente* facilitando su fosforilación, dimerización etc. (Tomado y modificado de Lindquist et al. 2008)

Dentro de la subfamilia de Hsp90, destacan las isoformas, Hsp90 α Y Hsp90 β ya que se localizan en el citoplasma y comprenden el 80% de la subfamilia, además de que son las encargadas de la mayoría de los procesos intracelulares (Johnson, J.L., 2012). Hsp90 α Y Hsp90 β mantienen hasta un 85 % de identidad a nivel de proteínas (Gupa et. Al., 1995).

Sin embargo, pese a las similitudes entre estas isoformas, presentan diferencias de gran importancia; se sabe que Hsp90 α se encuentra principalmente como dímeros con Hsp90 β , al contrario de Hsp90 β la cual forma principalmente monómeros (Perdew, 1993). Además de esto, por la cantidad de elementos de respuesta a estrés, una de estas isoformas es constitutiva en el citoplasma (Hsp90 β), mientras que la otra es inducible ante ciertos estímulos de estrés que provocan su sobreexpresión (Hsp90 α) (Sreedhar et. El., 2004).

Se han descrito funciones diferenciales sobre la activación de ciertas proteínas cliente, así como la sensibilidad que Hsp90 α Y Hsp90 β presentan a los inhibidores de Hsp90, como el radicicol (Millson et. Al., 2007) en donde la tasa de cambio de la expresión de estas isoformas, tiene implicaciones valiosas en el equilibrio homeostático de una célula.

	Hsp90α	Hsp90β	Referencias
Regulación Transcripcional y traduccional	Tiene 10 exones que codifican un transcrito de 5.3 kb.	Consta de 11 exones y el transcrito es de 6.8 kb	Csermely et. Al., 1998
	Codifica a una proteína de 733 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 86 kDa.	Codifica a una proteína más pequeña que Hsp90 α , formada por 726 aa y un peso molecular de 84 kDa.	Csermely et. Al., 1998
	Región promotora del gene contiene 5 elementos de respuesta a estrés térmico (HSE).	Región promotora del gene posee solo 2 HSE.	Zhang et. Al., 2013
	Niveles de ARNm significativamente menores que los de Hsp90 β en	Menor nivel de inducción en su transcripción pero mayor cantidad de	Chang et. Al., 2006

	condiciones normales.	ARNm en condiciones normales.	
Estructura Conformacional	En el dominio Carboxilo terminal, posee un residuo de serina, cuyo grupo OH puede hacer tres enlaces de hidrogeno adicionales que facilitan su dimerización.	En el dominio Carboxilo terminal, el residuo de serina es sustituido por alanina, disminuyendo su capacidad para dimerizar.	Zubriené et. Al., 2010
	Su abundancia como dímeros de Hsp90 le permite estabilizar a sus proteínas cliente.	Su estructura conformacional es en monómeros.	Ritcher et. Al., 2007.

Tabla 2.- Principales niveles de regulación de Hsp90 α Y Hsp90 β .

iii) Estructura y conformación de Hsp90

Hsp90 se compone de tres dominios altamente conservados: el dominio amino-terminal (DAT, el dominio medio (DM) y el dominio carboxilo-terminal (DCT) (ver figura 2). Se presentan como monómeros y dímeros. El dominio ATD presenta el sitio de unión a ATP, donde se lleva a cabo su hidrolisis, en este mismo dominio se lleva a cabo el reconocimiento de algunos inhibidores competitivos de la actividad ATP-asa de Hsp90, como los derivados de la geldanamicina. En el dominio medio se lleva a cabo la interacción de Hsp90 con sus proteínas “cliente”, mientras que en el dominio CTD, se lleva a cabo el reconocimiento de los monómeros de Hsp90 para formar dímeros (Miyata, *et al.*, 2012).

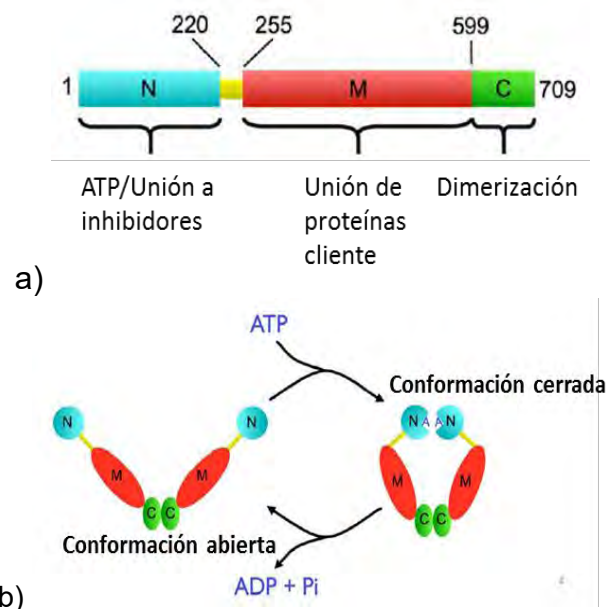


Figura 2.- Estructura y conformación de Hsp90. La estructura general de Hsp90 se compone de tres dominios: a) el amino terminal representado por la barra en color azul donde se lleva a cabo la actividad ATPasa, el dominio medio representado por la barra roja donde se encuentra el sitio de unión a sus proteínas cliente y el dominio carboxilo terminal representado por la barra verde donde se lleva a cabo la dimerización. Todas las isoformas de Hsp90 existen naturalmente como homodímeros flexibles, solo así Hsp90 es capaz de hidrolizar ATP. En la figura b) se muestra a Hsp90 en la conformación abierta (izquierda) y Hsp90 unida a nucleótidos en la conformación cerrada (derecha). (Figura toma de Pearl, 2016).

iv) **Co-chaperonas de Hsp90**

Aunque Hsp90 presenta relativa abundancia, su actividad depende de una maquinaria que involucra otras proteínas chaperonas, co-chaperonas, moduladores de la actividad ATPasa y otras proteínas accesorias. Junto con Hsp90, las co-chaperonas son cruciales reguladoras que derivan en las diversas funciones de la maquinaria chaperonica de Hsp90. Estas co-chaperonas (ver tabla 2) en interacción con Hsp90 forman complejos proteicos transitorios que regulan el ciclo conformacional de Hsp90 necesario para transitar de un estado catalítico inactivo a uno activo. Además, ayudan a dirigir a una amplia gama de proteínas cliente, generando especificidad en la actividad chaperonica de Hsp90. Por ello es importante comprender el rol que juegan las co-chaperonas y el mecanismo mediante el cual se activan las proteínas *cliente* de Hsp90. (Whitesell & Lindquist, 2005; Li et al., 2018)

Subfamilias de proteínas	Clasificación	Función
Hsp90	Chaperona	Soporta la conformación meta-estable de la proteína, especialmente en transducción de señales
Hsp70	Chaperona	Ayuda al plegamiento de <i>novo</i> de cadenas polipeptídicas, participa en el ensamble de complejos multiproteicos.
Hsp40	Co-chaperona	Estimula la actividad ATPasa de HSP70
HIP, HOP	Adaptador	Media la interacción de HSP90 y HSP70
Cdc37/p50	Co-chaperona	Modula la interacción con cinasas
AHA1	Co-chaperona	Estimula actividad ATPasa de HSP90
p23	Co-chaperona	Estabiliza la asociación de HSP90 con sus proteínas cliente

Tabla 3.- Proteínas que conforman maquinaria chaperónica de Hsp90. (tomada y traducida de Whitesell y Lindquist, 2005).

La función celular más estudiada y conocida de Hsp90 es que actúan como moduladoras alostéricas de varias proteínas denominadas proteínas “cliente”, lo que les confiere su función como chaperonas moleculares (Cortés-González *et al.* 2008). Dentro del amplio espectro de proteínas *cliente* que Hsp90 regula se encuentran algunas proteínas cinasas y factores de transcripción como los receptores hormonales esteroides con particular significado biomédico en cáncer y otras patologías, además a través de una gran variedad de proteínas clientes regula otros procesos celulares, como la respuesta inmune, tráfico de proteínas intracelulares, transducción de señales, tumorigénesis, infecciones virales, entre otras. (Pearl, *et al.* 2016).

v) Proteínas “cliente” de Hsp90 involucradas en procesos fisiológicos y en cáncer.

Hsp90 funciona como una chaperona molecular involucrada en la regulación de una serie de procesos importantes para el mantenimiento de las células. Por otra parte, también se ha reportado que Hsp90 tiene un papel crítico en el mantenimiento de múltiples vías

oncogénicas y que es necesario para mantener el plegamiento y conformación activa de muchas proteínas aberrantes en cáncer (Miyata, Nakamoto y Neckers, 2012).

El cáncer es un grupo de enfermedades, de origen multifactorial y de múltiples etapas que comparten propiedades funcionales definidas como “Hallmarks” del cáncer”, (Hanahan y Weinberg, 2011). Dentro de estos Hallmarks del cáncer, Hsp90 es un esencial regulador de algunas proteínas clave como receptores nucleares y cinasas que actúan para una eficiente señalización para el crecimiento, proliferación y supervivencia de células de cáncer. La actividad y la estabilidad de estas proteínas son dependientes de la actividad de chaperona molecular de Hsp90. Dentro del amplio grupo de proteínas “cliente” de Hsp90 en cáncer, destacan: receptores tirosina-cinasa como HER2; miembros de la familia MAP-cinasa como ERK-1 Y ERK-2; productos de oncogenes de la familia Src como pp60v-src y Bcr-Abl; entre otras. (Miyata, Nakamoto y Neckers, 2012).

vi) Funciones extracelulares de Hsp90.

La actividad de Hsp90 como chaperona molecular dentro de la célula se ha descrito ampliamente. Sin embargo, en 1986 Hsp90 fue descrita como una proteína asociada a la membrana en la región extracelular (Ullrich, et al. 1986), posteriormente Hsp90 también fue detectada en el medio extracelular de células dendríticas necróticas, lo que generó una discusión acerca de cómo Hsp90 se secreta al medio extracelular (Basu, Sreyashi, et al. 2000). Las funciones de Hsp90 asociada a membrana y Hsp90 secretada, diferían claramente de las funciones intracelulares, por lo que se comenzó a investigar la implicación de estas proteínas a las cuales nos referiremos colectivamente como Hsp90 extracelular (eHsp90) (Li, W, et al. 2011).

Hsp90, así como otras Hsp aumentan su expresión génica como respuesta a distintas condiciones de estrés, esta premisa llevo a analizar qué es lo que sucedía con eHsp90 en estas mismas condiciones. Para ello se evaluaron procesos fisiológicos de estrés en distintos modelos y se llegó a un consenso de que la secreción y localización de Hsp90 en el medio extracelular, era una respuesta de la célula al estrés que sufría, este fenómeno respondía a varios tipos de estrés como: el choque térmico (Clayton, 2005), hipoxia (Yu, 2006) y especies reactivas de oxígeno (Liao et al., 2000).

En 2015, Wei Li, *et al.* Describieron que eHsp90 desempeña un papel importante en la reepitelización y cierre de herida bajo condiciones fisiológicas. Demostró que Hsp90 α es esencial para el cierre de herida de piel en un modelo porcino. Su trabajo se dividió en dos partes, importantes para comprender la importancia de eHsp90. La primera parte de su trabajo, consistió en demostrar que de la población de células que componen la piel, la secreción de eHsp90 se lleva a cabo exclusivamente por queratinocitos y que es un factor exclusivamente pro motilidad ya que no promueve la proliferación celular. La segunda parte consistió en definir el mecanismo por el que promovía la migración de las células y el cierre de herida. El mecanismo difería de la actividad intracelular, eHsp90 actúa como un ligando que se une a un receptor en la superficie de la célula. eHsp90 α activa al receptor de lipoproteína 1 (LRP-1), desencadenando intracelularmente la activación río abajo de AKT, activando vías asociadas a migración para el cierre de heridas de piel. Además de este importante hallazgo, Wei Li *et al.* Propusieron un modelo cooperativo de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , ya que ambas participan en la activación de las vías de señalización para que las células adquieran la propiedad de migrar, eHsp90 α como un ligando activando al receptor LRP-1 y Hsp90 β cumpliendo su función como chaperona molecular de algunas de sus proteínas *cliente* como el HIF1- α y AKT involucradas en dicho proceso (Li *et al.*, 2011).

El papel de eHsp90 α en el cierre de herida de piel llevó a pensar a otros investigadores que también podría tener relevancia en patologías como el cáncer, esta hipótesis está basada en los procesos en común que se llevan a cabo en el proceso fisiológico de cierre de herida y el cáncer. Estos procesos son: Hipoxia, angiogénesis, y remodelación de la matriz extracelular (Figura 4).

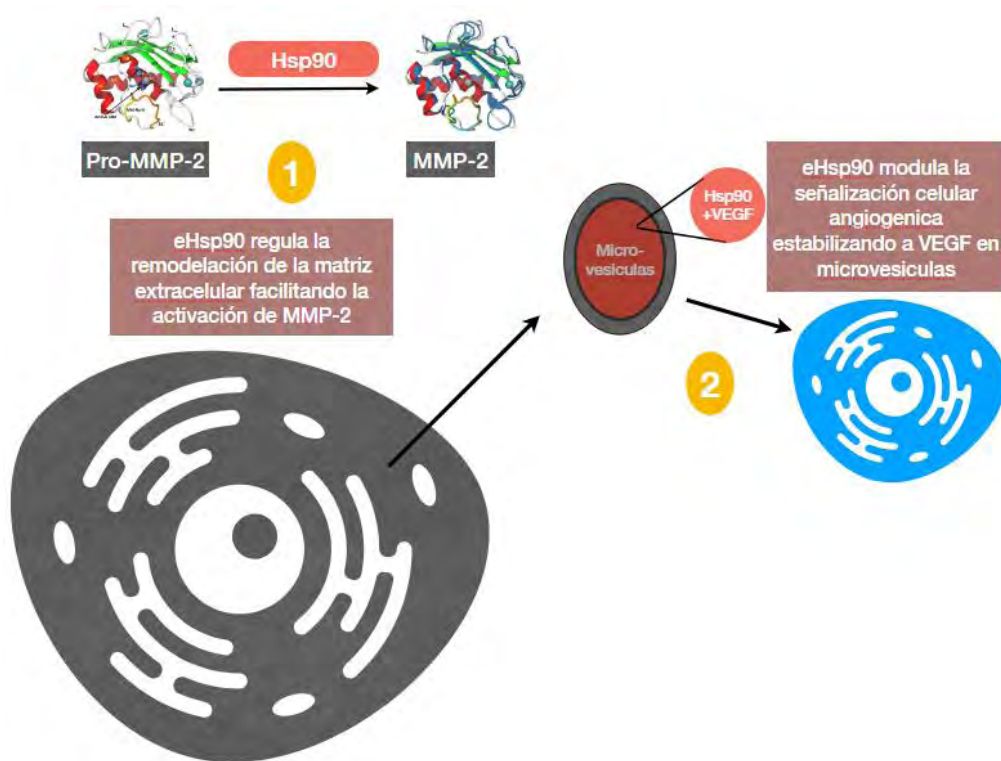


Figura 3. Actividad de eHsp90 en angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular. La imagen muestra dos de los procesos que se lleva a cabo en el cierre de herida y en cáncer, y que están regulados por la actividad de eHsp90. 1) La remodelación de la matriz extracelular está regulado por proteasas como MMP-2 que se sintetiza como un zimógeno y requiere de la actividad de eHsp90 para su activación. 2) VEGF se secreta en micro-vesículas y su actividad pro-angiogénica depende de eHsp90 para su estabilización.

