



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"Participación de Hsp90 α y Hsp90 β durante el efecto pro-apoptótico del inhibidor 17-DMAG en células de cáncer renal VHL-/-, PTEN-/-."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

MITZI LORENA CÓRDOVA NÁJERA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLO CESAR CORTÉS GONZÁLEZ

CO-ASESORA:
DRA. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ÀRCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2016



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.

Índice General

RESUMEN

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE GRÁFICAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
1. Proteínas de choque térmico (Hsp)	1
1.1. Función de las Hsp	2
1.2. Clasificación de las Hsp	4
2. Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)	5
2.1 Estructura y función de las Hsp90	6
2.2. Proteínas de choque térmico Hsp90 α y Hsp90 β	9
3. Hsp90 e isoformas en la fisiología	12
4. Hsp90 e isoformas en la fisiopatología.....	13
5. Hsp90 en cáncer	13
5.1. Hsp90 y los “hallmarks” del cáncer	14
6. Hsp90 en cáncer renal	17
6.1. Implicación clínica de los genes VHL y PTEN en Cáncer renal: posible papel de Hsp90	20
6.2. Terapia actual contra el cáncer renal	22

6.3. Terapia contra el cáncer renal : inhibición de Hsp90	22
7. Justificación	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	31
1. Establecimiento de un modelo de inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en células de riñón humano normal y de cáncer.....	31
2. Perfil de expresión de las isoformas Hsp90a y Hsp90b en inhibición aguda y crónica...	34
3. Perfil de expresión de proteínas “cliente” de Hsp90 asociadas a muerte celular.....	37
4 Cambios nucleares asociados a muerte celular por apoptosis por la inhibición de Hsp90 con 17-DMAG en células de cáncer renal 786-O.....	38
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	55
1. Figuras suplementarias.....	54
1.1 (Figura S1). Ensayos de Viabilidad celular con 1µM de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293T).....	54
1.2 (Figura S2). Ensayos de Viabilidad celular con 500nM de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293T).....	55
2 Líneas celulares: Morfología	56
a) HEK-293T	56
b) 786-O	56
c) ACHN	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS**A**

ATP: Adenosina tri-fosfato

C

CCR: Células de carcinoma renal

E

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EPO: Eritropoyetina

F

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

G

GLUT-1: Transportador de glucosa, tipo 1

H

HIF-1 α : Factor inducido por hipoxia 1-alfa

HSEs: Elementos de respuesta a choque térmico.

HSFs: Factores de choque térmico.

HSP: Proteínas de choque térmico

I

IGFR: Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina

M

mTOR: Diana de rapamicina en mamíferos

P

PI3-K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PI: Fosfatidil-inositol,

PIP: Fosfatidil-inositolmonofosfato.

PIP2: Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato.

PIP3: Fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato.

PKB: Proteína cinasa B (también AKT).

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

R

RE: Retículo endoplásmico

T

TGF: Factor de crecimiento transformante.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

V

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VHL: Factor Von-Hippel Lindau

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Localización y función celular de las familias de proteínas de choque térmico.....	4
Tabla 2.	Características genotípicas y fenotípicas de las líneas celulares renales empleadas para los experimentos in vitro.....	28
Tabla 3.	Lista de anticuerpos empleados en western blot.....	58
Tabla 4.	Preparación de geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE.....	59
Tabla 5.	Preparación de geles desnaturizantes de poliacrilamida al 15% SDS-PAGE.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Resumen de algunas de las señales fisiológicas más relevantes que activan la inducción de la síntesis de proteína de choque térmico en la célula (Tomada y editada de Kevin et. al. 1992).....	2
2	Estructura cristalina en tercera dimensión y sus dominios de Hsp90 (Tomada y editada Protein Data bank ID: 137184).....	6
3	Representación esquemática del ciclo de “chaperona” de Hsp90 (Tomada de Johnson, 2012)	8
4	Representación esquemática de varias isoformas de Hsp90 (Tomada y editada de Sreedhar et al. 2004)	8
5	Isoformas Hsp90α y Hsp90β. (Tomada y editada de Sreedhar et al., 2004).....	10
6	Comparación de la conformación entre Hsp90α y Hsp90β (Tomada de Cortés-G et al., 2008).....	12
7	“Hallmarks” del cáncer (Tomada de Hanahan y Weinberg, 2011).....	15
8	Interacción de Hsp90 y Hsp70 en la vía de señalización que regula la supervivencia celular y apoptosis (Tomada y editada de Sreedhar y Csermely, 2004)	17
9	Estimación de tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad: ambos sexos. Obtenida de GLOBOCAN 2012 (IARC) Sección de Vigilancia del Cáncer.....	18
10	Esquema de la participación de Hsp90 en procesos que regula la fisiología renal (Tomada de Cortés-González C, et al., 2008).....	19
11	Vía de señalización PI3K/Akt	22
12	Estructura química del inhibidor Hsp90 (geldanamicina) y de sus análogos químicos: 17-AAG y 17-DMAG (Tomada de Hostein et al., 2001).....	24

13	Western blot de las proteínas “cliente” de Hsp90 asociadas a muerte celular por tratamiento con 17-DMAG.....	38
14	Línea celular de cáncer renal 786-O sin tratamiento: morfología nuclear mediante tinción de DAPI.....	39
15	Línea celular 786-O tratadas con 17-DMAG a una concentración 250nM: morfología nuclear mediante tinción de DAPI.....	40
16	Línea celular 786-O tratadas con 17-DMAG a una concentración 500Nm: morfología nuclear mediante tinción de DAPI.....	41

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

1S	Gráfica de viabilidad celular con 1 μ M de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293T).....	55
2S	Gráfica de viabilidad celular con 500nM de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293T).....	56

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1	Ensayo de viabilidad en la línea celular 786-O tratadas con una concentración de 250nM del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en línea a diferentes tiempos.....	33
2	Ensayo de viabilidad en la línea celular 786-O tratadas con una concentración de 500nM del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en línea a diferentes tiempos.....	33
3	Ensayo de proliferación celular por inhibición de Hsp90 en línea celular de carcinoma renal humano 786-O a tiempos largos.....	34
4	Perfil de expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β durante la inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en la línea celular de riñón normal HEK-293T.....	35
5	Perfil de expresión de proteínas Hsp90 α y Hsp90 β durante la inhibición aguda y crónica de Hsp90 en la línea celular de carcinoma renal humano 786-O	37

Agradecimientos:

A mi director de proyecto, Dr. Carlo César Cortes González.

Por su guía, comprensión, paciencia y valiosos consejos durante el desarrollo de mi trabajo. Por brindarme la oportunidad de permanecer en su laboratorio y proporcionarme siempre material para no tener una excusa para detenerme. Porque gracias a usted mi interés por la investigación creció y sigue manteniendo su confianza en mí.

A mis padres.

Por haberme forjado como la persona que hoy soy, todos mis logros hasta ahora se los debo a ustedes incluyendo este trabajo. Porque me formaron con reglas y algunas libertades, que al final me hacen la mujer que hoy escribe, porque no hubo un día en que no me dieran su apoyo, sus palabras de aliento y me brindaran su amor y comprensión en momentos difíciles no sólo académicos, sino emocionales. Porque me motivan constantemente para alcanzar mis anhelos y hoy obtengo tan sólo el primero de mi carrera profesional, y saben que voy por más y ustedes siempre estarán presentes en cada uno de mis logros, por todo y mucho más los amo, GRACIAS.

A mis hermanos.

Por brindarme el espacio y cariño durante mis momentos insoportables a causa de desvelos y frustraciones que pase durante el transcurso de mi carrera, porque me han aportado grandes cosas a mi vida aun siendo menores que yo, porque con algunas de sus frases y risas me ayudaron a enfrentar momentos difíciles y alegraron mis noches.

A mi bebé.

Porque aunque aún no te tengo en mis brazos en estos últimos meses el simple hecho de tu pronta llegada me ha brindado una felicidad indescriptible, potenciado mi esfuerzo y mis ganas por buscar más allá de lo mejor no sólo para mí, por obsequiarme el regalo de un amor puro, por encontrar el lado dulce y emocionante de la vida. Eres mi motivación constante para no dejarme caer y concluir con éxito tan sólo este primer paso a mi desarrollo profesional. GRACIAS mi cielo, mi bebé.

A mis amigos.

A esas personas únicas y especiales que a pesar de los años me mantienen en sus vidas, y me han permitido estar en las suyas, compartir logros y aventuras, crear anécdotas y hermosos recuerdos a lo largo de estos años. Por brindarme noches de alegrías, por ser ustedes mi escape del estrés y frustraciones durante mis estudios, por enseñarme la diversidad en opinión y el respeto a los demás. Porque a 11 años de conocerlos mucha gente ha entrado y salido de mi vida pero sólo ustedes permanecen y no dudo que seguiremos juntos por muchos años más, y por mi parte ustedes estarán en mi lista de grandes seres y amigos. Los quiero mucho, gracias.

Finalmente y sin dejar de ser importante, agradezco infinitamente a mi universidad, a la máxima casa de estudios: UNAM; pero principalmente a la casa que me dio su espacio durante 4 años y hoy me brinda mi primer éxito: FES Cuautitlán. Gracias por haberme permitido formarme cómo Lic. En Bioquímica Diagnóstica, por encontrar en ella a muchas personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de forma directa o indirecta. Porque me llevo grandes momentos, alegres y tristes, aquí conocí el valor del trabajo en equipo, que el objetivo siempre fue superarme y que realmente es el ejemplo de resistencia y éxito.

“Por mi raza hablará el espíritu”

RESUMEN

En 2016 se han estimado 62,700 nuevos casos de cáncer renal con un aproximado de 14,000 muertes. El carcinoma renal de células claras (CCRcc) es uno de los principales tumores urológicos y es la sexta causa de morbilidad asociada a cáncer. Aunque la prevalencia de CCR varía entre las poblaciones y las regiones geográficas, la incidencia de CCR ha aumentado de forma constante. Los avances significativos en el entendimiento de la biología de los tumores de CCR metastásicos han conducido al desarrollo de terapias moleculares dando como resultado una mejora significativa en la tasa de supervivencia global y la calidad de vida de los pacientes. Debido a que Hsp90 en numerosos estudios han demostrado su sobre-expresión en tumores sólidos incluyendo CCR por la mediación de la maduración y estabilidad de proteínas como, VEGF y HIF1- α , se ha demostrado que la inhibición de Hsp90 ejerce un efecto terapéutico prometedor en ciertos tipos de cáncer.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en un modelo de inhibición de Hsp90 aguda y crónica con el inhibidor 17-DMAG en líneas celulares de carcinoma renal humano. Como control se empleó la línea celular HEK-293T. Se realizaron ensayos de viabilidad y proliferación celular a dosis de 1000, 500 y 250 nM, que permitieron seleccionar a la línea sensible a la inhibición de Hsp90, con un fenotipo VHL-/- y PTEN-/. Se evaluó el cambio diferencial de isoformas de Hsp90 α y Hsp90 β de los tiempos en los que se observó una disminución en viabilidad y proliferación celular mediante la técnica de western blot. Se encontró que la línea de carcinoma renal 786-O presenta una expresión basal de ambas isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , y el cambio diferencial de expresión de dichas isoformas depende de la concentración de 17-DMAG. Finalmente se evaluó la muerte celular en células de cáncer renal VHL-/-, PTEN-/-, tratadas con el inhibidor 17-DMAG a dosis de 500 y 250nM, donde se concluye que una disminución de Hsp90 α podría dictaminar la sensibilidad de la célula, favoreciendo el efecto pro-apoptótico de 17-DMAG.