El estudio de eHsp90 y su implicación en cáncer se convirtió en una nueva área de investigación por la gran variedad de procesos en los que estaba involucrado y por las perspectivas que generaron todos estos nuevos hallazgos. eHsp90, se asoció a procesos funcionales del cáncer, uno de los principales hallazgos fue su implicación en la regulación de la señalización de angiogénesis. La capacidad de las microvesículas (MV) derivadas de células de cáncer de mama para promover la angiogénesis depende de VEGF que están asociadas a las MV y a su vez de eHsp90 que permite su estabilización dentro de las MV. Para llegar a estas conclusiones se analizaron MV derivadas de cáncer de mama, con distintos esquemas de tratamiento, donde se utilizó Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad de VEGF y 17-DMAG que inhibe la actividad de Hsp90. El tratamiento con Bevacizumab no tuvo resultados positivos ya que no hubo una disminución en la señalización de VEGFR, sin embargo, con el co-tratamiento Bevacizumab-17-DMAG resulto ser efectivo, disminuyendo la actividad de la señalización

de VEGFR, con lo cual concluyeron que la inhibición de eHsp90 sensibiliza a la acción inhibitoria de bevacizumab (Feng, Q et al., 2017) (Figura 5)

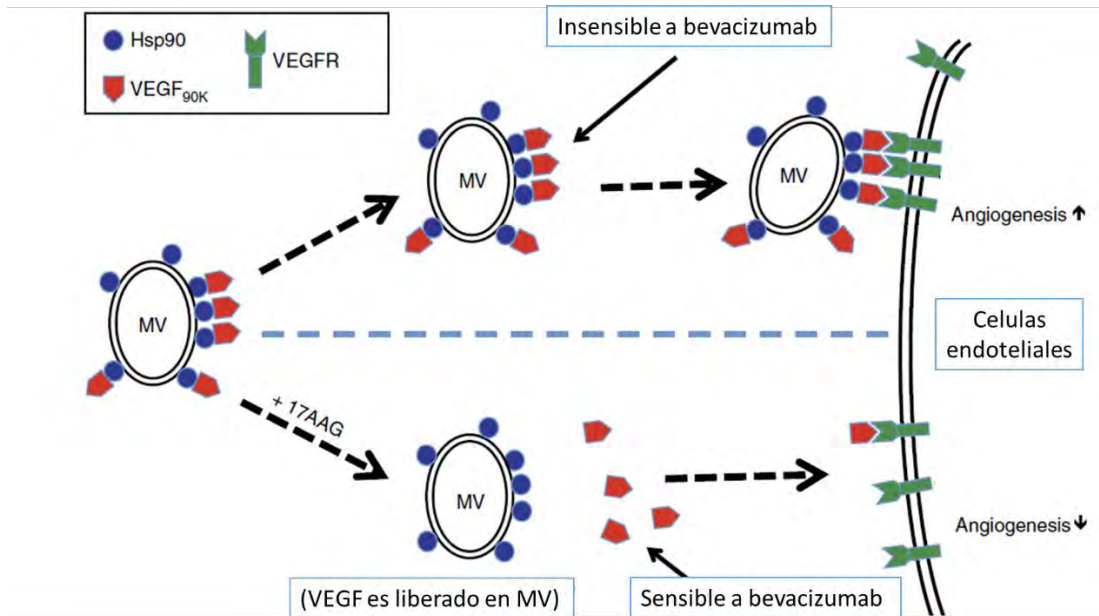


Figura 4. Efecto sensibilizante de la inhibición de eHsp90 a la acción inhibitoria de Bevacizumab. eHsp90 en MV modula la actividad de VEGF regulando la señalización pro-angiogénica. La inhibición de Hsp90 con 17-DMAG sensibiliza a la acción inhibitoria de bevacizumab disminuyendo la actividad angiogénica. (Figura tomada y corregida de Feng, Q et al., 2017).

eHsp90 también está involucrado en la regulación de señalizadores de la maquinaria epigenética involucrados en mecanismos de transición epitelio-mesénquima. eHsp90 emerge como un efector regulador de la activación de la vía de señalización eHsp90-ERK-EZH2. Se observó en un amplio panel de modelos de cáncer de próstata que este mecanismo se conserva en un modelo donde el bloqueo de eHsp90 redujo la actividad de EZH2 y a su vez la represión transcripcional de E-cadherina con lo que se refuerza la idea de la importancia de eHsp90 en la modulación de la transición epitelio mesénquima, representando la vía de señalización eHsp90-ERK-EZH2 un paso importante en la progresión del cáncer de próstata. (Nolan et al., 2015).

vii) **Migración celular asociada a eHsp90 y sus isoformas Hsp90 α y Hsp90 β .**

eHsp90 se ha asociado a varios procesos asociados a cáncer, como angiogénesis, inflamación, como se describió anteriormente. Sin embargo, los procesos que se han

estudiado más ampliamente, son los que se asocian a metástasis como migración e invasión, por ello muchos de los reportes de la actividad de eHsp90 son descritas en torno a la actividad de eHsp90 sobre la capacidad migratoria e invasiva en cáncer. Uno de los primeros hallazgos fue realizado por el grupo de Daniel G. Jay et al. En el año 2004, donde a partir de un tamizaje (screening) proteómico descubrieron que eHsp90 α es crucial para la invasión en dos líneas celulares de distinto tipo de cáncer (fibrosarcoma y cáncer de mama), lo que podría indicar que su rol puede ser común en otros tipos de cáncer.

A partir de este hallazgo estudiaron a eHsp90 para elucidar sus funciones y los mecanismos de acción por los cuales promueven la migración e invasión en cáncer. En su primer reporte de las funciones extracelulares de Hsp90 en cáncer, concluyeron que: 1) Tanto Hsp90 α como Hsp90 β se secretan al medio extracelular, sin embargo, solo Hsp90 α es requerida para un fenotipo invasivo en dos líneas celulares de cáncer. 2) La actividad extracelular de Hsp90 es independiente a ATP y finalmente 3) proponen que eHsp90 α aumenta la capacidad invasiva promoviendo la activación de MMP-2. (Eustace et al., 2004). Con base a estos antecedentes se demostró en modelos *in vitro* e *in vivo*, que Hsp90 α interactúa extracelularmente con algunas de sus co-chaperonas como Hsp70, Hop, Hsp40 y p23 para poder interactuar y asistir la activación de MMP-2, además de que confirmaron la independencia funcional de ATP. (Sims, McCready y Jay, 2011).

Posteriormente la activación de proteínas asociadas metástasis como MMP-2 mediada por eHsp90, fue validada por otros grupos de investigación en otros modelos de estudio. El grupo de investigación de Patsvoudi, et al., reportaron la presencia de Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular y su interacción con proteínas pro-invasivas como MMP-2 y MMP-9, facilitando su activación. También demostraron que la actividad extracelular de Hsp90 puede ser interrumpida por inhibidores como el anticuerpo monoclonal mAB 4C5, la cual previene la activación de las MMPs, y reduce la metástasis a pulmón en un modelo *in vivo*. (Stellas, El Hamidieh & Patsavoudi, 2010).

viii) Hsp90 extracelular como blanco terapéutico en cáncer.

Como ya se ha mencionado en las últimas décadas, se ha reportado que Hsp90, se encuentra desregulado en diversos tipos de cáncer como próstata, mama o renal, por lo que el uso de estas proteínas como un blanco terapéutico ha sido de gran interés para la comunidad médica y científica. Sin embargo, estudios de fase clínica empleando inhibidores

de Hsp90, como los derivados de la geldanamicina, han mostrado resultados poco consistentes. Si bien la terapia basada en la inhibición de Hsp90 parece ser prometedora, es necesario comprender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la respuesta a la inhibición farmacológica (Jhavieri et al., 2012; Piper P.W., et al., 2011; Centenera M.M., Fitzpatrick A.K., et al., 2013). Dentro de estos procesos celulares y moleculares se deben de considerar aspectos como el papel de Hsp90 dentro de la tumorigénesis y el papel diferencial de Hsp90 extracelular e intracelular, es decir como eHsp90, puede llegar a ser más determinante en procesos de etapas avanzadas del cáncer como lo es la metástasis, por lo que la inhibición de eHsp90, puede verse como un blanco terapéutico para la prevención de la metástasis. Aunque en clínica aún no se cuentan con inhibidores específicos de eHsp90, se han desarrollado trabajos en los que describen las ventajas del uso de diversos inhibidores de eHsp90 como derivados de la geldanamicina y anticuerpos, entre los más destacados se presentan en la tabla 3.

Molécula	Función	Mecanismo de acción asociado a	Tipo de cáncer	Referencia
17-DMAG	Reduce la migración de líneas celulares de cáncer.	Cambio en el perfil de presencia/ausencia de Hsp90a y Hsp90b en el medio extracelular de líneas celulares de cáncer de cérvix.	Cáncer de cervix	Datos no publicados, (Morales-Guadarrama, S. G. <i>et al.</i> 2016)
17-AAG	En co-tratamiento con bevacizumab disminuye la angiogénesis.	Sensibiliza la inhibición por Bevacizumab, disminuyendo la activación de VEGFRs en microvesículas que contienen VEGF Y Hsp90.	Cáncer de mama.	(Feng et al., 2017)
DMAG-N-Oxide (NPGA)	Reduce la migración, afectando la transición epitelio mesénquima en líneas celulares de cáncer de próstata.	Interrumpe la señalización eHsp90-LRP1-ERK-EZH2	Cáncer de próstata.	(Nolan, et al., 2015)
mAB 4C5	Reduce migración e invasión.	Previene la activación de MM-9 y MMP-2 ya que interrumpe la interacción	Cáncer de mama.	(Stellas, El Hamidieh and

		entre Hsp90 con dichas proteínas.	Patsavoudi, 2010)
1G6-D7	Inactiva vías profibrosis.	Inactiva vías profibroticas rio abajo como ERK, AKT y P38	(Dong, et al., 2017)

Tabla 4.- Moléculas que se han utilizado para inhibir la actividad de Hsp90. En la tabla se muestra en la primera columna, moléculas que han mostrado experimentalmente afectar la actividad extracelular de Hsp90, en la segunda columna se presenta los procesos en lo que está involucrado eHsp90 y que son afectados por la inhibición, en la antepenúltima columna se presenta los tipos de cáncer en los que se demostraron tales mecanismos y en la penúltima columna se presenta los modelos moleculares involucrados en los mecanismos de acción del inhibidor y en la última columna se presentan las referencias.

Si eHsp90 desempeña un rol crítico en el cierre de herida y en la progresión de algunos tipos de cáncer, su presencia en concentraciones altas en el plasma sanguíneo podría reflejar y correlacionarse con la malignidad y progresión de algunos tumores. Wang, et al., reporto el incremento de eHsp90 en el plasma sanguíneo de pacientes con cáncer de mama, pulmón, páncreas e hígado en un rango de 0.05-0.6 ug/mL y se correlacionó los niveles altos de eHsp90 en el plasma con la malignidad del tumor (Wang, et al., 2009). Chen, et al., examinó los niveles de eHsp90 en suero de 172 pacientes con cáncer color rectal en comparación con 10 voluntarios normales. Reportó que la media de los niveles de eHsp90 α en el suero de pacientes con cáncer fue de 1 mg/mL mientras que la media de los controles fue de 0.2 mg/mL. (Chen, et al., 2010). La presencia de Hsp90 también se ha descrito en el plasma sanguíneo de pacientes con cáncer renal y próstata, donde su expresión fue evaluada mediante Western blot (Bhatia et al., 2016). A pesar de que la presencia de eHsp90 se ha analizado en suero y plasma sanguíneo de pacientes con cáncer y se han encontrado diferencias significativas en comparación con el plasma y suero de personas normales aún no se ha asociado la expresión con algún parámetro clínico como sobrevida, respuesta a tratamiento o detección temprana, sin embargo, esta clase de estudios son muy limitados y aún más asociados a una isoforma.

ix) Antecedentes de laboratorio

Dentro del grupo de investigación dirigido por el Dr. Carlo Cesar Cortés González se ha establecido el efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica deHsp90 en líneas celulares de cáncer de cérvix. Para determinar esto se evaluó la migración celular de las

líneas celulares HeLa y C33a, mediante ensayos de herida en placas de 24 pozos a dosis de 250nM y 500nM, desde 0 horas y hasta el cierre de herida. 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. En las células 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. Por el contrario, en las células de la línea C33a únicamente se observó un efecto en la dosis de 500nM (Figura 1d). Si bien el efecto tuvo significancia con respecto al control ($p < 0.001$), la inhibición de la migración en estas células fue menor a la lograda en HeLa, que logró disminuir la migración celular hasta un 40% aproximadamente. (Figura 6) (Morales-Guadarrama, 2017)

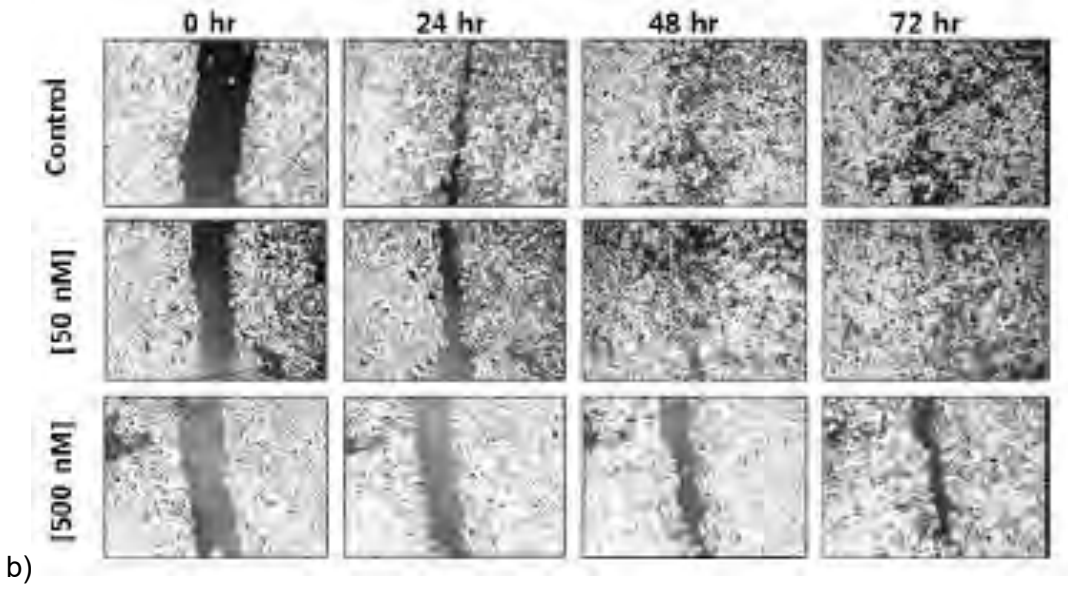
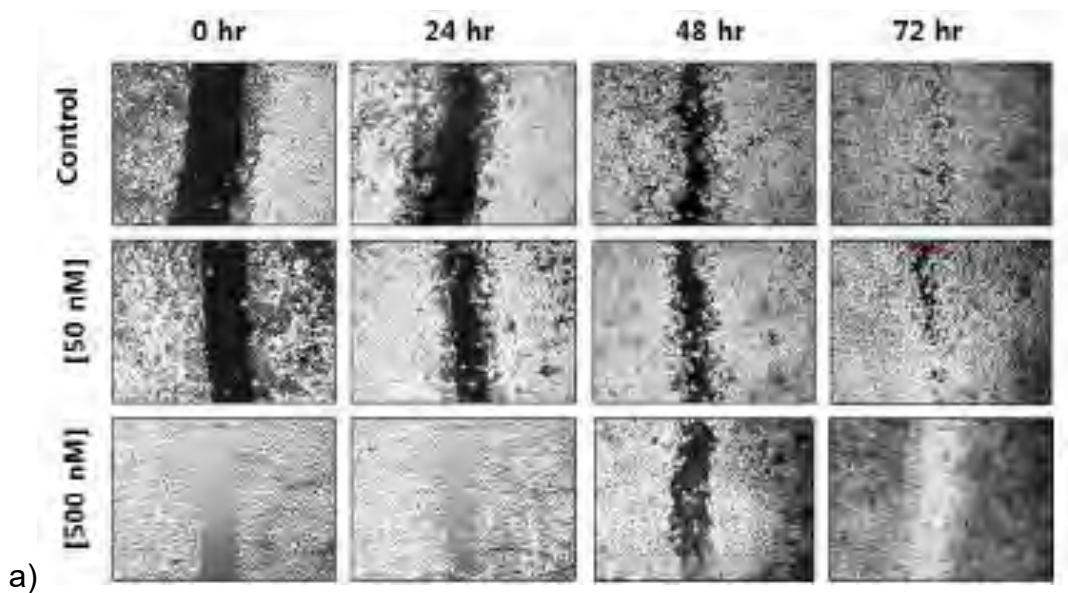


Figura 5. Efecto anti-migratorio de la inhibición farmacológica de Hsp90, con 17-DMAG en líneas celulares de cáncer de cérvix. Figura a. Time-laps representativos de los ensayos de herida, en la línea celular HeLa tratada con [50nM] y [500nM] Figura b. Time-laps representativos de los ensayos de herida, en la línea celular C33a tratada con [50nM] y [500nM], (Figura tomada de Morales-Guadarrama, 2017)

En la línea celular HeLa se analizó por western blot las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular, a una dosis de 500nM donde se encontró una disminución significativa de la migración celular, se encontró que Hsp90 α se secreta de manera constitutiva en el control y deja de secretarse en respuesta a la inhibición con 17-DMAG, mientras que Hsp90 β no se secreta de manera constitutiva ni en respuesta al tratamiento (Figura 7)

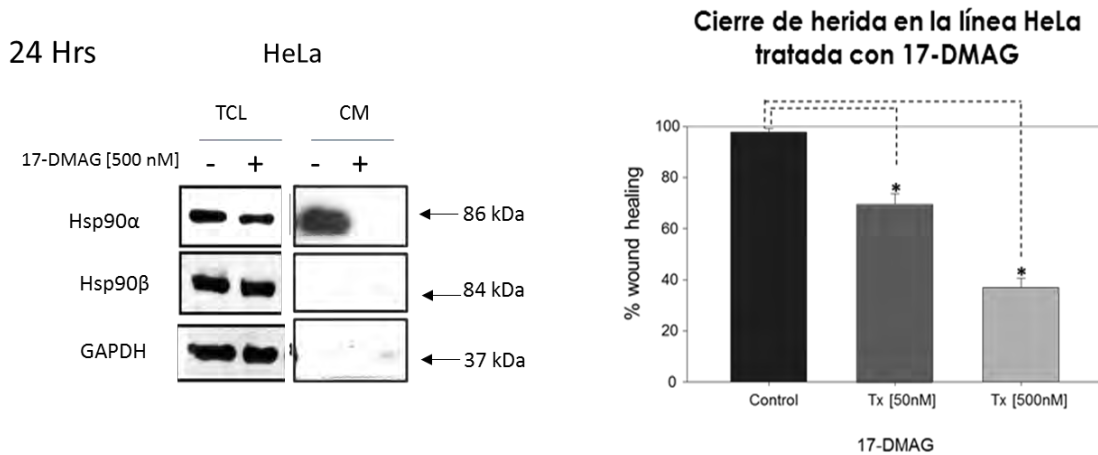


Figura 6. Correlación del efecto anti-migratorio del 17-DMAG con la presencia extracelular de la isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en líneas celulares de cáncer de cérvix. En el panel izquierdo se presenta el WB de Hsp90 α y Hsp90 β en la línea celular HeLa de lisados totales (TCL) y del medio acondicionado (CM). La gráfica de la derecha representa el porcentaje de cierre de herida en la línea celular HeLa, en un grupo control y tratado a 50 y 500nM con el inhibidor 17-DMAG.

Planteamiento del problema.

En distintos tipos de cáncer se ha reportado la presencia de Hsp90 en el medio extracelular así como su participación en diversos procesos que favorecen la migración e invasión celular; sin embargo, su actividad no se ha definido en función de la expresión, localización y actividad diferencial de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , y si su presencia extracelular pueda predecir sensibilidad o resistencia al tratamiento basado en la inhibición de Hsp90.

Pregunta de investigación.

¿Cómo se asocia la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , con el efecto anti-migratorio del iHsp90, en líneas celulares de cáncer?

Hipótesis.

La presencia de Hsp90 y sus isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular promueven a través de varios mecanismos procesos asociados a metástasis, como migración e invasión en líneas celulares de cáncer y le confiere resistencia al inhibidor por el cambio de perfil de expresión entre las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β subcelular y extracelularmente.

Objetivo general.

- ✓ Evaluar la influencia de la localización extracelular de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β sobre el efecto anti-migratorio del iHsp90 en líneas celulares de cáncer.

Objetivos particulares.

- ✓ Evaluar el efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en líneas celulares de cáncer, estableciendo una dosis mínima de inhibición.
- ✓ Evaluar los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β subcelular y extracelular, en condiciones basales e inducidas por el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en líneas celulares de cáncer
- ✓ Determinar el efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer, a la dosis mínima de respuesta al efecto anti-migratorio.
- ✓ Conocer el efecto de la inhibición del 17-DMAG sobre el cambio de la localización sub celular de Hsp90.

Materiales y métodos

i. Reactivos

Los medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium/nutrien Mixture F-12 (DMEM F-12), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), RPMI 1640, Leibovitz's L-15, así como la tripsina, antibiótico, suero fetal bovino (SFB) y otros suplementos, se obtuvieron de Gibco-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Todos los buffers, reactivos para Western blot, incluyendo el Kit immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Cat. WBKLS0500) y el kit DC Protein Assay (Cat. 500-0116) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Herpes, CA, USA). El RIPA Lysis Buffer (Cat. 20-188) y el Blot-Quick Bloker Reagent (Cat. WB57) se adquirieron de Millipore. La membrana de difluoro polivinilideno (PVDF) (Cat. NEF 1002) se adquirió de PerkinElmer, Blot-QuickBloker Reagent (Cat. WB57,) Kit DC Protein Assay (Cat. 500-0116, Bio-Rad). El inhibidor de Hsp90, 17 (2-dimetil-aminoetil)-amino-17-dimetoxi-geldanamicina (17-DMAG) (Cat. 100069 Millipore)

Anticuerpos utilizados:

- a) Anticuerpos primarios: Anti-GAPDH (Cat.(FL-335): SC-25778, Santa Cruz Biothecnology) (1:1000); Anti-Hsp90T (Cat. NBP2-12878, Novus Biologicals) (1:2500), anti-Hsp90 α (Cat. AB82588, Abcam) (1:1000), Anti-Hsp90 β (Cat. D-19) sc-1057, Santa Cruz, (1:500)
- b) Anticuerpos secundarios acoplados a HRP: anti-mouse (Cat. F2612, Santa Cruz) (1:10000), anti-rabbit (Cat. AP132p, Millipore) (1:10000), anti-goat (Cat, v805a, Promega) (1:10000)
- c) Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia: Anti-mouse Alexa fluor 488 (Cat. A11008, invitrogen)

ii. Cultivos celulares.

Para el desarrollo del proyecto se emplearán el siguiente grupo de líneas celulares, todas adquiridas por la American Type Culture Collection (ATCC) (No. De Cat. en anexo X): PC3, DU145 (próstata), ACHN, 786-O (renal), MDA-MB-231, MCF7 (mama) HeLa, C33a (cervix),

A549, H1975, HCC827 y H1993 (pulmón) todas las líneas celulares, excepto MDA-MB-231 (especificaciones en Anexo X) se mantuvieron a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Cada línea celular fue seleccionada con base a distintas características fenotípicas, asociadas a su capacidad migratoria, relevantes para el proyecto (tabla 4).

Línea celular	Tipo de cáncer según su origen tisular	Características fenotípicas
PC3	Próstata	Adenocarcinoma, epitelial adherente, derivada de metástasis en hueso*
DU145	Próstata	Carcinoma, epitelial adherente, derivada de metástasis en cerebro*
LnCaP	Próstata	Carcinoma, Derivado del nódulo linfático izquierdo supraclavicular*
MDA-MB-231	Mama	Adenocarcinoma, epitelial, adherente derivada de una efusión pleural*
MCF-7	Mama	Adenocarcinoma, epitelial adherente, derivada de metástasis por efusión pleural*
HeLa	Cérvix	Adenocarcinoma, epitelial adherente. *
C33a	Cérvix	Carcinoma, epitelial, retinoblastoma adherente
A549	Pulmón	Carcinoma, epitelial adherente*
H1975	Pulmón	Adenocarcinoma de cáncer de pulmón de células no pequeñas, epitelial adherente*
HCC827	Pulmón	Adenocarcinoma, epitelial adherente*
H1993	Pulmón	Adenocarcinoma de cáncer de pulmón de células no pequeñas; metástasis en nódulos linfáticos*

ACHN	Renal	Adenocarcinoma, epitelial, adherente, derivada de un sitio metastásico: por efusión pleural*
786-O	Renal	Adenocarcinoma epitelial adherente. *

Tabla 5. Características de líneas celulares de cáncer de distintos tipos de cáncer. En la tabla se presenta en la primera columna el nombre comercial de cada línea celular, en la segunda columna se presenta su origen tisular, finalmente en las dos últimas columnas se describen características fenotípicas y genotípicas relevantes para el proyecto (*ATCC, ** (Ding et al., 2013)

iii) Inhibición farmacológica de Hsp90n en líneas celulares de cáncer.

Los ensayos de inhibición de Hsp90 se llevaron a cabo con el derivado hidrosoluble de la geldanamicina, 17-DMAG. Primero se estableció una dosis y un tiempo en el que el inhibidor tuviera un efecto anti-migratorio pero no un efecto sobre su viabilidad en las líneas celulares de cáncer de próstata, esta dosis se ocupó para el resto de ensayos. Para cada ensayo se sincronizaron las células manteniéndolas en medio sin SFB durante 24 h, el inhibidor se preparaba en medio de cultivo y se incubaban a tiempos determinados.

iv) Extracción de proteínas totales de líneas celulares de cáncer

Para la obtención de los extractos proteicos se sembraron aproximadamente 2.5×10^6 de células en cuatro placas para cultivo celular de p100 de cada línea celular, se incubaron con las condiciones establecidas durante 24 horas con el fin de lograr una confluencia celular aproximada del 80-90%. Dos de las cuatro placas que se sembró de cada línea celular se usaron para extraer proteínas del grupo control no tratado, mientras que las otras dos sirvieron para extraer proteínas de células de grupos tratados. Para la extracción fue necesario emplear el buffer de lisis, RIPA Lysis Buffer al cual se le añadió un inhibidor de proteasas y un inhibidor de fosfatasa con la finalidad de disminuir la tasa de degradación de las proteínas al momento de lisar las células. El método que se empleó para la lisis celular fue retirar el medio con el que se mantenían, realizar dos lavados con PBS 1X frío,

agregar el mix del buffer de lisis, para finalmente con ayuda de un scrapper despegar las células de la placa, todo lo anterior a una temperatura de 4°C, eventualmente recolectamos el buffer de lisis con células y restos de la placa para ponerlo en un micro tubo eppendorf de 2.5 ml, donde terminamos de lisar las células por un mecanismo físico el cual consiste pasar a las células por una aguja de una jeringa de insulina, finalizamos este proceso llevando a cabo 6 ciclos de vortexeo de 20 seg. Aproximadamente. Finalmente, los micro tubos con los lisados celulares se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 min a 4°C, al finalizar la centrifugación el lisado en el microtubo se dividió en dos fases, una sólida y una líquida la cual contenía las proteínas que nos interesaba analizar, por lo que pasamos este sobrenadante a otro microtubo y lo conservamos a -20 °C.

v) Enriquecimiento de proteínas extracelulares de sobrenadante de líneas celulares de cáncer.

El enriquecimiento de las proteínas del medio extracelular se llevó a cabo a partir de 8 millones de células de cada línea celular de grupos controles y tratados. Los cultivos celulares fueron privados de SFB 24 horas antes de su extracción y enriquecimiento. De los cultivos celulares se conservó el medio extracelular en tubos falcon de 15ml y se conservaron a -20 °C. El enriquecimiento de proteínas del medio extracelular se llevó a cabo empleando un filtro Amicon Ultra-4 de Millipore y cuatro ciclos de centrifugación de 40 min, a 4000 rpm, a una temperatura de 4°C, para obtener un volumen de 200 ul, en algunos casos se requería un último ciclo de centrifugación para ajustar el volumen. Para cada concentrado agregamos buffer de lisis mezclado con inhibidores de proteasa y fosfatasa para una dilución 1:1 con el objetivo de que no se degraden las proteínas, se homogenizó bien el concentrado y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 y se conservaron a -20°C

vi) Inmuno-detección de Hsp90 α y Hsp90 β por Western Blot (WB).