INTRODUCCIÓN

1.1. Proteínas de choque térmico

Las células y tejidos son retados constantemente a condiciones extremas que causan estrés agudo y crónico. En consecuencia, la supervivencia ha requerido la evolución de redes de respuesta al estrés para detectar, supervisar y responder a los cambios ambientales (Baeuerle y Baltimore 1996; Feige et al., 1996; Morimoto y Santoro 1998). La exposición prolongada al estrés interfiere con el funcionamiento eficaz de la célula, con consecuencias negativas sobre las propiedades bioquímicas de las proteínas que, en condiciones ideales, existen en estados termodinámicamente estables. En ambientes estresados, las proteínas pueden desplegarse, o formar agregados. Por lo tanto, las demandas cambiantes del control de calidad de la biogénesis de proteínas, la homeostasis de proteínas y la propia respuesta de choque térmico, se lleva a cabo a través de la síntesis elevada de chaperonas moleculares y proteasas, que permite la reparación de proteínas dañadas y con ellos ayudar a recuperar la célula (Walter y Buchner 2002).

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o proteínas de respuesta al estrés, son una familia de proteínas que se encuentran en todas las células procariotas y eucariotas, con secuencias de aminoácidos similares a lo largo de la escala filogenética, por lo tanto son un conjunto de proteínas altamente conservadas de diferente peso molecular (c. 16-100 kDa) que se produce en todos los organismos celulares cuando están expuestos al estrés (Lindquist y Craig, 1988).

Las Hsp actúan como moléculas auxiliares o acompañantes para las proteínas de la célula (figura 1), la sobre-regulación en respuesta al estrés es universal a todas las células y no se limita al estrés por calor. Se han descrito otros agentes y situaciones de estrés que desencadenan una respuesta similar: anoxia, isquemia, toxicidad, degradación de proteínas, hipoxia, acidosis, daños microbianos y los inhibidores del proteosoma, que inducen la transcripción selectiva y la traducción de las proteínas de choque térmico (Morimoto, 2008). La regulación de genes específicos mediante la interacción de los factores de transcripción de choque térmico (HSF) con sus elementos de choque térmico (HSE) en las regiones promotoras de los genes (Lis y Wu 1993; Morimoto, 1993).

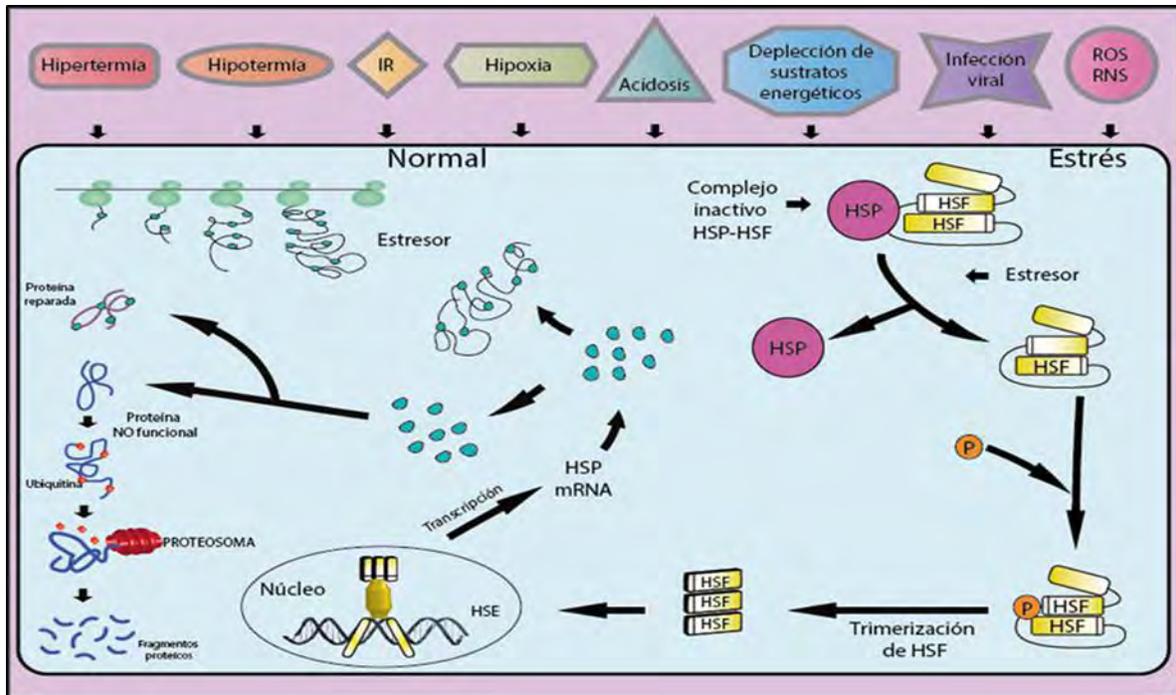


Figura 1. Resumen de algunas de las señales fisiológicas y fisiopatológicas más relevantes que activan la síntesis de proteínas de choque térmico en la célula. (Tomada y editada de Kevin. D et. al., 1992)

1.1. Función de las Hsp

En condiciones fisiológicas tienen una función de colaboración molecular (chaperona) en los procesos de plegamiento y ensamblaje de proteínas sintetizadas, transporte por los diferentes compartimentos celulares y degradación, de esta forma juegan un papel fundamental en la regulación de la síntesis normal de proteína dentro de la célula, permitiendo una homeostasis de proteínas (Morimoto, et al., 1992).

La homeostasis proteica es uno de los principales puntos de control necesarios para preservar la homeostasis celular, regulando la “vida de las proteínas”. Más que el control de calidad de las proteínas por sí sola, la homeostasis proteica abarca el metabolismo del RNA, esencial para proteger polipéptidos nacientes del mal plegamiento y facilitar la cooperación y el plegado posterior a

la traducción. Lo anterior permite ayudar en el procesamiento, plegamiento, traslocación, montaje y desmontaje de los complejos de macromoléculas, o de lo contrario dirigir su eliminación. Estos procesos y funciones pueden ser vistos como una red en la que cada proceso se organiza como *mininetworks* (pequeñas redes) interconectados a otros sistemas. La homeostasis proteica implica una red dinámica que tiene la suficiente capacidad de “amortiguar o defender” a diversos desequilibrios (Morimoto, 2008; Hartl y Hayer-HartL, 2002; Deuerling y Bukau, 2004; Bukau et al., 2006; Ron y Walter, 2007).

Durante mucho tiempo se consideró que la degradación proteica era un proceso poco específico. Sin embargo, hoy en día se sabe que es un mecanismo necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular. Cuando las proteínas presentan alteraciones en su plegamiento deben ser degradadas ya que tienen una gran tendencia a formar agregados, lo que es altamente dañino para la célula. En este contexto, la degradación proteica se considera una vía empleada por la célula para controlar la degradación o no de proteínas efectoras o reguladoras de otras funciones. Este sistema debe estar estrictamente controlado para evitar la destrucción masiva de proteínas útiles para la célula. Una de las estrategias que emplea la célula es la compartimentalización de proteínas en organelos específicos para llevar a cabo la proteólisis, siendo uno de los más relevantes los lisosomas. Las Hsp tienen un papel muy importante al momento de seleccionar qué proteínas son las que van a ser degradadas. Se ignora todavía cuál es el mecanismo por el cual se decide si una proteína va a ser renaturalizada o degradada. Una posibilidad es que la degradación o no de la proteína dañada esté en relación con el tiempo de unión con las Hsp. Si la proteína recupera su conformación tridimensional se produce la disociación de la Hsp y no se degrada. Si el daño es tan importante que no se puede recuperar la configuración tridimensional no se produce la disociación y como consecuencia la proteína queda marcada para su degradación (Nollen y Morimoto, 2002).

1.2. Clasificación de las proteínas de choque térmico.

Las Hsp pertenecen a una familia multigénica de proteínas con un peso molecular que varía entre los 10 y 150 kDa. Cada familia de las HSP se compone de miembros expresados de manera constitutiva o regulada de manera específica y están localizadas en diferentes compartimentos celulares (ver tabla 1). Las HSP de alto peso molecular (Hsp90, Hsp70 y Hsp60) son chaperonas dependientes de ATP y requieren de co-chaperonas para modular su conformación y la unión de ATP. En contraste, las HSP de bajo peso molecular, tales como Hsp27, son chaperonas independientes de ATP (Walter y Buchner, 2002).

Tabla 1. Localización y función celular de las familias de proteínas de choque térmico (Walter y Buchner, 2002).

Familia HSP	Localización celular	Función
HSP27 (sHsp)	Citosol, Núcleo	➤ Estabilización de microfilamentos, antiapoptótico.
HSP60	Mitocondria	➤ Repliegue de proteínas, previene la agregación de proteínas desnaturalizadas, pro-apoptótico y apoptótico.
HSP70 (familia)		
➤ Hsp72 (hsp70)	Citosol, Núcleo	➤ Unión de proteínas, citoprotector
➤ Hsp73 (Hsc70)	Citosol, Núcleo	➤ Chaperona molecular
➤ Hsp75 (mHSP70)	Mitocondria	➤ Chaperona molecular
➤ Hsp78 (GRP78)	RE	➤ Citoprotector, chaperona molecular
HSP90	Citosol, RE, Núcleo	➤ Regulación de hormonas esteroideas, translocación de proteínas
HSP110/104	Citosol	➤ Unión de proteínas
HSP 47		➤ Chaperona del colágeno
HSP 33		➤ Chaperona molecular. Estrés oxidativo
HSP 20-30		➤ Estabilización de actina. Termotolerancia Transducción de señales. Protección

<p>HSP 10 (α-cristalina)</p> <p>Ubiquitinas</p>	<p>Citosol</p>	<p>frente a la oncogénesis y apoptosis</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Co-chaperonina de HSP60. ➤ Chaperonas. Implicación en enfermedades neurológicas ➤ Degradación de proteínas.
---	----------------	--

Abreviaturas: HSP (proteínas de choque térmico), sHSP (pequeñas moléculas de HSP), RE (retículo endoplásmico).

Estas proteínas se encuentran tanto en organismos procariontes como eucariontes y presentan una alta homología a nivel de secuencias nucleotídica y de aminoácidos. Hsp90 junto con otras chaperonas, juegan un papel importante en el plegamiento de al menos 200 proteínas específicas de diferentes vías de señalización, y en el replegamiento de proteínas desnaturalizadas después de estrés. Además de su actividad chaperona molecular conocida de Hsp90, la evidencia acumulada indica que también tiene funciones clave en la regulación del metabolismo celular, se ha descrito que actúa como un amortiguador o un condensador de la variación génica en la evolución morfológica y se ha visto implicada en diversos procesos patológicos, que se explicarán más adelante (Csermely, 2015).

2. Proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)

Una de las subfamilias más abundantes son las proteínas de choque térmico de 90 kDa, objeto de estudio en este trabajo. Hsp90 comprende de 1 a 2% de la proteína citosólica total y su expresión puede llegar a aumentar hasta 15% en condiciones de estrés celular. Esta proteína tiene su actividad de chaperona molecular en muchas moléculas conocidas como proteínas “cliente”.

Las proteínas “cliente” de Hsp90 están implicadas en rutas de señalización que controlan el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular, siendo que muchas de ellas están relacionadas con la patogénesis de tumores humanos. Las proteínas “cliente” incluyen: cinasas de serina/treonina y tirosina, factores de transcripción, receptores de hormonas, y algunas proteínas supresoras de tumores (Johnson, 2012).

2.1. Estructura y Función de las Hsp90.

Conformacionalmente, Hsp90 es un dímero flexible que tiene actividad de ATPasa. Todos los homólogos de Hsp90 contiene tres dominios; dominio N-terminal de unión a ATP, dominio medio, y un dominio carboxilo terminal (figura 2). Hsp90 consiste en un dominio altamente conservado de aproximadamente 25 kDa en el N-terminal conectado al C-terminal de 55kDa por una región de “carga”, que es variable en longitud y composición entre las especies e isoformas. El dominio medio “cargado” no es esencial para la función de Hsp90 (Prodromou, et al., 1997).

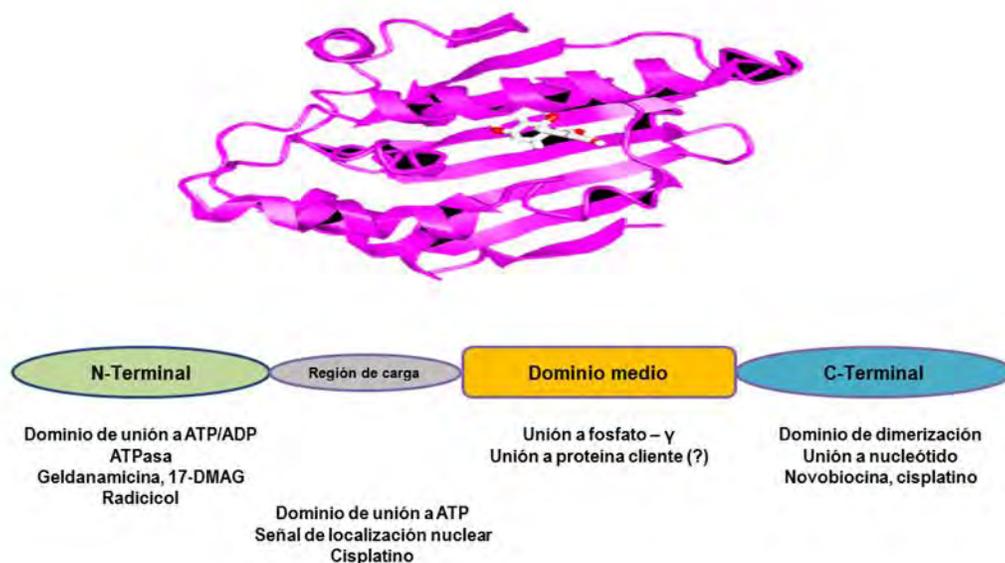


Figura 2. Estructura cristalina en 3D y sus dominios de Hsp90 (Modificada de Protein Data bank ID: 137184).

Hsp90 por sí sola, es incapaz de ensamblar y/o activar a cualquiera de sus proteínas “cliente” ya que requiere de una maquinaria de co-chaperonas. Las co-chaperonas más estudiadas de Hsp90 incluyen a: Cdc37, p23, AHA1, HOP y CHIP (Neckers, et al., 2007).

La función de chaperona de las Hsp90 está dado por la interacción con sus proteínas “cliente”, cómo se observa en la figura 3 lo que ocurre en el ciclo de “chaperonas” de Hsp90 es que sus proteínas cliente pasan por complejos multi-proteicos que las mantienen correctamente plegadas y así listas para ser activadas. Inicialmente, las proteínas cliente se unen a Hsp70, Hsp40 y HIP formándose un complejo inicial, pero posteriormente la proteína HOP recluta tanto al complejo formado como a Hsp90, formándose de este modo un complejo intermedio. Posteriormente los componentes asociados a Hsp70 se liberan del complejo permitiendo la entrada de ATP y p23. Aún faltan datos que permitan afirmar lo anterior pero es claro que en este punto, Hsp90 expone completamente el dominio de unión al ligando de la proteína cliente, p23 estabiliza la unión de ATP a Hsp90, y las inmunofilinas entran en el complejo, formando el complejo final. Cuando hay ausencia de ligandos la proteína cliente es liberada para entrar en nuevos ciclos de chaperona y en el caso contrario al estar presentes estos se unen al ligando, dimerizan y activa sus rutas de señalización. En el caso de que Hsp90 siga unida a su co-chaperona, sus proteínas cliente queda atrapada en el complejo intermedio, promoviéndose el reclutamiento de la ligasa de ubiquitina E3, favoreciendo así la ubiquitinación y su degradación (Zuehlke y Johnson, 2010).

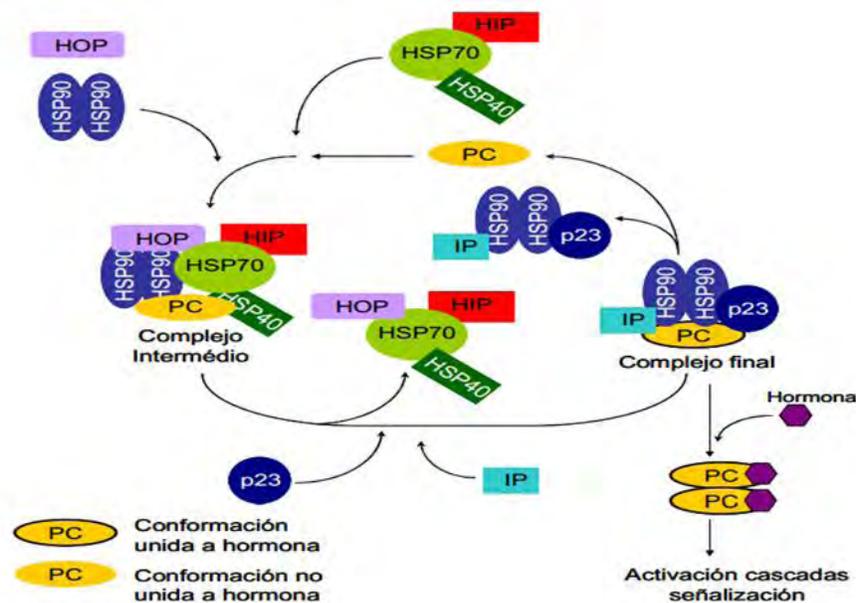


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de “chaperona” de Hsp90. PC=Proteína cliente (Tomada de Johnson, 2012).

A la fecha, se han descrito cinco isoformas de HSP90: Grp94, Hsp90N, TRAP1, Hsp90 α y Hsp90 β que se diferencian básicamente por su localización intracelular (figura 4). Hsp90 α y Hsp90 β se encuentran en el citosol, a diferencia de las otras isoformas que se encuentran asociadas a organelos. Estas dos isoformas de Hsp90 son esenciales para la viabilidad de las células eucariontes (Sreedhar, et al. 2004).

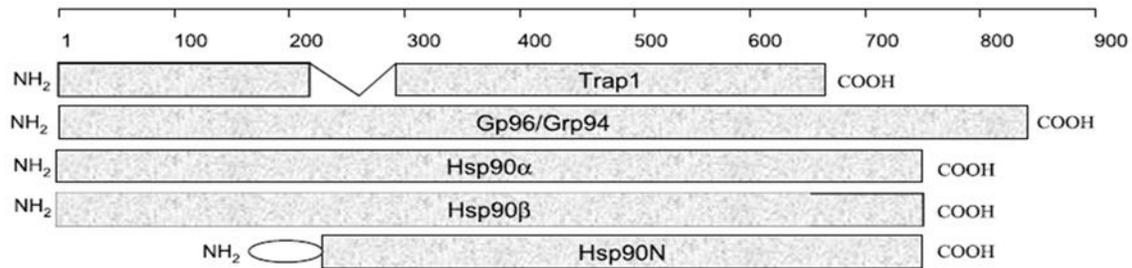


Figura 4. Representación esquemática de las isoformas de Hsp90 (Tomada y editada de Sreedhar, et al. 2004).

2.2. Proteínas de choque térmico Hsp90 α y Hsp90 β

Existen dos isoformas citoplasmáticas mayoritarias de la subfamilia Hsp90: Hsp90 α (isoforma inducible) y Hsp90 β (isoforma constitutiva). Los genes que dan lugar a las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β se localizan en el cromosoma 14q32-33 y en el cromosoma 6p21, respectivamente.

El gen que codifica para la isoforma Hsp90 α es HSP90AA1, mientras que para Hsp90 β es HSP90AB1; ambos genes comparten 60% de homología global y varias regiones de 50 aminoácidos o más comparten un mayor de 90% de homología (Rebbe et al., 1987). HSP90AA1 consta de 10 exones que codifican para un transcrito de 5.3 Kb, dando lugar a una proteína de 732 aminoácidos con un peso molecular de 86 kDa, mientras que, HSP90AB1 consta de 11 exones y el transcrito es de 6.8 Kb, lo que da lugar a una proteína de 724 aminoácidos con un peso molecular de 84 kDa (Lees-Miller y Anderson, 1989; Csermely, et al., 1998). En Hsp90 β , el aminoácido ESEDK es eliminado del sitio de fosforilación, por el contrario, el aminoácido TQTQDQPME del N-terminal de Hsp90 α es remplazado por VHHG in HSP90AB1 (Lees-Miller y Anderson, 1989).