Para llevar a cabo el análisis de proteínas por WB, lo primero que hicimos fue cuantificar la concentración de las proteínas, para ello empleamos el método de Lowry con el Kit DC Protein Assay, empleando una curva de referencia hecha con albumina, para cada extracto proteico, se agregó en un micro tubo de 0.6 ml, 10 ul de extracto, 50ul de reactivo A, se

agito con un vortex para homogenizar y se le agregó 400ul de reactivo B, se volvió a homogenizar y se incubó durante 15 min en ausencia de luz, finalmente se hizo lectura con un lector de micro placa para Elisa a 750nm. Una vez conocida la concentración de las proteínas se prepararon muestras, para ello agregamos en un micro tubo de 0.6 ml un volumen que contenía una concentración de 30ug/ml de cada muestra, y le agregamos agua para homogenizar los volúmenes de todas las muestras, finalmente agregamos β -mercapto-etanol, mezclamos, calentamos a 95 °C durante 5 min y dimos un choque térmico, pasando las muestras a una temperatura de 0 °C, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas. Realizamos una electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 10%. La condiciones electroforéticas fueron 60 volts por 30 minutos para el gel concentrador y 120 volts por 90 minutos para el gel separador. Al finalizar la electroforesis las proteínas se transfirieron del gel a una membrana PVDF, empleando una transferencia semi-seca en un Transblot (Marca BioRad). Las condiciones de la transferencia fueron a 15 volts por 3 horas. Al finalizar la transferencia las membranas se bloquearon con Blot-QuickBlocker Reagent a una concentración del 5% en TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente, se incubaron los anticuerpos primarios de las proteínas a evaluar a 4°C durante toda la noche, al terminar la incubación se llevaron a cabo 10 lavados de 10 min cada uno con TBS-T, para después incubar los anticuerpos secundarios acoplados a HRP durante una hora a temperatura ambiente, al finalizar la incubación se realizaron 6 lavados más con TBS-T. Finalmente la detección de la quimioluminiscencia se realizó con el Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, las membranas se expusieron en placas fotográficas, se revelaron y se fijaron, para su eventual análisis.

vii) *Ensayo de migración celular.*

La migración celular se evaluó mediante un ensayo de cierre de herida. Los experimentos se llevaron a cabo en placas para cultivo celular de 24 pozos, para cada experimento se sembraron aproximadamente 50,000 células por cada pozo, se incubó durante 24 h hasta para que las células se adhirieran y alcanzaran una confluencia celular del 90% para posteriormente cambiar el medio de cultivo por un medio fresco, esta vez sin SFB y sin antibiótico con la finalidad de sincronizar su ciclo celular, después de 24 horas y de que las células se sincronizaran en fase G1, se retiró el medio sin SFB, se realizó un lavado con

PBS 1X y en este punto se le realizó una herida a la mono capa celular empleando una punta de micro pipeta de 200 µl, finalmente se le agregó medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Se analizó el cierre de herida en grupos controles y grupos tratados con el inhibidor 17-DMAG a distintas concentraciones. Finalmente se tomaron microfotografías a las 12, 18 y 24 horas.

viii) Ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo colorimétrico, basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) mediada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan). Para ello se sembraron 10,000 células por pozo en placas multipozo de 96, esperando que formen una monocapa con una confluencia aproximada del 70%. Nuevamente los experimentos se realizaron sobre varios grupos de líneas celulares, contando para cada experimento un grupo control y dos grupos tratados, a una dosis del 17-DMAG de [250 y 1000nm]. El reactivo MTT era agregado a cada pozo después de haber sincronizado y tratado a las células en tiempo y dosis determinadas, la cantidad de MTT fue de 100ul por pozo, se incubó a 37 °C, se retiró cuidadosamente el MTT residual y se agregó DMSO para disolver los cristales, se dejó en agitación durante 30 min para finalmente leer su absorbancia a 570nm. Cada experimento se llevó a cabo tres veces.

ix) Inmuno-localización de Hsp90 en líneas celulares de cáncer.

A partir de monocapas de cada línea celular fijadas en laminillas (Chamber slide de Lab Tek), se realizaron inmunofluorescencias de las líneas celulares de cáncer, controles y tratadas. La confluencia para llevar a cabo cada ensayo fue de aproximadamente del 80%. Las células se fijaron con metanol frío durante 5 min, se permeabilizaron con triton X-100 al 0.1% durante 10 min y se bloquearon con BSA al 10% durante 30 min en oscuridad. El anticuerpo primario se le agregó diluido en BSA y se incubó durante toda la noche, el anticuerpo secundario se le agregó después de dos lavados con triton al 0.0.1% y se

incubó durante 1 hora en oscuridad, finalmente se realizaron dos lavados con triton al 0.01% y se tomaron microfotografías con el microscopio de ZEISS Axio Imager.

x) *Análisis estadístico*

Para el análisis estadístico se empleó el software Graphpad Prism 6.0. Los experimentos se hicieron por triplicado. Los resultados se expresan como la media+ el error estándar de al menos dos experimentos diferentes. Las diferencias se consideran significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05 empleando análisis de varianza de una o dos vías, dependiendo el caso. Así mismo para la representación gráfica de los datos se utilizó el software Graphpad prism 6.0.

Estrategia experimental

Para establecer nuestro modelo experimental analizamos por WB la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en cinco distintos tipos de cáncer, empleando para cada grupo al menos dos distintas líneas celulares de cáncer, en total empleamos 12 distintas líneas celulares, las cuales se presentan en la figura 8

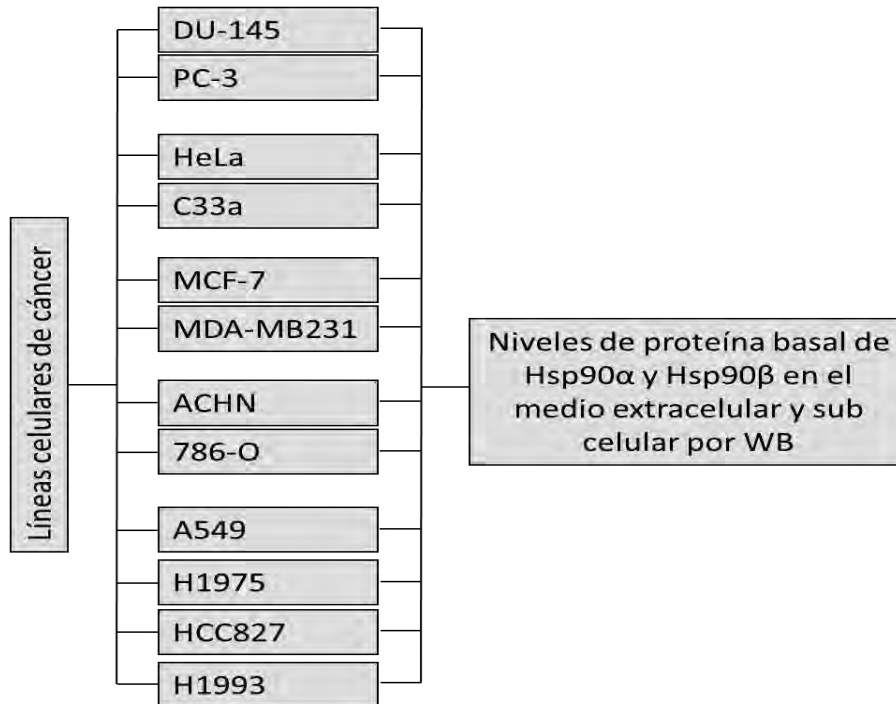


Figura 7. Panel de líneas celulares que se emplearon para explorar la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β .

Con base a los resultados obtenidos de la exploración en los distintos tipos de cáncer seleccionamos dos grupos: Cáncer de próstata y cáncer renal.

Con el modelo de estudio establecido se evaluó el efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG a distintos tiempos y distintas concentraciones en líneas celulares de cáncer de próstata estableciendo una dosis mínima de inhibición (anti-migratoria).

Con base a la actividad del fármaco sobre la capacidad migratoria, determinada por la dosis mínima establecida evaluamos los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β extracelular y subcelular, en condiciones basales e inducidas por el tratamiento.

Para establecer la dosis mínima de inhibición establecimos un modelo de dosis-respuesta, en el que empleamos un intervalo de dosis [50, 250, 500 y 1000nM] del inhibidor 17-DMAG, primero evaluando la migración mediante un ensayo de cierre de herida. Después se evaluó su viabilidad celular y los cambios en el ciclo celular con la dosis establecida por los ensayos de herida.

El siguiente paso fue determinar si la sensibilidad/resistencia de cada línea celular se asociaba a la localización nuclear/citosólica de Hsp90, para ello evaluamos por inmunofluorescencia la localización de Hsp90, después evaluamos si Hsp90 se encontraba en el medio extracelular y como cambiaba el perfil de expresión sub celular y extracelular inducido por el inhibidor, el análisis se hizo por Western Blot en lisados totales y concentrados del medio extracelular.

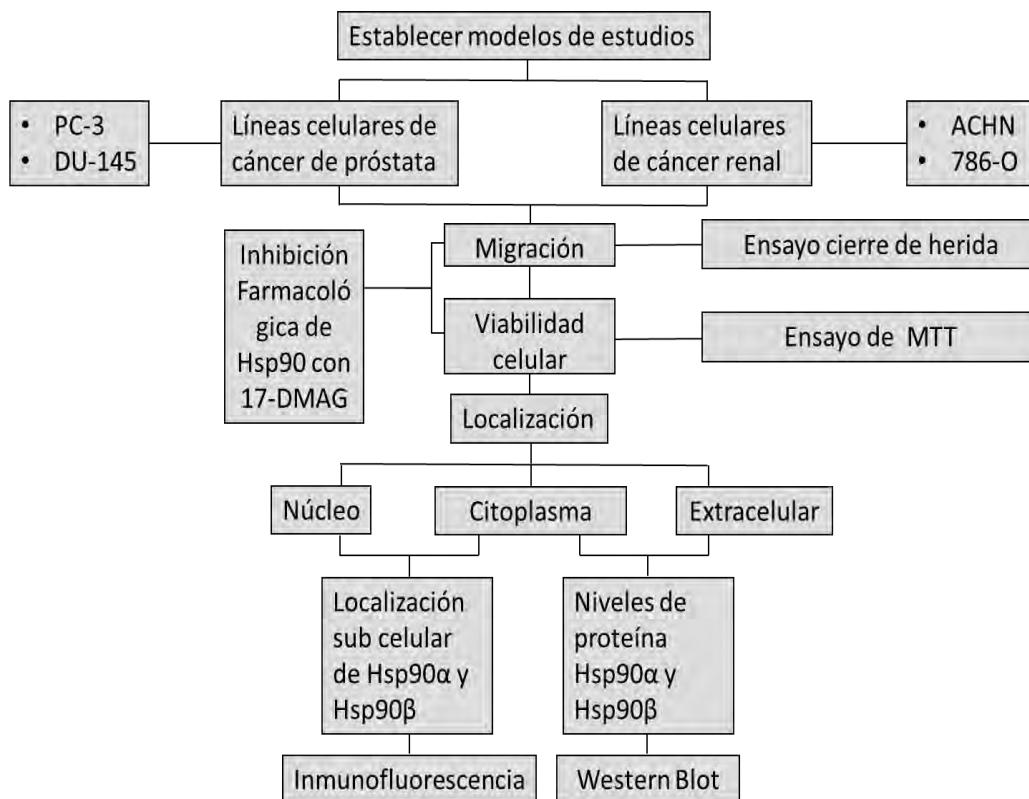


Figura 8. Estrategia experimental empleada en las líneas celulares de cáncer seleccionadas. Esta estrategia solo se empleó en las líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y DU-145) y de cáncer renal (ACHN y 786-O)

Resultados

i) Localización extracelular de las proteínas de choque térmico, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular de líneas celulares de diversos tipos de cáncer.

Hsp90 extracelular (eHsp90) se ha reportado por secretarse de manera preferencial en cáncer, sin embargo, la secreción diferencial de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , no ha sido estudiada a profundidad. Con base a esto, evaluamos estas dos proteínas (Hsp90 α y Hsp90 β) en el medio extracelular de líneas celulares de distintos tipos de cáncer, así como los niveles de proteína intracelular. Para este experimento evaluamos doce líneas celulares de cuatro distintos tipos de cáncer: PC3, DU145 (próstata), ACHN, 786-O (renal), MDA-MB-231, MCF7 (mama) HeLa, C33a (cérvix), A549, H1975, HCC827 y H1993 (pulmón). (Tabla 5). El análisis se realizó por WB, trabajando con los lisados celulares totales (LT) y con los concentrados del medio extracelular o sobrenadante (SN).

Con base a los resultados obtenidos, por cada grupo de cáncer, analizamos si los niveles basales de Hsp90 α y Hsp90 β intracelular se asociaban a la secreción de Hsp90 al medio extracelular (Figura 10). En la figura 10.c se presenta una gráfica de la densidad óptica de Hsp90 α y Hsp90 β en cada una de las líneas celulares. Para graficar estos datos se ocupó la densidad óptica de cada banda, por duplicado, con la finalidad de seleccionar dos grupos, para continuar con nuestros experimentos.

Los grupos seleccionados fueron: Próstata y renal. Las líneas celulares de cáncer de próstata presentaron un perfil interesante, la línea celular PC3, secretaba a Hsp90 α y Hsp90 β de manera inversa, es decir, mientras menor era la cantidad en los niveles de proteína Hsp90 α intracelularmente, mayor cantidad de Hsp90 α se localizaba en el medio extracelular; mientras que los niveles de Hsp90 β intracelularmente eran altos, la localización extracelular era muy baja. En el caso de la línea celular DU-145, Hsp90 α y Hsp90 β no los detectamos en el medio extracelular. Por otro lado, las líneas celulares de cáncer renal, presentaron un perfil distinto, la línea celular 786-O secretaba a ambas isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β . mientras que la línea celular ACHN por el contrario no presentó ninguna de las isoformas.

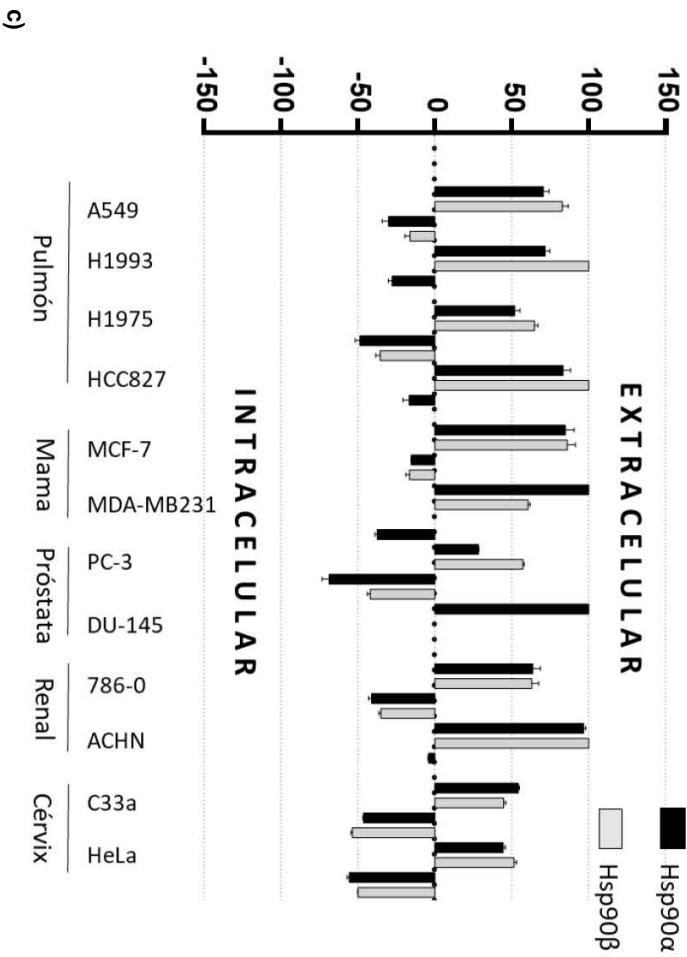
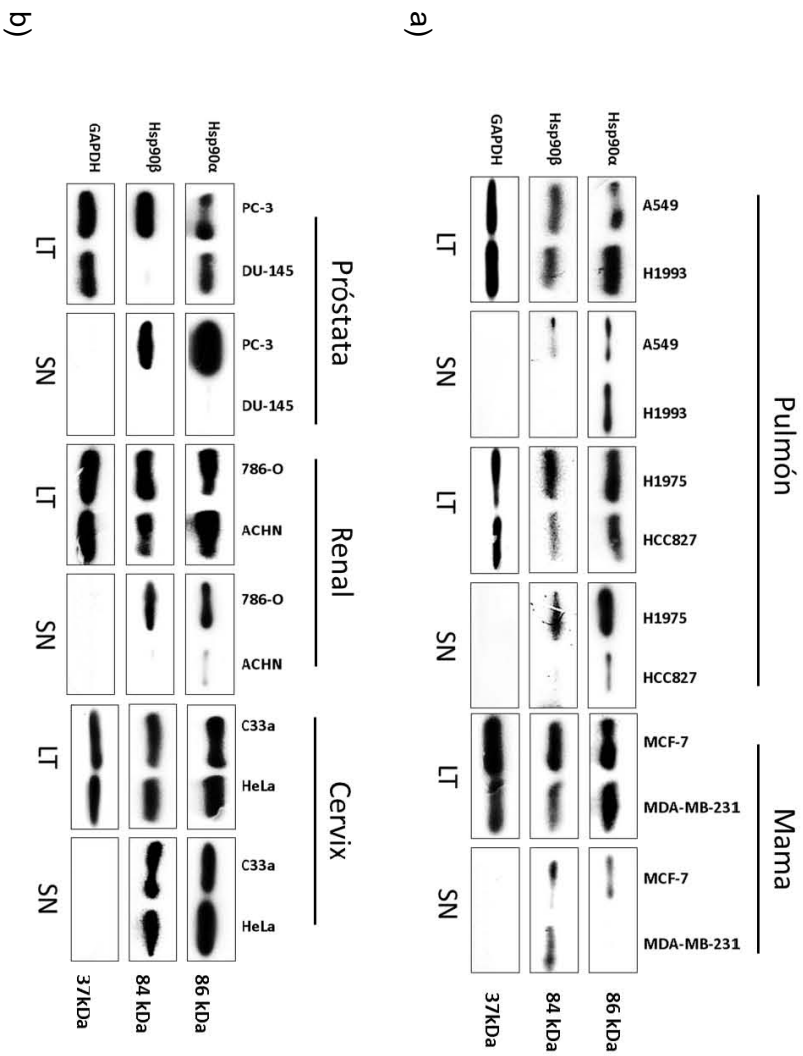