Las isoformas de Hsp90 tienen cinco regiones altamente conservadas, llamadas “signature sequences” de las cuales tres se encuentran en el dominio N-terminal (aminoácidos 38-59, 106-114, 130-145 en Hsp90 α) y dos en el dominio central (aminoácidos 360-370 y 387-401). A pesar de la similitud molecular de estas isoformas se han descrito diferencias importantes en los niveles de transcripción y transducción, lo que sugiere que Hsp90 α y Hsp90 β pueden tener funciones diferenciales en los procesos celulares en los que están involucrados. Las secuencias de nucleótidos entre Hsp90 α y Hsp90 β tienen mucho menos similitud en comparación con sus productos proteicos, sobre todo en su región 5' - 3' no codificante, los intrones y la secuencia regulatoria (figura 5). Así mismo, la transcripción de HSP90 α está estrechamente regulada por su región promotora, la cual contiene varios elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) implicados en la expresión génica inducible de Hsp90 α . Por el contrario, el gen que codifica para la isoforma HSP90 β los HSE se encuentran en el primer intrón del gen, reportándose importantes para la expresión constitutiva, mas no para su expresión inducible (figura 5.a) (Sreedhar, et al. 2004, Zuehlke, et al. 2015). Se ha observado que la región promotora juega un papel importante en las diferencias de expresión de cada una de las isoformas, por lo que se ha propuesto que son reguladas de manera diferencial. Esto se apoya por el hecho de que Hsp90 α contiene cinco elementos de respuesta a estrés térmico (HSE) en la región promotora, mientras que Hsp90 β solo contiene dos, lo que podría dar una de las explicaciones del porque Hsp90 α es conocida como la isoforma inducible (Figura 5.b) (Zhang, et al., 1999; Shen et al., 1997). Algo peculiar y único en el gen que codifica para la isoforma Hsp90 β (HSP90AB1) es que presenta una “signature sequence”: LKID, que no está presente en otras Hsp (Chen et al. 2006).

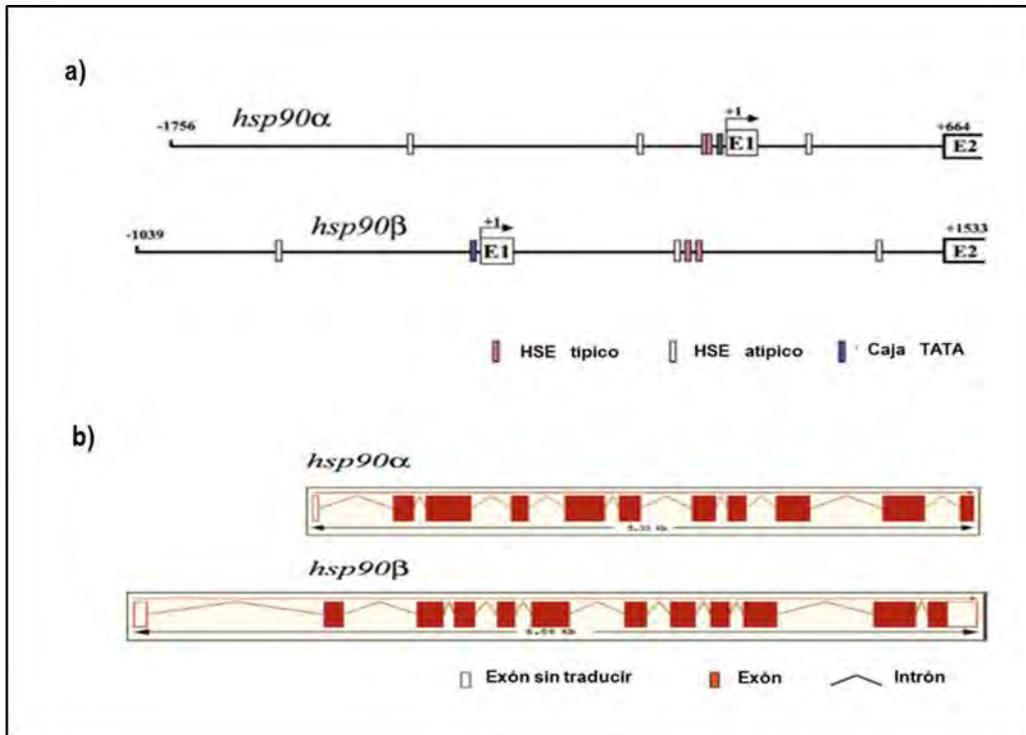


Figura 5. Representación esquemática de los genes *Hsp90α* y *Hsp90β*: a) región promotora, y b) estructura intrón/exón. a) Representación esquemática de HSE en la región promotora de genes *hsp90α* y *hsp90β* humanos, E1: exón 1; E2: exón 2, y b) Comparación de la estructura intrón/exón en las isoformas de *Hsp90*. (Modificada de Sreedhar, et al., 2004)

Hsp90α y *Hsp90β* mantienen hasta un 85% de identidad a nivel de proteína. En condiciones fisiológicas, la proporción de *Hsp90α* es menor en comparación de *Hsp90β*, ya que mientras la primera constituye 40% de la proteína total citosólica de *Hsp90*, la segunda conforma 60% (Gupta RS, 1995). Dado que la separación bioquímica de las isoformas de *Hsp90* es bastante difícil, en la mayoría de los estudios se evalúa a *Hsp90* total. Sin embargo, una de las diferencias más importante entre los miembros mayoritarios de *Hsp90* es que la isoforma *Hsp90α* dimeriza fácilmente, mientras que la isoforma *Hsp90β* lo hace con mucho menos eficiencia. La conformación de las *Hsp90* en condiciones fisiológicas dentro de la célula es en su mayoría monomérica, y en menor proporción dimerica, sin embargo, también existe una mínima proporción de heterodímeros y oligómeros de ambas isoformas (Csermely, 1998). Es importante mencionar que la conformación dimerica de *Hsp90* es la forma funcional (Minami et al., 1991). A este respecto, se ha demostrado

que el potencial de dimerización de Hsp90 reside principalmente en los 190 aminoácidos carboxi-terminal de la proteína (Pearl y Prodromou, 2001). En la secuencia de aminoácidos entre Hsp90 α y Hsp90 β existen secuencias de los mismos que difieren aumentando la posibilidad de más funciones específica por isoforma, pudiendo explicar en gran medida la unión diferencial a sus proteínas “cliente”. Aunque los patrones diferenciales de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β sugieren que estas isoformas pueden no ser completamente equivalente en función, no hay hasta ahora ninguna evidencia a nivel de genética y de proteómica que explique una diferencia funcional entre Hsp90 α y Hsp90 β (Sreedhar, et al., 2004).

La estructura general de Hsp90 α y Hsp90 β es similar a la propia estructura de cada isoforma de la familia Hsp90 (figura 6). El dominio C-terminal junto con el dominio medio son importantes para la dimerización de Hsp90. En el dominio de carga abundan aminoácidos con carga negativa y hasta la fecha no se conoce su función. El dominio medio es el responsable de la actividad chaperona de Hsp90 debido a que está implicado en la unión de diversas proteínas. Finalmente, el dominio N-terminal es el encargado de la unión e hidrólisis de ATP y es el sitio de unión a algunos fármacos como geldanamicina que inhiben la actividad chaperona de Hsp90 (Prodromou, et al., 1997).

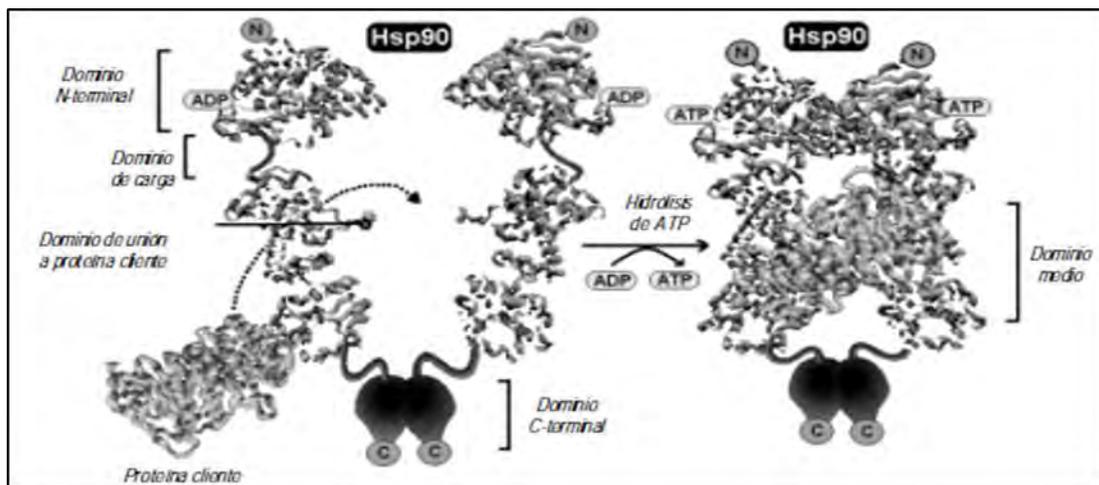


Figura 6. Comparación de la conformación entre Hsp90 α y Hsp90 β . (Tomada de Cortés-González C, et al., 2008)

3. Hsp90 e isoformas en la fisiología

Dentro de sus funciones celulares de Hsp90 se encuentra: a) el favorecer la translocación de sus proteínas “cliente” a organelos o a la membrana celular o nuclear, b) facilita la activación de sus proteínas “cliente” a través de su fosforilación y/o dimerización, c) mediar procesos anti-apoptóticos, a través de la inhibición de algunas vías que llevan a la muerte celular programada (como la inhibición de caspasa 3 y 9, SMAC/DIABLO, entre otras), d) y participa en el desarrollo y diferenciación celular, mediante la regulación del ciclo celular (Soti, et al., 2005).

Hsp90 α y Hsp90 β son reguladas por proteínas cinasas y/o fosfatasas (Richter K y Buchner J, 2001), donde Hsp90 β contiene cinco sitios potenciales de fosforilación por la familia de proteínas cinasas PKA, mientras que Hsp90 α solo contiene tres. Así mismo, se ha reportado que Hsp90 es regulada de forma positiva por la proteína fosfatasa PPI, la cual favorece la maduración de sus proteínas cliente, previniendo la hiper-fosforilación de Hsp90 (Wandinger, et al., 2006).

4. Hsp90 e isoformas en la fisiopatología.

Las actividades de un número creciente de proteínas reguladoras de la expresión de genes, incluyendo los receptores nucleares, varias cinasas y factores de transcripción, son moduladas por Hsp90 (Felts, S. J., et al., 2007). Por lo tanto, no es sorprendente que dicha proteína al participar en la regulación post-traducciona de las moléculas de señalización, en el montaje/desmontaje de los complejos transcripcionales, y en el procesamiento de péptidos inmunogénicos por el sistema inmune, esté implicada en múltiples procesos celulares, incluyendo la replicación del ADN, la transducción de señales, regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, la metástasis, la senescencia y apoptosis (Whitesell y Lindquist, 2005).

En años recientes, se ha reportado que la función chaperona alterada se ha asociado con el desarrollo de un amplio número de patologías, incluyendo: cáncer, trastornos neurodegenerativos, isquemia, infección e inflamación. HSP se han considerado clásicamente como moléculas

intracelulares *housekeeping* y con funciones citoprotectoras (Parmiani, et al., 2004). Sin embargo, datos recientes indican que también pueden ser secretadas a partir de células en cultivo, expresadas en la superficie celular además de haberse encontrado en la circulación periférica de individuos normales (Schmitt et al., 2007). La activación inapropiada de las vías de señalización puede ocurrir durante el estrés agudo o crónico como resultado del mal plegamiento o agregación de proteínas, tal como sucede en la generación de tumores malignos y enfermedades infecciosas, donde Hsp90 tiene funciones citoprotectoras e inmunorreguladoras (Schmitt et al. 2007; O'Neill et al., 2013).

5. Hsp90 en cáncer

En cáncer, las Hsp parecen tener actividades fundamentales como promotores de tumores, donde los miembros de la familia Hsp90 protegen y mantienen conformaciones aberrantes de las proteínas mutadas o gravemente alteradas con funciones oncogénicas. Por otra parte, por el mismo mecanismo, las Hsp facilitan la variación genética en el cáncer y la selección de clonas neoplásicas en respuesta a modificaciones del microambiente y/o efectos farmacológicos (Bottoni et al., 2009).

La familia de HSP90 interactúa y estabiliza diversas cinasas, incluyendo varios miembros clave de la transformación maligna, como el ErbB2, Src, Abl o tirosina cinasas Met, Raf, Akt y cinasas de serina dependientes de ciclina. El papel principal de la chaperona Hsp90 es promover la maduración conformacional de estos receptores y cinasas transductoras de señal donde las proteínas “cliente” de Hsp90 han demostrado ser importante para el desarrollo, la proliferación y la supervivencia de varios tipos de cáncer (Dubey, 2015). Así mismo, Hsp90 se ha encontrado sobre-regulada en diversos tipos de cáncer, incluyendo, mama, pulmón, leucemias, entre otros (Hsu y Hsu, 1998). En cáncer de mama, la sobre-expresión de Hsp90 y Hsp70, se relaciona con un mal pronóstico (Yano et al., 1996). El proto-oncogen C-myc activa directamente la transcripción de Hsp90 en diferentes modelos de células tumorales (Teng et al., 2004). En los tumores, Hsp90 está presente en su totalidad en complejos multi-chaperona con alta actividad ATPasa, mientras que Hsp90 en tejidos normales está presente en un estado no complejado (Neckers y Lee, 2003).

5.1. Hsp90 y los “hallmarks” del cáncer

Los “hallmarks” del cáncer comprenden 6 capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de múltiples etapas de tumor. Como se observa en la figura 7, estas capacidades incluyen: a) mantenimiento de la señalización proliferativa, b) evasión de la supresión de crecimiento, c) resistencia a la muerte celular, d) inmortalidad replicativa, e) inducción de angiogénesis, y f) activación de la invasión y metástasis. Sin embargo, a través del tiempo y la investigación se han sugerido nuevas características que están involucradas en la patogénesis de algunos tipos de cáncer: desregulación celular energética, evasión del sistema inmune, inestabilidad genética y promoción tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). En conjunto con las primeras seis características constituyen el principio de organización que proporciona un marco lógico para la comprensión de la diversidad de enfermedades neoplásicas (Hanahan y Weinberg, 2000).

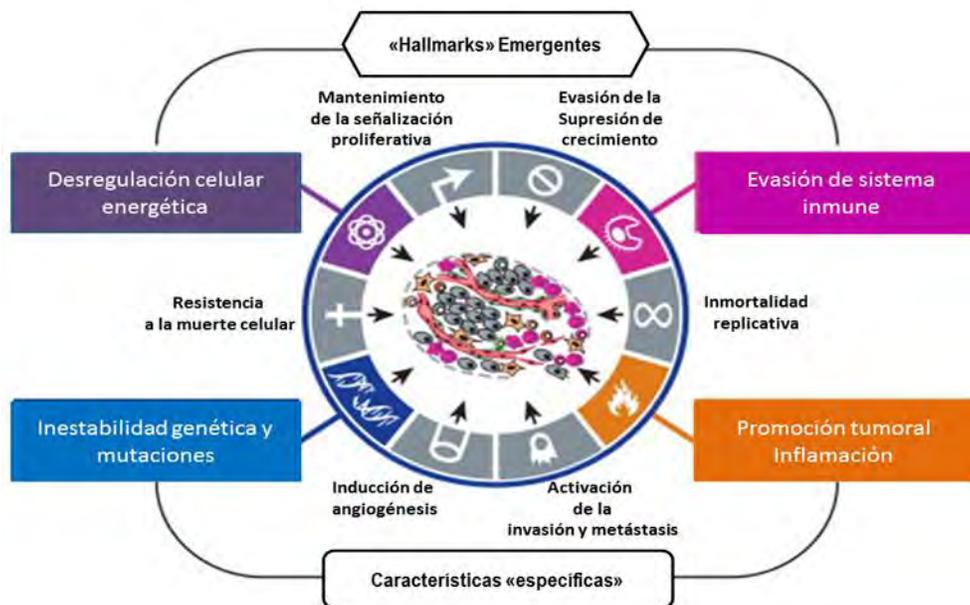


Figura 7. “Hallmarks” del cáncer. Esta imagen abarca las seis características distintivas del cáncer, añadiendo los “hallmarks” emergentes y las características adquiridas durante la patogénesis (Tomada y editada de Hanahan y Weinberg, 2011)

La contribución de Hsp90 a la tumorigénesis puede atribuirse a sus actividades pleitrópicas como chaperona molecular que proporciona a la célula de cáncer una oportunidad para alterar las actividades de proteínas, en particular, componentes de la maquinaria del ciclo celular, cinasas, y otras proteínas que influyen en el crecimiento de células tumorales (Schmitt et al., 2007). Una amplia variedad de actividades fundamentales de Hsp90 sobre el tumor están íntimamente relacionadas con las chaperonas Hsp70 y Hsp27, donde sus propiedades de chaperonas y sus efectos anti-apoptóticos facilita la variación genética en cáncer. Estos atributos y la misma asociación con Hsp90 influyen favorablemente en la promoción de otras propiedades de cáncer, incluyendo la tendencia a la invasión local, resistencia a quimio y radioterapia, promoción de la angiogénesis y la inducción de metástasis (Bottoni et al., 2009).

Las Hsp90 no sólo está relacionada con la regulación de varias vías pro-apotóticas, sino también mantiene y activa la vía anti-apoptótica. La resistencia a la muerte celular como ya se mencionó, es una característica de las células cancerosas al evadir la maquinaria apoptótica y se atenúa en aquellos tumores que tienen éxito en progresar a estados de alto grado de malignidad y presentan resistencia a terapias (Adams y Cory, 2007; Lowe et al., 2004). Se ha observado que Hsp90 inhibe la apoptosis como resultado de un efecto negativo sobre la función de Apaf-1. Hsp90 se une directamente con Apaf-1 e inhibe su oligomerización y el reclutamiento de caspasa-9 (Pandey et al., 200). La acción anti-apotótica también se ha reflejado en su capacidad de interactuar con Akt fosforilada, una proteína que genera una señal de supervivencia en respuesta a la estimulación del factor de crecimiento. Akt fosforilado puede fosforilar a Bad una proteína de la familia Bcl-2, y caspasa-9, permitiendo su inactivación y permitiendo la supervivencia celular. Pero también Akt puede fosforilar a I κ B, lo que resulta en la promoción de la inhibición de la apoptosis mediado por NF- κ B (Ozes et al., 1999).

En la figura 8 se aprecia un resumen sobre la red de interacciones de Hsp90 y Hsp70 con vías de señalización relacionadas con la apoptosis tales como la activación de la cinasa de estrés Akt, así como diversas interacciones que favorecen los “*Hallmarks*” del cáncer.

La inhibición de Hsp90 en células tumorales da como resultado la activación dimérica inducida por receptores de muerte, lo que sugiere que Hsp90 mantiene ya sea de forma pasiva o activa a diversas proteínas que intervienen en el proceso de apoptosis. El mecanismo de muerte celular por apoptosis juega un papel muy importante en la patogénesis de enfermedades renales, entre ellas incluye el cáncer renal. La manipulación de este proceso, y el entendimiento sobre la participación de Hsp90 en cáncer renal y en sus tratamientos proporciona una ventana nueva de investigación.

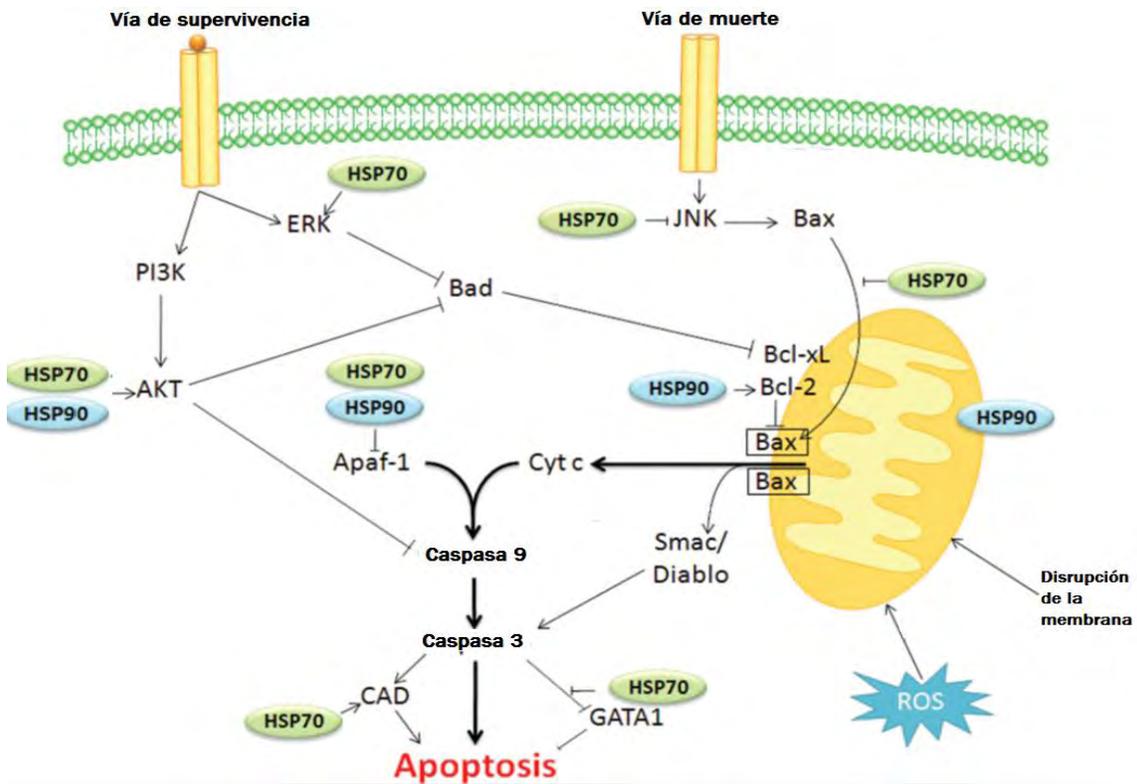


Imagen 8. Interacción de Hsp90 y Hsp70 en la vía de señalización que regula la supervivencia celular y apoptosis
 Existen tres niveles de regulación por las cuales Hsp puede bloquear la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis mediante la interacción con proteínas clave: (i) río arriba de la mitocondria, modulado por Hsp70, (ii) a nivel mitocondrial, controla la liberación de citocromo C: Hsp70 con Bax y Hsp90 con Bcl-2, y (iii) río abajo de la mitocondria mediante el bloqueo de la apoptosis por su interacción con Apaf-1 (Hsp90 o Hs70) (Modificada de Lanneau et al., 2008).