Figura 9.- Localización extracelular de las proteínas Hsp90α y Hsp90β en distintos grupos de líneas celulares de cáncer. Se evaluó por WB la presencia de las isoformas de Hsp90 en el medio extracelular y los niveles de proteína intracelular. se presentan dos paneles: a) primer panel con cáncer de pulmón y cáncer de

mama b) el segundo panel incluye cáncer de próstata, cáncer renal y cáncer de cérvix. cada panel se presenta por bloques, los dos primeros bloques incluyen las proteínas evaluadas de dos líneas celulares, primero se presentan las de lisado total (LT) y después las proteínas de sobrenadante (SN). C) se presenta una gráfica de la densidad óptica de los niveles de Hsp90α y Hsp90β de cada una de las líneas celulares, con desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Se analizó los niveles de proteína intracelular y extracelular de Hsp90α y Hsp90β en distintas líneas celulares de cáncer, con la finalidad de elegir dos grupos, que presenten un patrón de localización particular para continuar con nuestros experimentos. La figura 10.a presenta los niveles de proteína intracelular y extracelular de Hsp90α, mientras que en la figura 10.b se presenta los niveles de Hsp90β. Analizando ambas gráficas encontramos que dos grupos presentaban un patrón de localización extracelular de Hsp90α y Hsp90β muy parecido, estos grupos fueron las líneas celulares de cáncer de próstata y las de renal. Para el caso de la línea celular de cáncer de próstata PC3, presentó niveles regulares de las dos isoformas, mientras que la línea celular DU145 no presentó ninguna de las dos isoformas. Por otro lado, las líneas celulares de cáncer renal presentaron un patrón parecido. La línea celular 786-O presentó una cantidad regular de Hsp90α y Hsp90β, mientras que la línea celular ACHN presentó bajos niveles de Hsp90α y ausencia de Hsp90β. (Figura 10)

Las gráficas de la figura 10, representan la densidad óptica de Hsp90α y Hsp90β, las barras se colocaron de mayor a menor con respecto a los niveles de proteína intracelular. Para seleccionar a los grupos solo nos centramos en el patrón de localización extracelular de Hsp90α y Hsp90β.

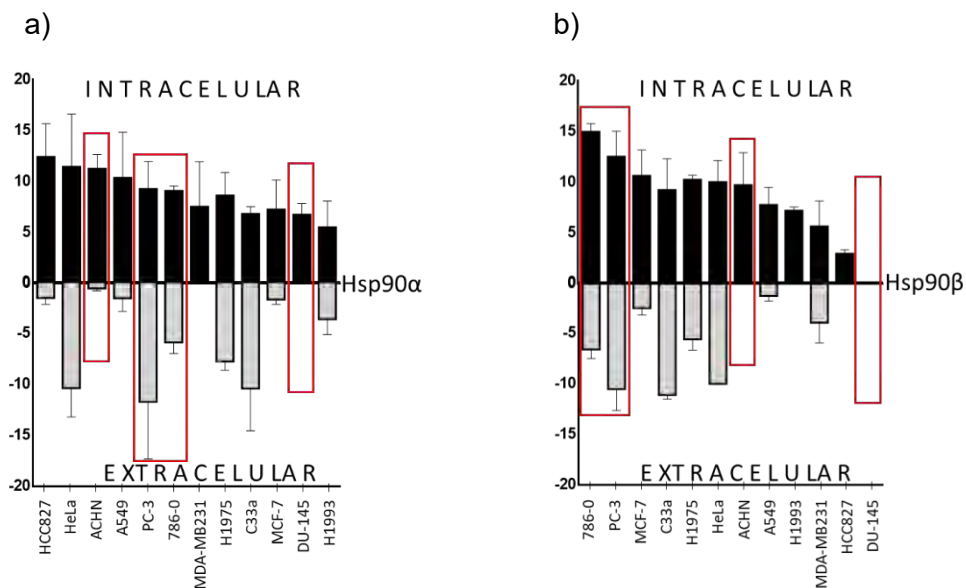


Figura 10. Análisis de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer. a) En la gráfica se presenta la densidad óptica de Hsp90 α intracelular y extracelularmente. b) en la gráfica b se presentan los datos de Hsp90 β . Cada dato representa el promedio de dos experimentos diferentes, así como su desviación estándar.

ii) **Efecto del inhibidor de Hsp90 (iHsp90), 17-DMAG sobre la migración en líneas celulares de cáncer de próstata.**

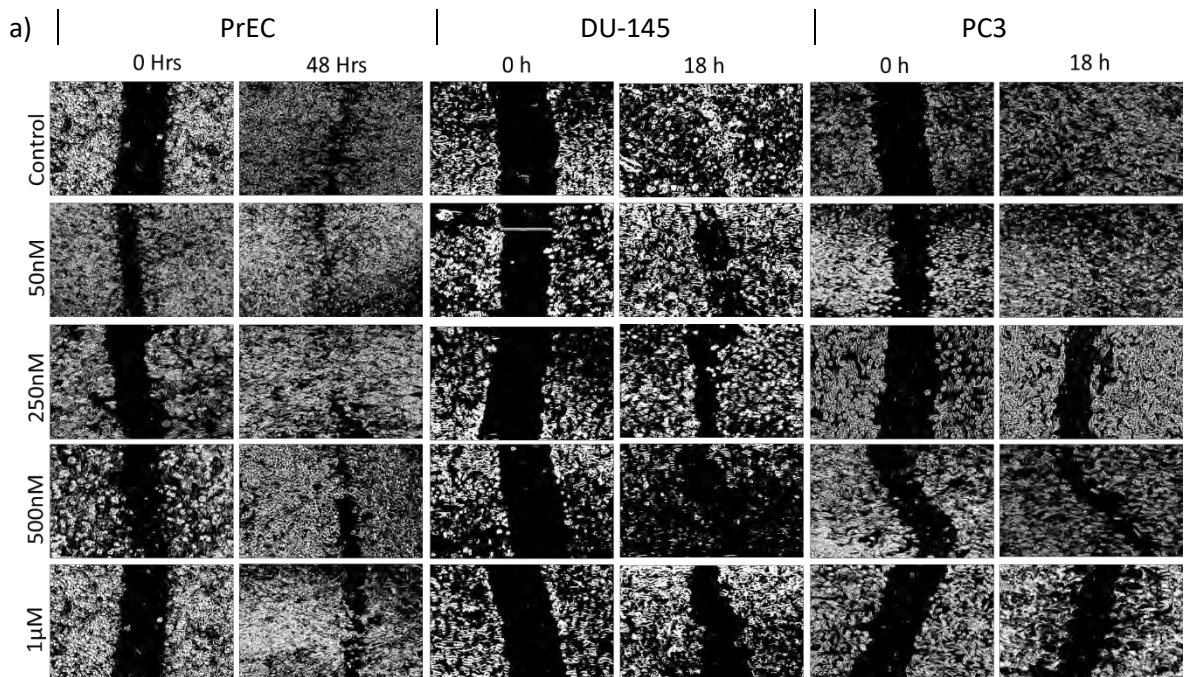
Después de establecer los grupos de líneas celulares con las cuales trabajaríamos, exploramos el efecto del iHsp90 sobre la migración de líneas celulares normales y de cáncer, para ello comenzamos a trabajar, empleando una línea celular de próstata (PrEC) y dos líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y DU-145).

Para establecer la dosis mínima efectiva del iHsp90 y un tiempo donde el efecto anti-migratorio sea significativo con respecto al control, realizamos ensayos de cierre de herida y de inhibición a un intervalo de dosis de [50, 250, 500 y 1000 μ M] a 12, 18 y 24 horas.

Para la línea celular normal PrEC encontramos que su cierre de herida se lleva a cabo hasta las 48 horas lo que refleja su poca capacidad para migrar, además de que el tratamiento con el inhibidor a ninguna de las dosis tuvo un efecto anti-migratorio significativo con respecto al control.

En el caso de las líneas celulares de cáncer de próstata, en ambos casos, los controles cerraron a las 18 horas, sin embargo, el efecto anti-migratorio del iHsp90 fue diferencial en cada una de las líneas celulares. En la línea celular PC3 a partir de 250nM observamos que las células dejan de migrar, dejando un porcentaje de área a las 18 horas de casi el 70 % (imagen 8). Por otra parte, DU-145 presentó una mayor sensibilidad, ya que a partir de 50nM comenzamos a detectar una disminución en la migración de la línea, este efecto se mantuvo hasta una dosis de 1000nM.

Aunque la línea celular DU-145 respondió a 50nM, fue a partir de 250nM que encontramos un 70% de herida, con respecto al control que cerro en su totalidad, por ello decidimos emplear ahora solo la dosis de 250nM y 1000nM para los siguientes experimentos.



Efecto anti-migratorio del iHsp90

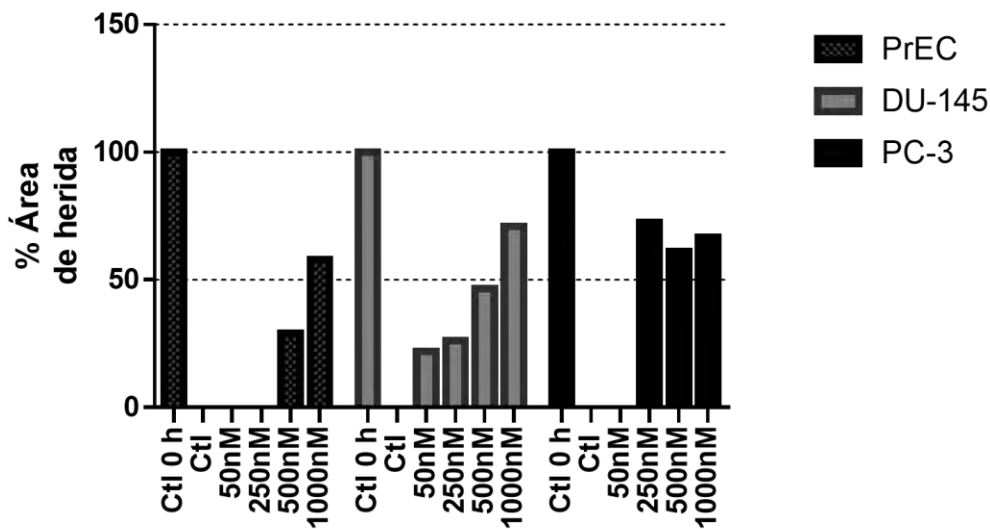


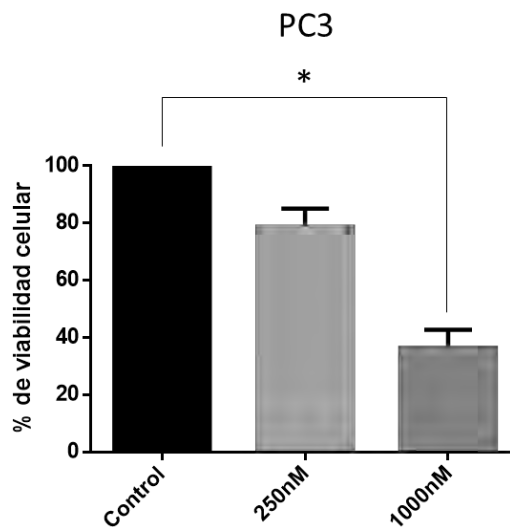
Figura 11. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer de próstata. Las líneas celulares de cáncer de próstata: PrEC, PC3 y DU-145 fueron tratadas con el 17-DMAG [50,250, 500 y 1000 nM], evaluando el efecto del inhibidor sobre su capacidad migratoria a las 18 h. **a)** Panel de migración de PrEC, PC3 y DU-145 a tiempo 0 y al tiempo de cierre de herida de su control. La migración celular fue evaluada mediante un ensayo de herida. **b)** gráfica del % de área de herida de las tres líneas celulares, la primera barra (Ctl 0 h) representa el control a las 0 horas de realizada la herida, la segunda barra representa el control a las 48 h y 18 horas, dependiendo el tiempo en el que se cerró la herida. Las últimas cuatro barras representan el área de herida a las 18 horas a cada dosis de tratamiento [50, 250, 500 y 1000nM]

De las dosis empleadas del iHsp90 en el ensayo de migración celular, seleccionamos las dosis de [250nM] y [1000 nM]. Estas dos dosis presentaron un efecto anti-migratorio mayor comparado con las demás dosis, especialmente en PC3.

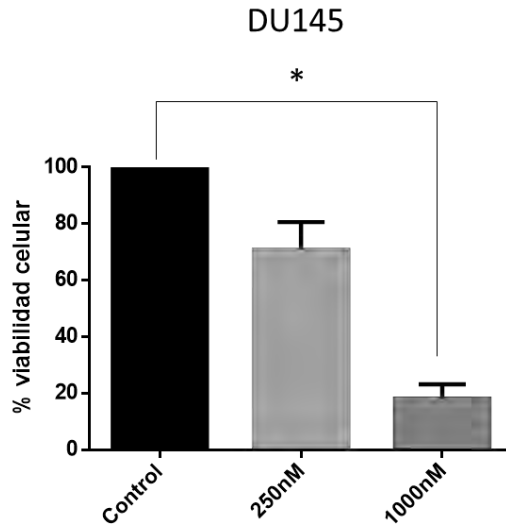
Uno de los problemas de los ensayos de migración por cierre de herida es que muchas veces la pérdida de la capacidad migratoria se confunde con la pérdida en la viabilidad celular por efecto de los tratamientos o de manera inversa también se confunde la migración con la proliferación celular, para ello evaluamos la viabilidad celular, empleando esta vez solo las líneas celulares de cáncer.

iii) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer próstata.