6. Hsp90 en cáncer renal

El cáncer renal ocupa el lugar 14, con más de 300,000 nuevos casos diagnosticados en 2012 (figura 9). El carcinoma de células renales (CCR) cuenta con aproximadamente 90% de todos los tipos de cáncer renal. En 2012, los diferentes tipos de cáncer de riñón representaron 143,000 muertes con una tasa del 2% sobre todas las muertes por cáncer en general. De acuerdo al género alrededor de 200,000 nuevos casos fueron observados en hombres y 100,000 en mujeres. La mortalidad en hombres fueron 91,000 (2.6%) y 52,000 (1.5%) en mujeres (GLOBOCAN 2012). Por otra parte, los nuevos casos fueron alrededor de 198,000 en las regiones más desarrolladas y alrededor de 130,000 en las regiones menos desarrolladas (Crestani et al. 2016).

En 2016 se han estimado 62,700 nuevos casos de cáncer renal con un aproximado de 14,000 muertes. El carcinoma renal de células claras (CCRcc) es uno de los principales tumores urológicos y es la sexta causa de morbilidad asociada a cáncer. Aunque la prevalencia de CCR varía entre las poblaciones y las regiones geográficas, la incidencia de CCR ha aumentado de forma constante (Ljungberg et al., 2011; Crestani et al., 2016).

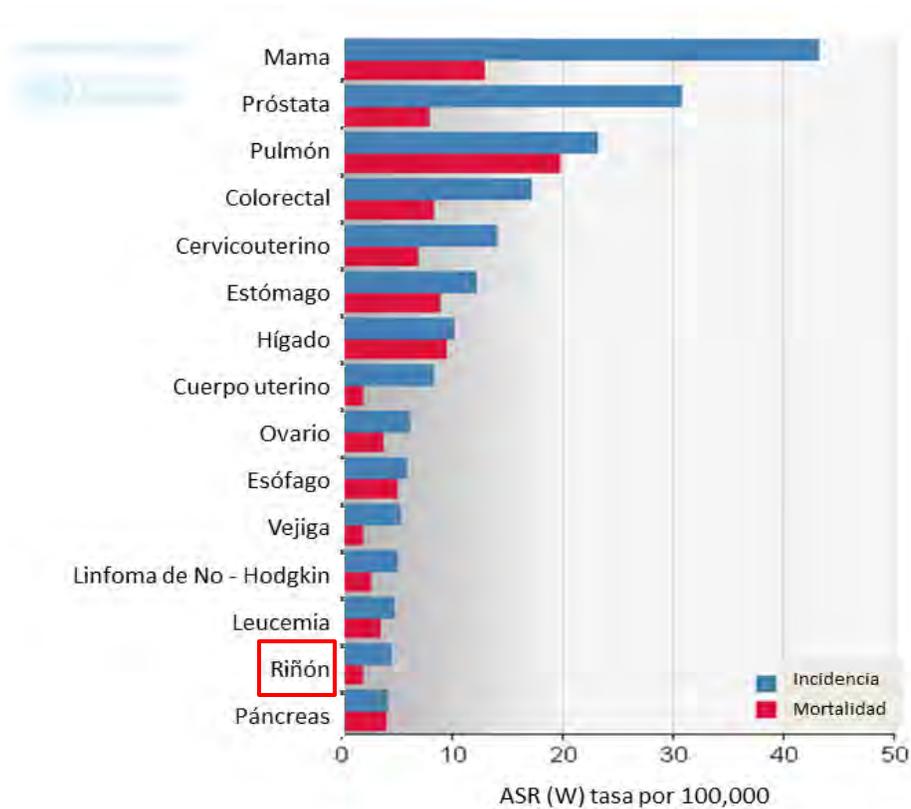


Figura 9. Estimación de tasa de incidencia y mortalidad estandarizada por edad: ambos sexos. Obtenida de GLOBOCAN 2012 (IARC) Sección de Vigilancia del Cáncer.

Hsp90 es esencial para el desarrollo renal normal y presenta una variedad de procesos intracelulares que son cruciales para la diferenciación normal de las células renales y desarrollo normal del órgano (Sreedharan y Van, 2016). Dentro de las funciones de Hsp90 en la fisiología renal es su participación en la estabilización, activación y translocación del receptor de mineralocorticoide, a partir de la formación de un heterocomplejo descrito previamente (capítulo 2.1). Una vez que la aldosterona se une al complejo receptormineralocorticoide/Hsp90/chochaperonas, el complejo hormona/receptor es trasladado al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a aldosterona, lo que a su vez activa la transcripción de diversos genes que responden a esta hormona (Masilamani et al., 1999; Seok et al., 1999). Los estudios realizados hasta el momento sobre el papel de Hsp90 en la fisiología renal son muy escasos y no se tiene con certeza

el papel de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β). Así mismo, estudios recientes sugieren que Hsp90 está implicada en el mantenimiento de la función renal (figura 10) (Cortés-González C. et al., 2008)

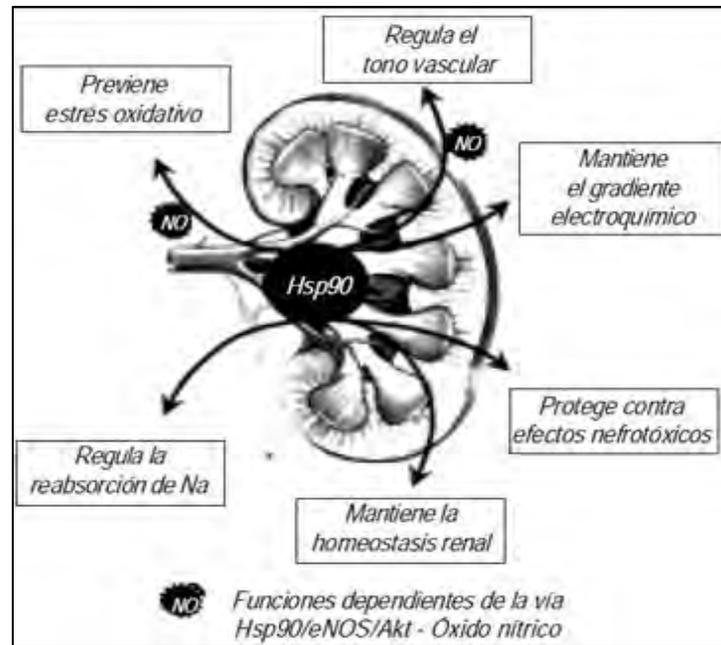


Figura 10. Esquema de la participación de Hsp90 en procesos que regula la fisiología renal (Tomada de Cortés-G, et al., 2008).

6.1. Implicación clínica de los genes VHL y PTEN en Cáncer renal: posible papel de Hsp90.

El cáncer renal presenta vías de señalización alteradas que presentan relevancia clínica. Entre ellas está la vía mediada por Akt, donde Hsp90 actúa como chaperona para su activación mediante su unión por fosforilación en sitios específicos. De este modo Akt puede activar su cascada de señalización, inhibiendo la apoptosis y estimulando la supervivencia celular. El eje de señalización de Akt comienza con el acoplamiento de factores de crecimiento a los receptores tirosina-cinasa (RTK). PI₃K recluta a los receptores asociados a membrana activándose mediante fosforilación de PIP₂ para generar PIP₃ (figura 11). Los mecanismos de retroalimentación negativa operan en múltiples nodos dentro de los circuitos de señalización de proliferación. Un ejemplo destacado

implica la fosfatasa PTEN, que contrarresta la cinasa PI_3 mediante la degradación de su producto, PIP_3 . Las mutaciones de pérdida de función en PTEN amplifican la señalización de PI_3K y promueve la angiogénesis (Jiang y Liu, 2009; Yuan y Cantley, 2008).

El gen supresor de tumor PTEN está mutado o se pierde, generalmente a causa de la metilación del promotor. A diferencia de cualquier otra vía de señalización importante en la célula, cada miembro de este eje de señalización es frecuentemente alterado en cáncer renal (Cantley, 2008). Al final, la vía converge en la activación de HIF, gen promotor de la transcripción de genes implicados en angiogénesis.

Es por esto que el desarrollo y la progresión del cáncer también implican varias modificaciones genéticas. Eventos de transformación y progresión múltiples tales como mutaciones puntuales, deleciones/inserciones, anomalías cromosómicas, y la desregulación epigenética contribuyen a la oncogénesis renal. Cerca del 4% de los tumores renales son hereditarios que se asocian a menudo con signos de síndromes específicos.

Los principales síndromes hereditarios que incluyen tumores renales son: la enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL), carcinoma de células renales papilar hereditario, leiomiomatosis hereditaria de carcinoma de células renales, y el síndrome de Birt-Hogg-Dube (Viel, 2010). Particularmente, la enfermedad de VHL se ha presentado en 70% asociado a CCRcc. Dicha enfermedad se debe a la inactivación en línea germinal de uno de los alelos del gen VHL, el cual sale a la luz cuando se produce la mutación somática del otro alelo. Las mutaciones del gen VHL son extraordinariamente heterogéneas y están distribuidas a lo largo de toda la secuencia del gen. Se han descrito hasta la fecha unas 150 mutaciones diferentes (Zbar et al., 1996). La lista de las mismas se puede consultar en <http://www.umd.necker.fr:2005> y en <http://web.ncifcrf.gov>

El gen VHL es un gen supresor que codifica una proteína con dos isoformas, pVHL30 y pVHL19 responsables de la acción antitumoral del gen. En condiciones normales, la proteína sirve como módulo de reconocimiento ante el sustrato de una ubiquitina ligasa E3 que se dirige al factor

inducible por hipoxia (HIF) que produce su inactivación por ubiquitinación. Su ausencia, por el contrario, hace que se establecen en la célula permitiendo una acumulación de HIF que conlleva la activación transcripcional de una amplia serie de factores reguladores de la angiogénesis, del ciclo celular y del crecimiento celular, por ejemplo, el VEGF, EGFR, PDGF, TGF- α , FGF, EPO y GLUT-1, entre otros. En pacientes con enfermedad VHL-/- y PTEN -/-, las células activan de forma inapropiada a HIF-1 α , incluso bajo condiciones de normoxia, y ante la acumulación de dicha proteína los tumores se caracterizan por una alta vascularización (Sufan et al., 2004; Kaelin, 2004).

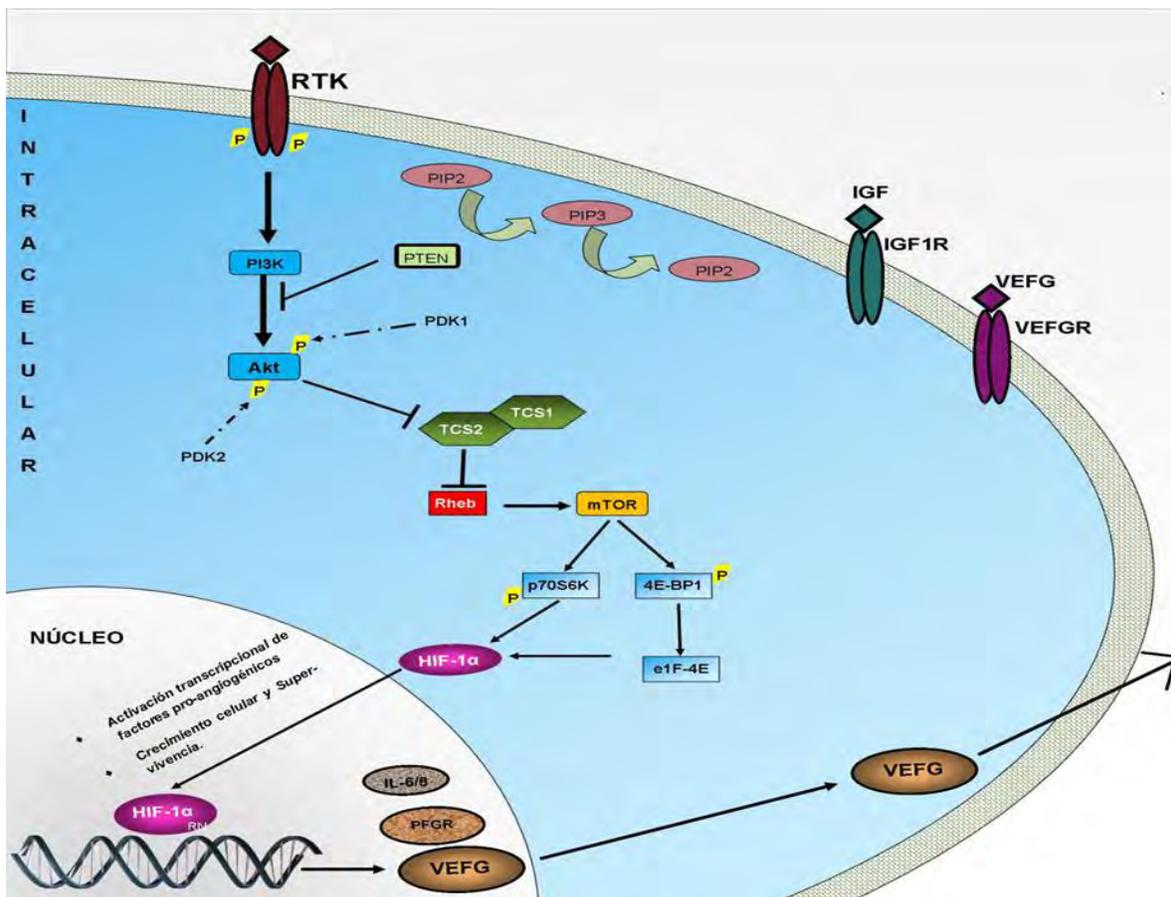


Figura 11. Vía de señalización de PI3K/Akt. PI3K fosforila PIP2 para generar PIP3, lo que conduce a la activación de AKT y la activación de numerosos efectores que regulan las funciones celulares críticas en las células cancerosas. PTEN regula negativamente este proceso a través de la defosforilación PIP3. Finalmente la vía converge con la activación de HIF1 α .

6.2. Terapia actual contra el cáncer renal: inhibición de Hsp90.

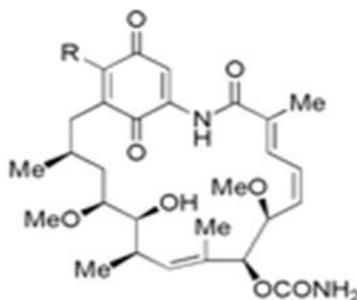
Con el aumento del uso de diversas técnicas de imagen, un mayor número de casos de CCR ha sido diagnosticado en una etapa temprana de la enfermedad. Sin embargo, el 20-30% de los pacientes con CCR demuestran evidencias de metástasis en el momento de la presentación inicial. A pesar de que la nefrectomía radical siendo un tratamiento efectivo para la fase inicial y CCR locales, el 30% de los pacientes desarrollan enfermedad metastásica después de la cirugía. Los pacientes con CCR metastásico tiene un mal pronóstico, y las opciones terapéuticas son limitadas (Sobin y Fleming, 1987; Crestani et al. 2016).

El principal tratamiento por muchos años fue una terapia con interferón alfa (IFN- α) e interleucina-2 (IL-2). Antes del 2000, una dosis alta de IL-2 fue el único tratamiento aprobado para pacientes con CCR metastásico (CCRm) en base a una tasa de respuesta (ORRs) del 10% y 15% reportado con una respuesta completa y duradera. Sin embargo, la identificación del gen supresor de tumor Von Hippel-Lindau (VHL), y su inactivación en CCRcc condujo a una mayor expresión del factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1 α) y las proteínas relacionadas con la angiogénesis tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas-B (PDGF-B), permitió el desarrollo de nuevas terapia que inhiben específicamente la señalización de VEGF. Hoy en día, la mayoría de los pacientes con cáncer renal metastásico son tratados con sunitinib, pazopanib, o bevacizumab como tratamiento de primera línea basado en estudios de fase III, que han demostrado una mejoría significativa en la supervivencia libre de progresión (SLP) al inhibir la vía de señalización mediada por VEGF (Molina y Nanus, 2016). Hasta hace poco tiempo, los pacientes que progresaron en la terapia de primera línea posteriormente recibieron el inhibidor de mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) everolimus en base a un estudio realizado en 2008 de fase II, que demostró una mediana de SLP (promedio de supervivencia libre) de 4.9 meses en los pacientes que recibieron everolimus frente a 1.9 meses en los pacientes con placebo (Motzer et al., 2010).

6.3. Terapia actual contra el cáncer renal: inhibición de Hsp90.

Los avances significativos en el entendimiento de la biología de los tumores de CCR metastásicos han conducido al desarrollo de terapias moleculares dirigidas al VEGF y mTOR, dando como resultado una mejora significativa en la tasa de supervivencia global y la calidad de vida de los pacientes (Crestani et al. 2016). Debido a que Hsp90 en numerosos estudios han demostrado su sobre-expresión en tumores sólidos incluyendo CCR por la mediación de la maduración y estabilidad de proteínas como, VEGF y HIF1- α , se ha demostrado que la inhibición de Hsp90 ejerce un efecto terapéutico prometedor en ciertos tipos de cáncer. Inhibidores de productos naturales de Hsp90 han jugado un papel clave en el descubrimiento de la función biológica de Hsp90 y en su identificación como diana molecular para fármacos contra el cáncer (Pearl et al., 2008). Antibióticos de ansamicina, tales como la geldanamicina (GA), herbimicina-A y radicicol, han estado por varios años como agentes antitumorales, que permiten la disminución significativa de la actividad de tirosinas cinasas oncogénicas tales como v-Src y ErbB-2, entre otras. Se observó que este efecto es una reacción secundaria a la inhibición directa de Hsp90 (objetivo real de los derivados de ansamicinas) (Sharma et al., 1998). El sitio de unión en Hsp90 para geldanamicina se encuentra en el dominio N-terminal y co-localizan con el sitio de unión a ATP de Hsp90 (Figura 10). Resulta ser un inhibidor competitivo de la actividad ATPasa de Hsp90 (Pearl y Prodromou, 2000) y consigna a las proteínas “cliente” con destino a la ubiquitinación y la degradación proteosomal, lo que lleva al agotamiento de las oncoproteínas y la detención del ciclo celular y la apoptosis consecuente (Hostein et al., 2001).

En este aspecto, Hsp90 ha adquirido gran interés como un agente contra el cáncer debido a su enlace funcional con múltiples vías de señalización, sin embargo, debido a la alta toxicidad de GA, se buscó la caracterización de nuevas sustancias más adecuadas para el desarrollo clínico. Así se desarrollaron sus análogos: 17-AAA y 17-DMAG que están estructuralmente relacionados con GA (figura 12).



GA	R = OCH ₃
17-AAG	R = NHCH ₂ CH=CH ₂
17-DMAG	R = NHCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂

Figura 12. Estructura química del inhibidor Hsp90 (geldanamicina) y de sus análogos químicos: 17-AAG y 17-DMAG (Tomada de Hostein et al., 2001)

Inhibidores de Hsp90 han mostrado resultados muy alentadores en varios tipos de cáncer, y en la actualidad aproximadamente 17 fármacos candidatos, que se sabe que apuntan a la inhibición de Hsp90, están bajo ensayos clínicos, ya sea como agentes individuales o en terapia combinada (Haque et al., 2016). Particularmente, 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina) muestra baja unión a proteínas plasmáticas, mayor solubilidad en agua, mayor biodisponibilidad oral, y la actividad antitumoral es superior en comparación con 17-AAG (17-alilamino-17-desmetoxi-geldanamicina), el primer inhibidor de Hsp90 en ensayos clínicos (Trepel et al., 2010). La estructura cristalina revela que 17-DMAG se une al sitio de unión de ATP de Hsp90 en el dominio N-terminal y actualmente está en fase I de ensayos clínicos (Pacey et al., 2011). De manera relevante para el proyecto, se ha demostrado que la selectividad de los inhibidores de Hsp90 ante un tumor sobre el tejido normal y como 17-AAG, 17-DMAG se retiene más tiempo en el tumor que en el tejido normal (Kamal et al., 2003; Workman et al., 2007).

7. Justificación

Las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β pueden desempeñar diferentes funciones celulares dependiendo el tipo de estrés que indujo su sobre-regulación, así como del tipo de origen celular. Mientras que Hsp90 α es inducida por estímulos letales, Hsp90 β puede ser inducida por factores de crecimiento que conllevan señales de proliferación (Solary E, et al., 2000).