Con la finalidad de determinar el efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad de las cuatro líneas celulares con diferente genotipo, se empleó el ensayo de MTT. Se evaluaron dos concentraciones del iHsp90 [250 y 1000mM] a un tiempo de 18 h, para poder matizar si el efecto del iHsp90, era realmente anti-migratorio o si su uso afectaba su viabilidad celular.



a)



b)

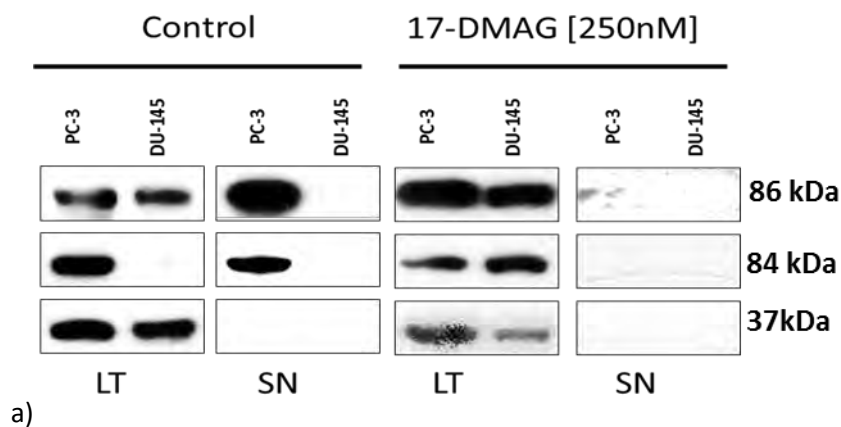
Figura 12. Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata. Las líneas celulares de cáncer de próstata: PC3 y DU-145 fueron incubadas sin tratamiento y con dos concentraciones del inhibidor 17-DMAG [250nM y 1000nM], todas evaluadas a un mismo intervalo de tiempo [18 h]. La viabilidad celular fue evaluada mediante MTT. Los datos representados en porcentajes son la media +/- error estándar de tres experimentos diferentes. Para los grupos tratados con el iHsp90 a una concentración de [1000nM] encontramos diferencias significativas. $p < 0.0001$, para cada una se utilizó un análisis de varianza.

Encontramos en los grupos tratados con [1000nM] del iHsp90, tanto de PC3 como de DU-145 diferencias estadísticamente significativas, mientras que para los grupos tratados a 250nM no hubo diferencias significativas.

iv) Perfil de expresión de los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β , intracelulares y extracelulares, basales e inducidos por el iHsp90, en líneas celulares de cáncer de próstata.

Con la finalidad de explicar la pérdida de la capacidad migratoria inducida por el iHsp90 analizamos por western blot las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , sub celular y extracelular. Analizamos si el aumento o disminución de estas proteínas se correlacionaban con la sensibilidad o la resistencia al efecto anti-migratorio del iHsp90. Se valoraron tanto las proteínas de extracto total como las proteínas concentradas del medio extracelular.

La pérdida de la localización de Hsp90 α y Hsp90 β se evaluó por WB y la ganancia o pérdida se presenta con un panel donde se observa claramente cómo es que el iHsp90 induce la pérdida de la localización de Hsp90 α y Hsp90 β en la línea celular PC3, mientras que en la línea celular DU-145, no presenta ninguna de las dos isoformas, ni en condiciones basales, ni en condiciones inducidas por el inhibidor. (Figura 10.a) Las dosis empleadas para este ensayo fueron de [250nm] y los extractos se obtuvieron a las 18 horas. Para analizar los cambios en los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β intracelularmente, se realizaron densitometrías. Los niveles relativos de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la línea celular PC3, controles y tratados con el iHsp90 a [250nM], encontramos diferencias significativas entre el grupo control y grupos tratados, observándose un aumento en sus niveles relativos, tanto de Hsp90 α como de Hsp90 β . Para los niveles relativos de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la línea celular DU-145, controles y tratados con el iHsp90 a [250nM], también encontramos diferencia significativa entre el grupo control y grupos tratados.



b)

c)

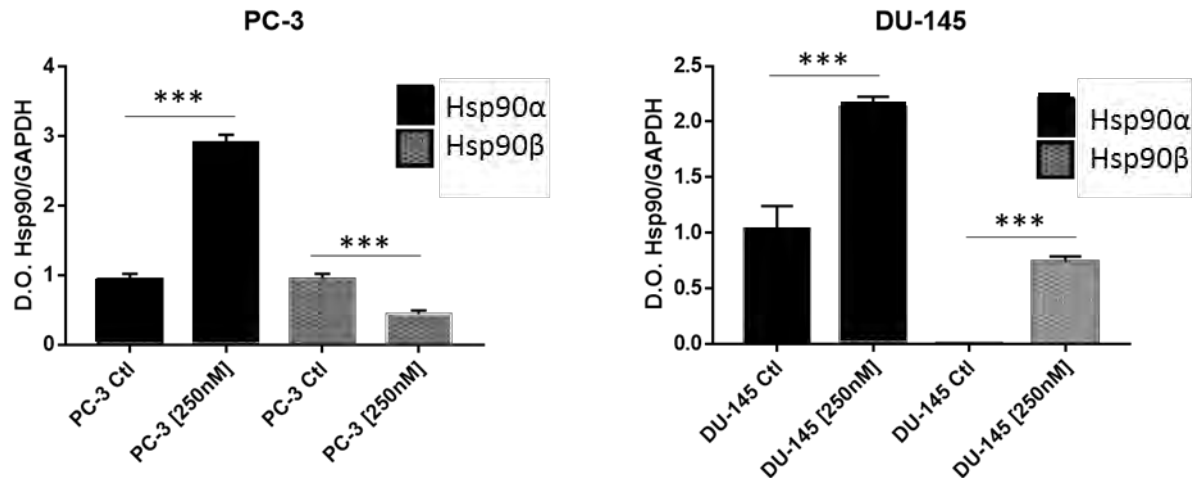


Figura 13. Cambio en el perfil de expresión de las proteínas Hsp90α y Hsp90β sub celular y extracelular inducida por el inhibidor 17-DMAG. En el primer panel se presenta la respuesta a iHsp90 a 250nM a 18 h. b y. c) presentan los Niveles relativos de las isoformas de Hsp90, Hsp90α y Hsp90β, en la línea celular PC3 y DU-145, controles y tratados con el iHsp90 a [250nM], donde encontramos diferencias significativas entre el grupo control y grupos tratados $p < 0.001$. La gráfica representa solo el cambio a nivel de proteína intracelular, el cambio de la proteína extracelular se interpreta como ausencia/presencia y esto se puede evaluar de manera visual en los paneles con las bandas de western blot.

v) Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer renal.

Con base a los resultados del ensayo dosis-respuesta al efecto anti-migratorio realizado en las líneas celulares de cáncer de próstata, empleamos la dosis mínima efectiva obtenida en dichos ensayos, esta vez en la línea celular de cáncer renal con la finalidad de ampliar y conocer mejor el efecto anti-migratorio del iHsp90 y asociarlo con la localización de Hsp90α y Hsp90β en el medio extracelular de líneas celulares de cáncer.

Las líneas celulares de cáncer renal empleadas para este ensayo fueron, ACHN y 786-O. Primero determinamos la capacidad migratoria de cada línea celular mediante ensayos de herida, donde encontramos que en la línea celular 786-O, el cierre de herida en condiciones basales fue a las 18 horas, mientras que ACHN presentó una menor capacidad para migrar, ya que a este mismo tiempo aun no cerró su herida. Para evaluar el efecto anti-migratorio del iHsp90, empleamos la dosis de [250nM] y registramos su efecto a las 18 horas en las dos líneas celulares. Para el caso de la línea celular 786-O disminuyó su migración, al presentar un área de herida de aproximadamente del 50% comparado con el control que

cerró por completo a las 18 horas. En el caso de ACHN no hubo cambios significativos del iHsp90 con respecto al control (Figura X)

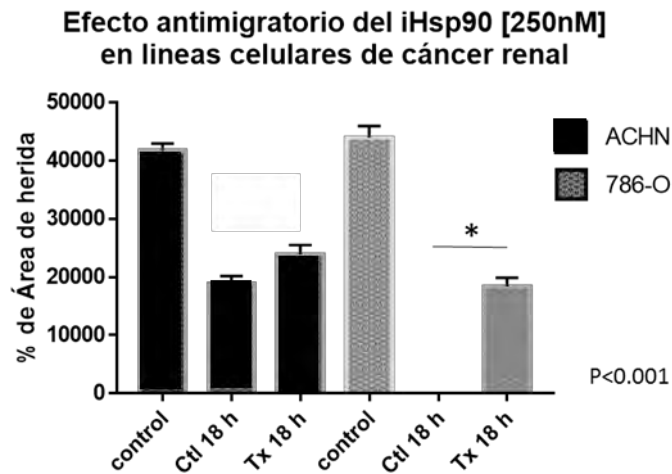
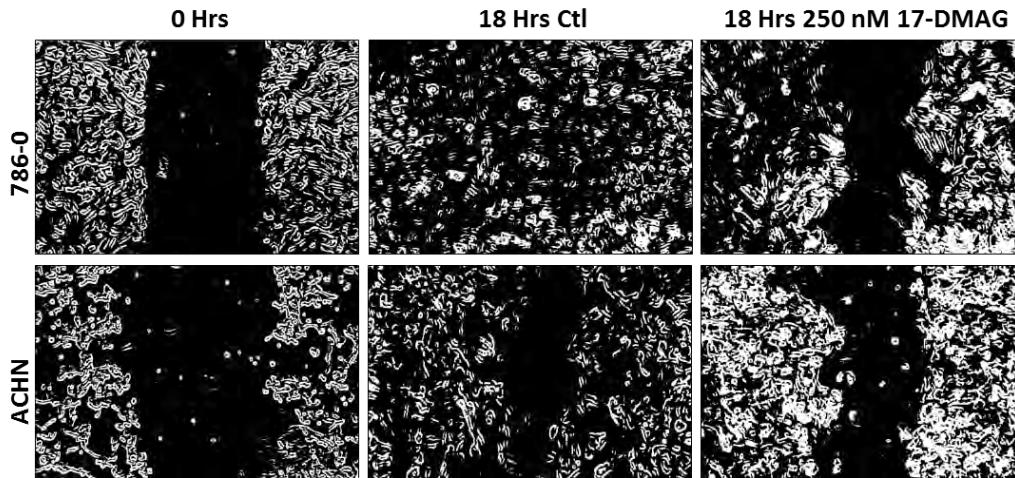


Figura 15. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG sobre la migración celular en líneas celulares de cáncer renal. Las líneas celulares de cáncer renal 786-O y ACHN fueron tratadas con el 17-DMAG [250nM], evaluando el efecto del inhibidor sobre su capacidad migratoria a las 18 h. a) La migración celular fue evaluada mediante un ensayo de herida en el cual se presenta el control a las 0 y 18 horas y el grupo tratado con el iHsp90 a [250nM] a las 18 h, de izquierda a derecha respectivamente. b) en esta figura se presenta una gráfica con el área de cierre de herida con desviación estándar de dos experimentos diferentes. La gráfica representa el área de herida donde encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado a las 18 horas. $p < 0.001$.

vi) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer renal.

Las dosis sub-letales empleadas en los ensayos de migración, se emplearon para evaluar su efecto sobre la viabilidad en las líneas celulares de cáncer renal. Para este ensayo ocupamos dos dosis [250nM] y [1000nM]. La viabilidad se evaluó mediante ensayos de MTT, a un tiempo de 18 horas. Con este ensayo confirmamos que el iHsp90 a una concentración de [250nM] no tiene un efecto citotóxico, ya que tanto en las líneas celulares de cáncer de próstata como en las de renal, el efecto sobre la viabilidad no presentó diferencias significativas con respecto al control. Por otra parte, la concentración [1000nM] causó efectos citotóxicos sobre ambas líneas celulares, por lo que descartamos esta concentración para posteriores ensayos.

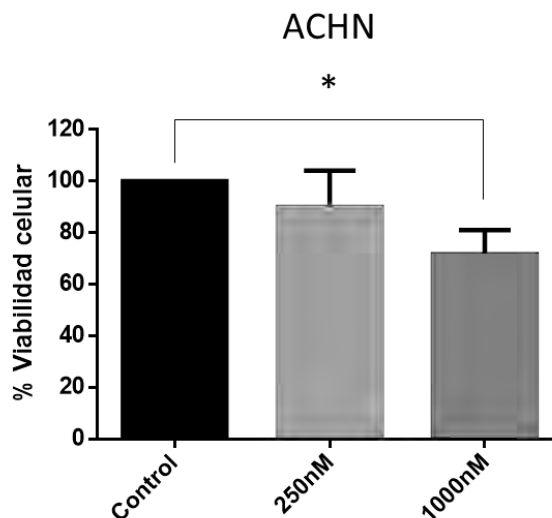
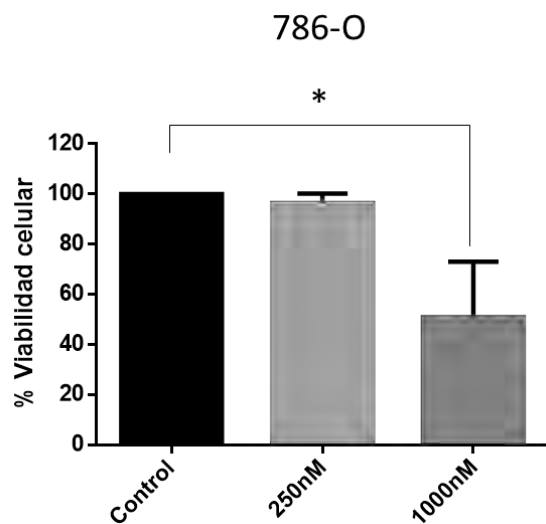
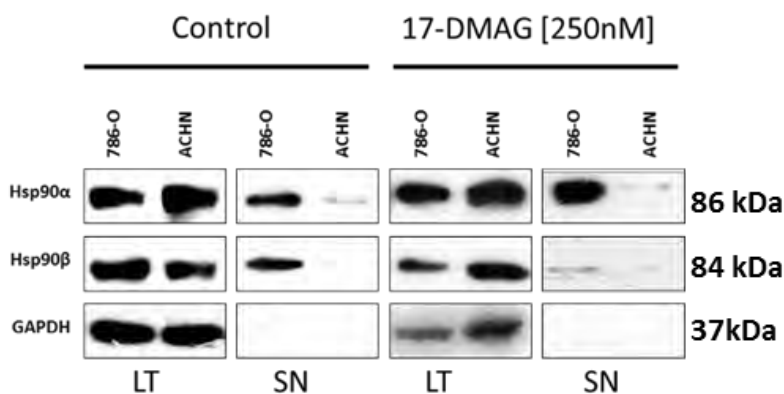


Figura 15.- Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer renal. Las líneas celulares de cáncer renal: ACHN y 786-O, fueron incubadas sin tratamiento y con dos concentraciones del inhibidor 17-DMAG [250nM y 1000nM], todas evaluadas a un mismo intervalo de tiempo [18 h]. La viabilidad celular fue evaluada mediante MTT. Los datos representados en porcentajes son la media +- error estándar de tres experimentos diferentes. $p < 0.001$ para los grupos tratados con iHsp90 a [1000nM]

vii) Localización de Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular, inducida por el iHsp90 en líneas celulares de cáncer renal.

La localización y los cambios de niveles de proteína intracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , se evaluaron mediante WB. Las proteínas se obtuvieron de células de cáncer renal tratadas con el iHsp90 a [250nM], incubadas durante 18 horas. La línea celular 786-O, presentó a ambas proteínas, Hsp90 α y Hsp90 β , en el medio extracelular en condiciones basales, mientras que en condiciones inducidas por el inhibidor perdió la localización de Hsp90 β . Por otra parte ACHN no presentó ninguna de las isoformas, bajo ninguna de las condiciones establecidas.



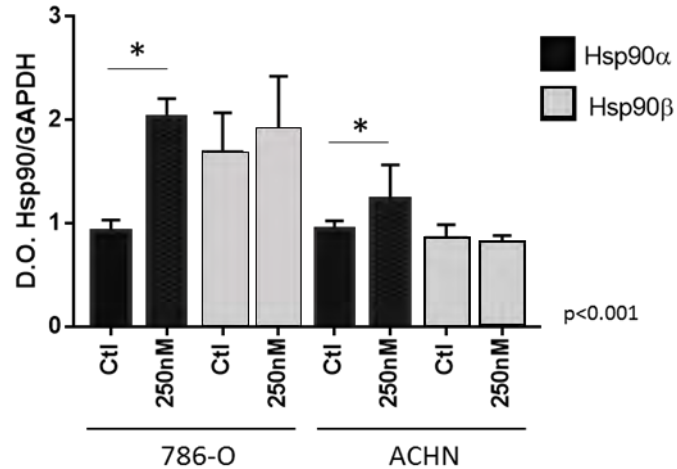


Figura 16. Cambio de perfil de expresión y localización de Hsp90α y Hsp90β en líneas celulares de cáncer renal Se presenta un panel con las líneas celulares de cáncer renal (ACHN y 786-O), las cuales fueron tratadas con el iHsp90 a [250nm], los extractos se obtuvieron a las 18 horas. En cada panel se presentan dos grupos, los controles (a la izquierda) y los tratados con el iHsp90 (a la derecha), se presentan de manera intercalada, de izquierda a derecha, las proteínas del lisado total (LT) seguidos por las proteínas de sobrenadante (SN), el primer grupo incluye un grupo control y el segundo al grupo tratado con el iHsp90. Se evaluó por western blot a Hsp90a, Hsp90b y GAPDH como control de carga. La gráfica a la izquierda representa solo el cambio a nivel de proteína intracelular, los cambios de la proteína extracelular se interpreta como ausencia/presencia y esto se puede evaluar de manera visual en los paneles con las banda de western blot. $p < 0.001$.

viii) Efecto del iHsp90 sobre la localización subcelular (nuclear-citoplasmática) de Hsp90.

Otra de las respuestas a la inhibición de Hsp90, que podría explicar la sensibilidad a la inhibición es la localización de Hsp90 dentro de la célula, para ello evaluamos por inmunofluorescencia la localización basal de Hsp90 (nuclear-citoplasmático) y la inducida por el inhibidor 17-DMAG. Para PC3 encontramos que el inhibidor a una dosis de [250nM] después de 18 horas de incubación induce un cambio en la localización de Hsp90, de ser exclusivamente citoplasmático basalmente pasa a localizarse en el núcleo. En el caso de DU-145, Hsp90 se localiza en núcleo y citoplasma, sin embargo, este perfil no cambia después de la inhibición con el 17-DMAG. (Figura 18)

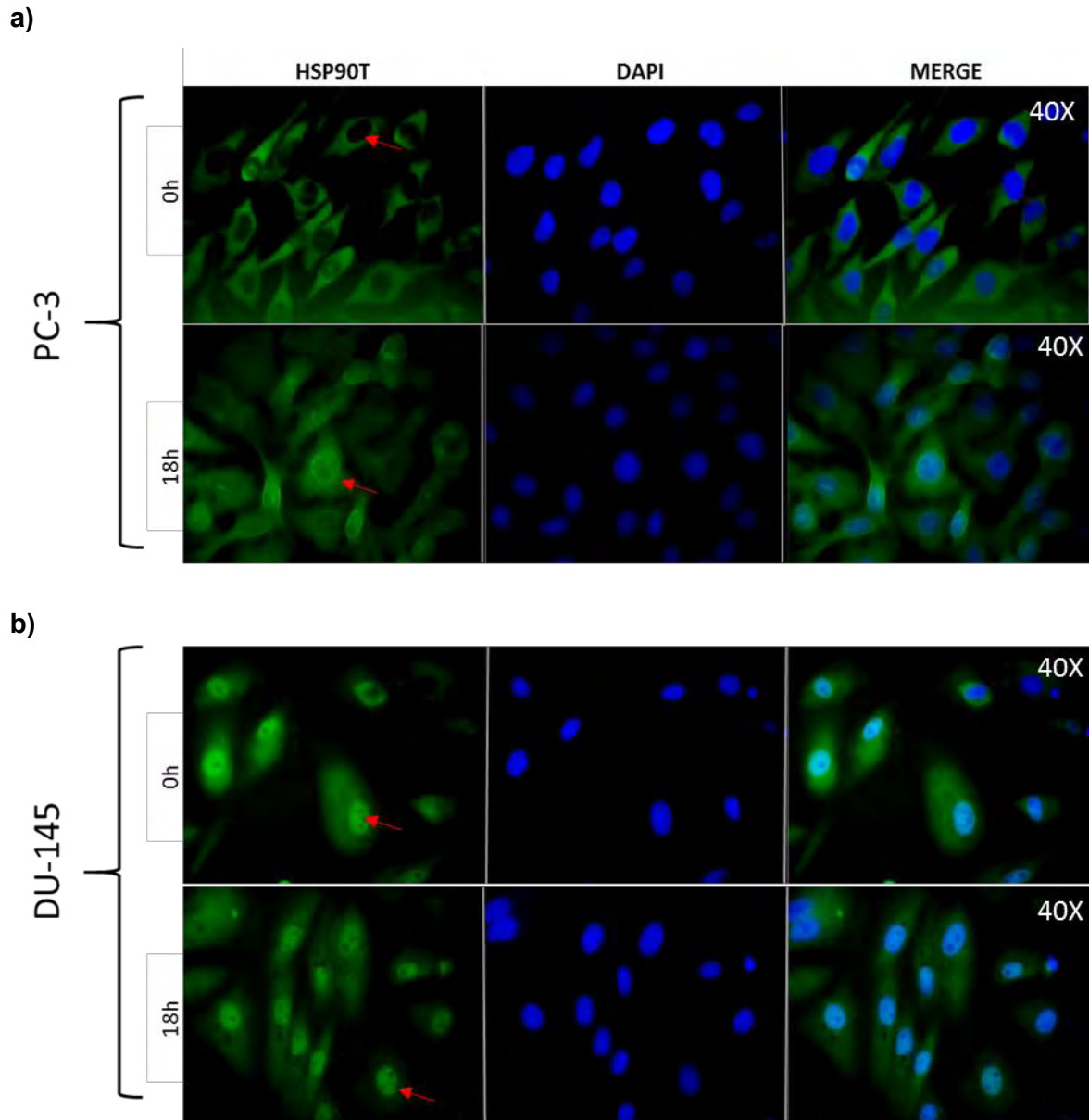


Figura 17.- Efecto del inhibidor 17-DMAG sobre la localización de Hsp90 en líneas celulares de cáncer de próstata. En el primer panel se observa la localización citoplasmática de Hsp90 marcada de color verde y una clara ausencia en el núcleo. El segundo panel, muestra el cambio en la localización de Hsp90 inducida por el inhibidor, ahora Hsp90 se localiza en el núcleo y en la zona peri nuclear. En la figura b se muestra la localización de Hsp90 en la línea celular de cáncer de próstata DU-145. Bajo condiciones basales (panel superior) como las inducidas por el inhibidor (panel inferior) la localización de Hsp90 se mantiene igual. Las células se trataron con el iHsp90 a una concentración de [250nM] y se incubó durante 18 horas, las fotografías se tomaron a los grupos tratados y grupos controles de cada línea celular.

Discusión y análisis de resultados

i) Localización extracelular de las proteínas de choque termico, Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular de líneas celulares de diversos tipos de cáncer.

Existe evidencia de que Hsp90 además de sobre expresarse en muchos tipos de cáncer también es secretada de manera constitutiva al medio extracelular. Se han descrito una gran variedad de líneas celulares como SH-76 (Kuroita, et al., 1972) células de fibrosarcoma HT-1080, células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Eustace, et al., 2004; McCready et al., 2010), células de cáncer color rectal HCT-8 (Chen et al., 2010), entre otras, sin embargo, son muy pocos los casos que han reportado de manera específica la presencia de alguna isoforma de Hsp90. Uno de estos reportes es el descrito en la línea celular de osteosarcoma MG63, donde reportan la presencia de Hsp90 β (Suzuki et al., 2010).

En el presente proyecto se determinó la presencia de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en doce líneas celulares pertenecientes a cuatro distintos tipos de cáncer: PC3, DU145 (próstata), ACHN, 786-O (renal), MDA-MB-231, MCF7 (mama) HeLa, C33a (cervix), A549, H1975, HCC827 y H1993 (pulmón). Como se había descrito previamente, Hsp90 se secreta de manera constitutiva en distintos tipos de cáncer, sin embargo, esta secreción a nivel de isoforma es de manera diferencial, por ejemplo, dentro del grupo de las líneas celulares de cáncer de próstata, PC3 secreta ambas isoformas mientras que DU-145 no secreta ninguna de las isoformas. En otros casos como las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7 secreta de manera constitutiva ambas isoformas, mientras que MDA-MB-231 solo secreta Hsp90 β y así para otros tipos de cáncer.

Hsp90 se secreta de manera constitutiva en las líneas celulares de cáncer, sin embargo, los mecanismos por los cuales se secreta, no han sido descritos, por ello se discute si su localización se debe a la necrosis de algunas células lo que promueve la liberación de Hsp90 al medio extracelular o si su secreción está regulada por algún mecanismo. En la gráfica x.a podemos observar que cada línea celular presenta patrones de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , distinta, lo que refleja que la secreción

no depende de los niveles intracelulares y que existe un mecanismo que lo regula y que debe ser estudiado.

Por otra parte, para la selección de grupos se analizó por separado los niveles de proteína extracelular de Hsp90a y Hsp90b, donde encontramos un patrón de localización. Encontramos que dos grupos presentaban un patrón de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β muy parecido, estos grupos fueron las líneas celulares de cáncer de próstata y las de renal. Para el caso de la línea celular de cáncer de próstata PC3, presentó niveles regulares de las dos isoformas, mientras que la línea celular DU145 no presentó ninguna de las dos isoformas. Por otro lado, las líneas celulares de cáncer renal presentaron un patrón parecido. La línea celular 786-O presentó una cantidad regular de Hsp90 α y Hsp90 β , mientras que la línea celular ACHN presentó bajos niveles de Hsp90 α y ausencia de Hsp90 β . Para seleccionar estos dos grupos, también se tuvo en consideración, que Hsp90 regula proteínas cliente involucradas en procesos como la migración. En el caso de cáncer renal se ha reportado que Hsp90 regula VHL, mientras que en cáncer de próstata regula a PTEN.

ii) Efecto anti-migratorio del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en líneas celulares de cáncer de próstata.

Con base al panel de localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β , se estableció un modelo con líneas celulares de cáncer de próstata y renal. Y se realizaron análisis de procesos celulares con los cuales se asociaba la localización de eHsp90 y la influencia del iHsp90 sobre ellos.

Actualmente se ha descrito el efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG sobre procesos asociados a metástasis, como migración e invasión (Morales Guadarrama, 20017) sin embargo los mecanismos asociados a la pérdida de estas capacidades se asocian principalmente a la pérdida de la actividad de chaperona molecular de Hsp90 en el citoplasma. A pesar de esto recientemente se ha descrito que Hsp90 en el medio extracelular promueve procesos como migración, a través de la remodelación de la matriz extracelular por la regulación de la activación de algunas MM-P (Eustace et. Al., 2004). También se ha descrito que regula dominios extracelulares de RTKs facilitando su auto-fosforilación, desencadenando río abajo la activación de vías de señalización

involucradas en la migración (Sidera et al., 2008). Aunado a todos estos hallazgos, también se ha demostrado que la inhibición farmacológica de Hsp90 con derivados de la geldanamicina como el 17-AAG afectan la actividad de eHsp90 (Feng, Q et al., 2017). En este proyecto empleamos un inhibidor de Hsp90 derivado de la geldanamicina, el 17-DMAG con el propósito de evaluar el efecto anti migratorio en la línea celular de próstata normal y de cáncer, afectando la actividad de Hsp90 intra y extra celular. En la línea celular normal (PrEC) encontramos en principio que presentaba poca capacidad migratoria, además de ser prácticamente insensible al efecto del iHsp90. Este fenómeno puede ser explicado porque en células normales la actividad de Hsp90 es menor que en condiciones de estrés o en patología como el cáncer. Por otra parte, DU-145 respondió al iHsp90 a partir de una dosis de [50nM], sin embargo, el porcentaje de área de herida, era menor al 50%, fue hasta una dosis de [1000nM], donde el efecto era más marcado, evitando que las células migraran dejando un área de herida del 70%, a pesar de esto, esta dosis ha sido reportada para algunas líneas celulares como citotóxica (Mejia-Hernandez, 2017)

En el caso de PC3, la línea celular con el fenotipo más agresivo, el efecto anti-migratorio del iHsp90, resulto insensible a dosis bajas. El efecto anti-migratorio se observó a partir de [250nM] con un efecto muy parecido hasta [1000nM].

Una de las desventajas de evaluar la migración por ensayos de herida es que la migración como la pérdida de esta, puede confundirse con proliferación o pérdida de la viabilidad, respectivamente. Sin embargo, las líneas celulares que empleamos presentan un promedio de división que va entre las 27.1 y 32.3 horas (Kuksin D. Chan LL. 2013) y en los ensayos de herida encontramos un efecto anti-migratorio de iHsp90 a tiempos cortos (18 h) por lo que efectivamente el iHsp90 tuvo efecto sobre la capacidad migratoria de cada línea, particularmente a dosis altas. Por otra parte, la pérdida de la viabilidad aún no había sido descartada para ello realizamos ensayos de viabilidad celular por MTT utilizando dosis altas [250nM] y [1000Nm] de iHsp90, 17-DMAG.

iii) Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer próstata.

La actividad como chaperona molecular de Hsp90, es determinante en la regulación de muchas proteínas cliente, involucradas en vías de señalización asociadas a la proliferación celular. Generalmente los iHsp90 derivados de la geldanamicina actúan sobre el dominio amino terminal de Hsp90, afectando principalmente su actividad como chaperona molecular disminuyendo en muchos casos la viabilidad de las células por acumulación de proteínas mal plegadas (Goolijarsingh, et al., 2006). Existen reportes de que iHp90 poseen una actividad y afinidad de unión en el intervalo de 0.3-10.00 μ M (Roe S. M., et al., 1999),

Para este proyecto requeríamos una dosis del iHsp90 donde efecto biológico sobre las células fuera exclusivamente anti-migratorio, sin que su viabilidad sea afectada. Por ello evaluamos la viabilidad celular a [250nM] y [1000nM] de las líneas celulares PC3 y DU.145. En ambos casos encontramos que la dosis a [1000nM] afectaba la viabilidad celular de manera significativa comparada con el control, mientras que para [250nM] encontramos una disminución en su viabilidad, sin embargo, no era estadísticamente significativa en ningún caso con respecto al control. Este resultado nos dejaba al iHsp90 a [250nM], como una dosis mínima con un efecto exclusivamente anti-migratorio, particularmente en PC3 donde el efecto a esta dosis fue más marcado. A partir de este experimento descartamos el resto de concentraciones y solo utilizamos una concentración del iHsp90 a [250nM]

iv) Perfil de expresión de los niveles de proteína de Hsp90 α y Hsp90 β , intracelulares y extracelulares, basales e inducidos por el iHsp90, en líneas celulares de cáncer de próstata.

Si bien se ha descrito una sobreexpresión de Hsp90 en algunos tipos de cáncer como una cualidad distintiva de las células tumorales, el papel diferencial de las isoformas ha sido poco explorado. Previamente se han determinado 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) A pesar de estos hallazgos se ha estudiado muy poco como afecta el inhibidor en la presencia extracelular de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β . En este proyecto

encontramos que la sensibilidad de la línea celular PC3 al efecto anti-migratorio del iHsp90 puede estar relacionada directamente con la pérdida de la localización de Hsp90 en el medio extracelular. Al emplear una dosis que no ha sido reportada con efectos negativos sobre la viabilidad celular, deducimos que su actividad al ser mínima, no afecta su actividad como chaperona molecular, sin embargo, encontramos que la dosis del iHsp90 [250nM] induce la pérdida de localización de Hsp90 en el medio extracelular, lo que podría estar determinando la sensibilidad de PC3 al efecto anti-migratorio del iHsp90.

v) Asociación de eHsp90 con la respuesta al iHsp90 en líneas celulares de cáncer renal sobre la viabilidad y migración celular.

De los grupos seleccionados del panel del primer experimento, también seleccionamos a las líneas celulares de cáncer renal, por la característica de que Hsp90 α se secreta de manera inversa, además con este experimento buscamos ampliar el estudio de eHsp90 y sus isoformas eHsp90 α y eHsp90 β y los cambios en la localización de estas proteínas inducidas por el iHsp90. En 786-0 particularmente encontramos una asociación entre la pérdida de la capacidad migratoria inducida por el inhibidor con la pérdida de la localización extracelular de eHsp90 β , este hallazgo a diferencia de las líneas celulares de cáncer de próstata descritas en este mismo trabajo, nos proporciona información para pensar que eHsp90 β y no eHsp90 α está involucrado en la sensibilidad al efecto anti-migratorio del iHsp90. Sin embargo, es importante ampliar estos estudios más líneas celulares para determinar si este patrón es exclusivo de estas líneas celulares o si puede funcionar como un patrón, que eventualmente pueda predecir la agresividad de algún tipo de cáncer.

vi) Efecto del iHsp90 sobre la localización subcelular (nuclear-citoplasmática) de Hsp90.

Actualmente se sabe poco sobre la relación y relevancia que existe entre eHsp90 y la actividad de Hsp90 en compartimentos como el núcleo. Sin embargo, se ha demostrado que eHsp90 promueve la motilidad de las células tumorales facilitando la metástasis (Eustace et al., 2004; Gopal et al., 2011; Hance et al., 2012; Lagarrigue et al., 2010; Sidera, Gaitanou, Stellas, Matsas, y Patsavoudi, 2008; Stellas, Karameris y Patsavoudi, 2007;

Tsutsumi et al., 2008; Wang et al., 2009). Uno de los mecanismos en los que eHsp90 está involucrada en estas actividades es a través de provocar eventos de señalización (Cheng et al., 2008; Gopal et al., 2011). Esta vía estimulada por eHsp90 puede estar mediada por el receptor LRP1, desencadenando a su vez la activación de ERK y AKT (Gopal et al., 2011; Hance et al., 2012; Tsen et al., 2013). Aunque la relación entre eHsp90 y eventos epigenéticos no han sido muy estudiados, recientemente se ha descrito que la señalización eHsp90-ERK-EZH2 en cáncer de próstata es importante para la migración ya que promueve la transición epitelio mesénquima. Además de estas propiedades de eHsp90, intracelularmente también juega papeles muy importantes, particularmente en el núcleo regulando algunas de sus proteínas cliente como reguladores transcripcionales. En nuestro proyecto exploramos que es lo que sucedía con la localización de Hsp90 dentro de la célula y encontramos que a las 18 horas a una dosis de [250nM] del iHsp90, Hsp90 se transloca al núcleo, cuando basalmente era exclusivamente citosólica, esto en la línea celular PC3. Por lo que podríamos pensar en una actividad cooperativa de Hsp90 dentro de la célula y extracelularmente. A pesar de esto la pérdida de la localización extracelular de Hsp90 α y Hsp90 β y la translocación no lo podemos asociar a un efecto anti-migratorio. Por lo que posiblemente la translocación al núcleo de Hsp90 inducida por el iHsp90 a una dosis de [250nM] puede tener un papel más bien cito-protectivo, ya que a esta dosis aún no hay una respuesta negativa a la viabilidad celular. Sin embargo, faltan aún más estudios para entender esta respuesta de las células al iHsp90 y su localización subcelular.

Conclusión

- ✓ Los niveles de proteína de Hsp90 α Hsp90 β intracelular no correlacionan con los niveles de proteína extracelular Hsp90 α Hsp90 β , lo que nos sugiere que la secreción al medio extracelular de estas proteínas responde a mecanismos regulados dependiente de cada línea celular, además de una independencia funcional.
- ✓ La inhibición farmacológica de Hsp90 a una dosis sub-letal de [250nM] ejerce sobre la línea PC3 un efecto anti-migratorio y una baja toxicidad. Este resultado lo que nos sugiere es que el efecto del iHsp90 sobre la migración está asociado con la pérdida de la localización de Hsp90 α Hsp90 β y no con la pérdida de su actividad como chaperona molecular intracelularmente.
- ✓ La localización subcelular de Hsp90 en la línea celular PC3, pasa de ser exclusivamente citoplasmática a citoplasmática-nuclear, lo que nos podría estar diciendo que la inhibición farmacológica de Hsp90 induce la localización de Hsp90 en el núcleo

Perspectivas

Como perspectivas del presente trabajo es importante determinar si la pérdida de la capacidad para migrar es causada por la pérdida de la localización de Hsp90 α y Hsp90 β en el medio extracelular.

Para ello es necesario establecer un modelo en el que demostremos que estas proteínas están involucradas en estos procesos. Para demostrar esto tenemos dos caminos: la primera es sobreexpresar una isoforma esperando que se secrete al medio y evaluar si aumenta o disminuye la capacidad para migrar del modelo celular. La segunda es emplear medios acondicionados, obtenidos de otros cultivos, con una o ambas isoformas con la finalidad de aclarar que proteína es la que está involucrada en dicho proceso y evaluar la migración celular.

Por otra lado evaluar en un modelo altamente agresivo y metastásico, que presente a ambas isoformas en el medio extracelular, el efecto del silenciamiento de ambas isoformas, asegurándonos a través de ensayos de herida que la migración disminuye significativamente.

El objetivo de estos estudios es trasladar la investigación básica a una investigación translacional, para ello será necesario analizar la presencia/ausencia de Hsp90 α y Hsp90 β en muestras de orina y de sangre de pacientes con tumores urogenitales y asociarlos con la progresión de la enfermedad. La finalidad de estos análisis es establecer una de las isoformas con un parámetro clínico o como un biomarcador de respuesta a tratamientos

Bibliográfia

- Eustace, B., Sakurai, T., Stewart, J., Yimlamai, D., Unger, C., & Zehetmeier, C. et al. (2004). Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. *Nature Cell Biology*, 6(6), 507-514.
- Basu, Sreyashi, et al. "Necrotic but Not Apoptotic Cell Death Releases Heat Shock Proteins, Which Deliver a Partial Maturation Signal to Dendritic Cells and Activate the NF- κ B Pathway." *International Immunology*, vol. 12, no. 11, 2000, pp. 1539–1546., doi:10.1093/intimm/12.11.1539.
- Bhatia, A., O'Brien, K., Chen, M., Woodley, D. and Li, W. (2016). Keratinocyte-Secreted Heat Shock Protein-90 α : Leading Wound Reepithelialization and Closure. *Advances in Wound Care*, 5(4), pp.176-184.
- Chen JS, Hsu YM, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS. Secreted heat shock protein 90 α induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF- κ B-mediated integrin α V expression. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:25458–25466
- Clayton, A. (2005). Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *Journal of Cell Science*, 118(16), pp.3631-3638.
- Csmerly P, Schnaider T, Sóti C, Prohászca 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.
- Dong, H., Luo, L., Zou, M., Huang, C., Wan, X., Hu, Y., Le, Y., Zhao, H., Li, W., Zou, F. and Cai, S. (2017). Blockade of extracellular heat shock protein 90 α by 1G6-D7 attenuates pulmonary fibrosis through inhibiting ERK signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, pp. ajplung.00489.2016.
- Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian Journal of Andrology*. 2014;16(3):378-386. doi:10.4103/1008-682X.122876.
- Feder, M. and Hofmann, G. (1999). HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1), pp.243-282.
- Feng, Q., Zhang, C., Lum, D., Druso, J., Blank, B., Wilson, K., Welm, A., Antonyak, M. and Cerione, R. (2017). A class of extracellular vesicles from breast cancer cells

activates VEGF receptors and tumour angiogenesis. *Nature Communications*, 8, p.14450.

- Gopal, U., Bohonowych, J., Lema-Tome, C., Liu, A., Garrett-Mayer, E., Wang, B. and Isaacs, J. (2011). A Novel Extracellular Hsp90 Mediated Co-Receptor Function for LRP1 Regulates EphA2 Dependent Glioblastoma Cell Invasion. *PLoS ONE*, 6(3), p.e17649.
- Gopal, U., Bohonowych, J., Lema-Tome, C., Liu, A., Garrett-Mayer, E., Wang, B. and Isaacs, J. (2011). A Novel Extracellular Hsp90 Mediated Co-Receptor Function for LRP1 Regulates EphA2 Dependent Glioblastoma Cell Invasion. *PLoS ONE*, 6(3), p.e17649.
- Gupta RS. 1995. Phylogenetic analysis of the 90-kDa heat shock family of protein sequences an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12:1063-73
- Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646-674.
- Johnson, J.L. (2012). Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 607–613
- Li, T., Jiang, H., Tong, Y. and Lu, J. (2018). Targeting the Hsp90-Cdc37-client protein interaction to disrupt Hsp90 chaperone machinery. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1)
- Li, W, et al. "Secreted Heat Shock Protein-90 (Hsp90) in Wound Healing and Cancer." *Health Communication*, Oxford PharmaGenesis, Oxford, europepmc.org/articles/PMC3266443.
- Liao, D., Jin, Z., Baas, A., Daum, G., Gygi, S., Aebersold, R. and Berk, B. (2000). Purification and Identification of Secreted Oxidative Stress-induced Factors from Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), pp.189-196.
- Millson SH, Truman AW, Racz A, Hu B, Panaretou B, Nuttal J, Mollapour M, Soti 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 Hsp90 beta generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *FEBS Journal*, 274(17): 4453-4463.
- Miyata, Y., Nakamoto, H. and Neckers, L. (2012). The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *CPD*, 19(3), pp.347-365.

- Modi, S. and Jhaveri, K. (2015). Ganetespib: research and clinical development. *OTT*, p.1849.
- Morales Guadarrama, Silvia Gabriela, sustentante, Efecto del inhibidor 17-dmag sobre la activación de beta-catenina mediada por hsp90alfa y hsp90beta en líneas celulares de carcinoma de cérvix / tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas, presenta Silvia Gabriela Morales Guadarrama; tutor principal de tesis Luis Alonso Herrera Montalvo -- 2017
- Nolan, K., Franco, O., Hance, M., Hayward, S. and Isaacs, J. (2015). Tumor-secreted Hsp90 Subverts Polycomb Function to Drive Prostate Tumor Growth and Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 290(13), pp.8271-8282.
- Nolan, K., Kaur, J. and Isaacs, J. (2017). Secreted heat shock protein 90 promotes prostate cancer stem cell heterogeneity. *Oncotarget*.
- Pearl, L. (2016). Review: The HSP90 molecular chaperone-an enigmatic ATPase. *Biopolymers*, 105(8), pp.594-607.
- Perdew GH, Hord N, Hollenback CE, Welsh MJ. 1993. Localization and characterization of the 86- and 84- Heat Shock Protein in Hepa 1c1c7 Cells. *Experimental Cell Research*, 209:350-356.
- Prodromou, C. (2012). The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(3), pp.614-623.
- Ritcher K, Hendershot LM, Freeman BC. 2007. The cellular world according to Hsp90. *Nature Structural y Molecular Biology*, 14:90-94
- Ritossa FA. New Puffing Pattern Induced by Temperature Shoch and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-3.
- Schopf, F., Biebl, M. and Buchner, J. (2017). The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), pp.345-360.
- Sims, J., McCready, J., & Jay, D. (2011). Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90 α Assist in Matrix Metalloproteinase-2 Activation and Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Plos ONE*, 6(4), e18848.
- Sreedhar AS, Kalmar E, Csemerly P, Shen YF. 2004. Hsp90isoforms: function, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1-3):11-15.
- Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2, 185–194
- Stellas, D., El Hamidieh, A. and 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(1), p.51.

- Ullrich, S., Robinson, E., Law, L., Willingham, M., & Appella, E. (1986). A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 83(10), 3121-3125.
- Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, Tong M, Chang G, Luo Y. The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106:21288–21293
- Yu, X. (2006). The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein. *Cancer Research*, 66(9), pp.4795-4801.
- 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.
- Zubriené A, Malgorzata J, Chaleckis R, Michailoviené V, Voroncova A, VenclovasC, Zylicz M, Matulis D. 2010. Thermodynamics of radicicol binding to human Hsp90 alpha and beta isoforms. *Biophysical Chemistry*, 152: 153-163.

Anexos

i. Reactivos y líneas celulares

Las líneas celulares empleada en este estudio fueron de cáncer de cinco tipo de tejido: DU-145, PC3, LnCap, (Próstata) HeLa, C33a, (Cervix) MCF7, MDAMB-231, (Mama) 786-O, ACHN, (Renal) A549, H1993, H1975 Y HCC827 (Pulmón), cada línea celular se mantuvo en condiciones determinadas, especificadas en la tabla 6.

Línea celular	Origen tisular	Medio de cultivo	CO2 y temperatura
PC3	Próstata	DMEM-F12	5% a 37 °C
DU145	Próstata	DMEM-F12	5% a 37 °C
LnCap	Próstata	RPMI	5% a 37 °C
MDA-MB-231	Mama	L-15	0% a 37 °C
MCF-7	Mama	DMEM-F12	5% a 37 °C
HeLa	Cérvix	DMEM-F12	5% a 37 °C
C33a	Cérvix	MEM	5% a 37 °C
A549	Pulmón	DMEM-F12	5% a 37 °C
H1975	Pulmón	RPMI	5% a 37 °C
HCC827	Pulmón	RPMI	5% a 37 °C
H1993	Pulmón	RPMI	5% a 37 °C
ACHN	Renal	EMEM	5% a 37 °C
786-O	Renal	RPMI	5% a 37 °C

Tabla 6. Condiciones en las que se mantuvieron las líneas celulares. Los medios L-15, DMEM-F12, RPMI, EMEM son de marca Corning hechos en USA. El SFB es de la marca GIBCO, New York, USA. El antibiótico es de la marca invitrogen.