Recientemente se ha demostrado en el mieloma múltiple que una sobreexpresión de Hsp90 es necesaria para la supervivencia celular y que el silenciamiento de HSP90 β por siRNA es suficiente para inducir apoptosis. Este efecto se incrementa fuertemente cuando también se silencia la isoforma Hsp90 α (Chatterjee M, et al., 2007). De igual manera, en otro estudio empleando mastocitos, Hsp90 β se asocia con la proteína anti-apoptótica de Bcl-2; donde, el silenciamiento de Hsp90 β o la inhibición de Hsp90 con geldanamicina inhibe la interacción entre Hsp90 β y Bcl-2. Lo anterior conlleva a la liberación de citocromo c, activación de caspasas y apoptosis (Cohen-Saidon, et al., 2006). Lo anterior sugiere diferencias y a la vez una cooperación entre Hsp90 α y Hsp90 β sobre las propiedades anti-apoptóticas

La inhibición de Hsp90 con productos naturales o sintéticos de la geldanamicina han mostrado tener distinta afinidad sobre las isoformas Hsp90a y Hsp90b. A la fecha, se desconoce si el inhibidor 17-DMAG tiene este mismo efecto.

Es por esto que este trabajo se enfoca a determinar el papel que juegan las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β durante la inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en células de cáncer renal, genotipo VHL-/-, PTEN-/-.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La sobre-regulación de Hsp90 α en células de cáncer renal VHL $^{-/-}$, PTEN $^{-/-}$ brindará resistencia al efecto pro-apoptótico del 17-DMAG, mientras que Hsp90 β favorecerá dicho efecto.

2. Objetivo general:

Estudiar la participación de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β durante el efecto pro-apoptótico del inhibidor 17-DMAG empleando un modelo de inhibición de Hsp90 aguda y crónica en líneas celulares de carcinoma renal humano.

2.1 Objetivos particulares:

- a) Establecer un modelo de inhibición de Hsp90 aguda y crónica con 17-DMAG en la línea celular de carcinoma renal humano 786-O y línea normal HEK-293.
- b) Estudiar la muerte celular en células de cáncer renal VHL $^{-/-}$, PTEN $^{-/-}$, tratadas con el inhibidor 17-DMAG de manera aguda y crónica.
- c) Obtener el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β durante el proceso de muerte celular inducido por el tratamiento del inhibidor 17-DMAG en células de cáncer renal VHL $^{-/-}$, PTEN $^{-/-}$
- d) Estudiar la expresión de las proteínas “cliente” de Hsp90 involucradas en los procesos de inhibición aguda y crónica del 17-DMAG en células de cáncer renal VHL $^{-/-}$, PTEN $^{-/-}$.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares de riñón normal y de cáncer:

Las células HEK-293T fueron adquiridas por la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.). Las líneas celulares de CCR 786-O y ACHN de humano fueron proporcionados por la Dra. Vilma Maldonado Lagunas, a partir del banco de líneas celulares adquiridas del ATCC bajo resguardo del Instituto de Medicina Genómica de la SSA, México. Las células HEK-293 se cultivaron en medio DMEM-F12 (GibcoLife Technologies, Carlabad, CA, EE. UU.), 786-O se cultivó en medio RPMI-1640 (GibcoLife Technologies, Carlabad, CA, EE. UU.), y ACHN se cultivó en medio DMEM (1X) (GibcoLife Technologies, Carlabad, CA, EE. UU.), suplementados con 10% de suero fetal bovino (GibcoLife Technologies, Carlabad, CA, EE. UU) y 1X de antibiótico A/A. Cada línea celular posee genotipos específicos que se indican en la tabla 1. Todas las células se cultivaron en una incubadora estéril que se mantuvo a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Tabla 2. Características genotípicas y fenotípicas de las líneas celulares renales empleadas para los experimentos *in vitro*.

Línea celular	Genotipo VHL	Genotipo PTEN	Fenotipo metastásico	Características
HEK-293T	+/+	+/+	No metastásica	Epitelio renal normal
786-O	-/-	-/-	+/- Migración y Metástasis	Adenocarcinoma de células renales, transfectable y tumorigénica.
ACHN	+/+	+/+	+++ Migración y Metástasis	Adenocarcinoma de células renales, transfectable y tumorigénica

Western-Blot:

Las células se lisaron en PBS 1X acondicionado con inhibidores de proteasa (2X) y un cocktail inhibidor de fosfatasa (4X). La concentración de proteínas se determinó utilizando un kit de “Lowry” modifica (Bio-Rad DC™, EE.UU.). En total, 30 g de las respectivas proteínas de tejido fueron separadas por SDS-PAGE realizado en gel de 10% y 18% y después se transfirió a membranas de PVDF (Millipore, Inmobilon-P, MA, EE.UU.). Las membranas se bloquearon con leche de bloqueo al 5% (CALBIOCHEM, EE. UU) y después se incubaron con anticuerpo anti-Hsp90β (1: 250; Santa Cruz, Biothecchnology), anti-Hsp90α (1:2000, Millipore EE. UU), anticuerpo anti-Hsp70 (1:2,500, Millipore, EE. UU.) y el anticuerpo acoplado a HRP anti-actina (1: 1000; Santa cruz, technology, CA, EE.UU.), Anti-Human/Mouse Caspasa 3 (1:250, affymetrix e Bioscience, EE. UU), anticuerpo policlonal anti-PARP (1:500, Millipore, EE. UU.). Las membranas se lavaron cinco veces durante 10 minutos cada uno utilizando TBS-T 1X (TBS-T), y luego se incubaron con anticuerpos secundarios (revisar anticuerpos en Anexo). Las membranas se lavaron posteriormente de nuevo con TBS-T seis veces, cada lavado una duración de 10 min. Las bandas de proteína se visualizaron utilizando el método de quimioluminiscencia. Todos los análisis de inmunotransferencia se realizaron tres veces.

Ensayo de viabilidad celular (método de exclusión de azul de tripano):

La viabilidad celular se analizó usando un ensayo de Azul de tripano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se dividieron en dos grupos: el grupo de control negativo, que comprendía las células sólo con medio; y el grupo experimental. Las células del grupo experimental fueron cultivadas a 70-80% de confluencia en placas de 96 pocillos. 17-DMAG se administró a continuación, a una concentración final de 250 y 500 nM para los tiempos de tratamiento de 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h después de la incubación con el fármaco se continuó con la lectura de células teñidas con azul tripano.

$$\% Viabilidad celular = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Ensayo de proliferación celular (método colorimétrico MTT):

La proliferación celular se analizó usando un ensayo de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se dividieron en tres grupos: el grupo de control negativo, que comprendía las células sólo con medio, control blanco que comprendía las células sin tratamiento y con MTT; y el grupo experimental. Las células del grupo experimental fueron cultivadas a 70-80% de confluencia en placas de 48 pocillos. 17-DMAG se administró a continuación, a una concentración final de 250 y 500 nM para los tiempos de tratamiento de 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h Después de la reacción con el fármaco a los diferentes tiempos las células se trataron a continuación con 20µl / pocillo de MTT durante 3:30 horas a 37° C, transcurrido el tiempo se disolvió los cristales formados de MTT con 150µL de DMSO al 10% y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Las células se sometieron a lecturas de absorbancia a 590 nm (ensayo: 570 nm; referencia: 630 nm usando un lector de microplaca de 48 pocillos para obtener los valores de DO (absorbancia) para el experimental (OD experimental), control blanco (OD en blanco) y control negativo (OD negativos grupos). Los valores de DO se normalizaron a las células sin tratamiento con 17-DMAG. El aumento de densidad óptica refleja el número de células viables.

$$\% \text{ Proliferación celular} = \frac{DO \text{ experimental}}{DO \text{ negativo} - DO \text{ blanco}} \times 100$$

Determinación de la muerte celular por apoptosis (Tinción con DAPI):

Se sembraron 3×10^4 células en cubreobjetos de 22mm sobre pozo, empleando placas de 24 pozos, después de 24 horas de sembrado se administró el fármaco a una concentración de 500nM. Se lavaron con PBS 1X y se continuó con su fijación (4% paraformaldehido) por 15 minutos, nuevamente se lavó con PBS/Triton-100X 0.1% por 30 minutos. Finalmente se tiñeron con DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) 0.5 µg/mL por 30 minutos y se lavó con PBS. El cubre objeto se colocó sobre un portaobjeto empleando medio de montaje y continuó con su lectura en el microscopio de luminiscencia AxioVert de Carl Zeiss (ZEN 2012).

Inhibidores de Hsp90: El inhibidor de Hsp90 17-DMAG fue adquirido por Selleck Químicos (Houston, TX. EE: UU.). Se disolvió en PBS estéril y se almaceno a -20°C en oscuridad. (Siempre se manejó cuidando de exposición de luz)

Análisis densitométrico de los Western blot: Las imágenes resultantes se digitalizaron en escáner, y analizaron los resultados mediante densitometría con el programa "ImageJ".

Análisis estadístico:

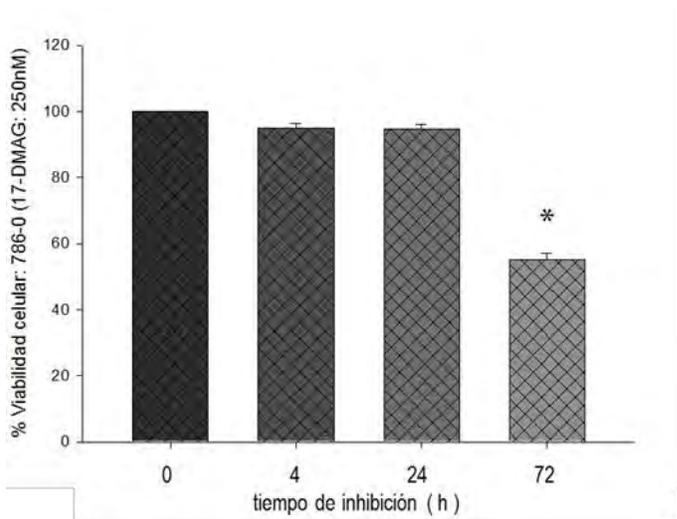
Los datos fueron analizados utilizando el software Minitab, versión 17 (Minitab, Inc., Chicago, IL, EE.UU.) y se corroboró con el software SigmaPlot, versión 10.0 (SigmaPlot for windows, EE. UU). Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias en la viabilidad celular entre los grupos se evaluó mediante el t -test o análisis de varianza de dos vías. $P < 0.05$ se consideró para indicar una diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

1. Establecimiento de un modelo de inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en células de riñón humano normal y de cáncer.

Se estableció un modelo de inhibición aguda y crónica para determinar el efecto sobre la inhibición de Hsp90 en líneas celulares de cáncer: 786-O y ACHN, y la línea de células de riñón humano normal: HEK-293. Se empleó ensayos de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano a dosis de 1 μ M, 500nM y 250nM, evaluando los tiempos de 4, 24 y 72 h. Posteriormente se prosiguió con ensayos de Proliferación celular con MTT empleando mismos tiempos pero sólo concentración de 500nM y 250 nM.

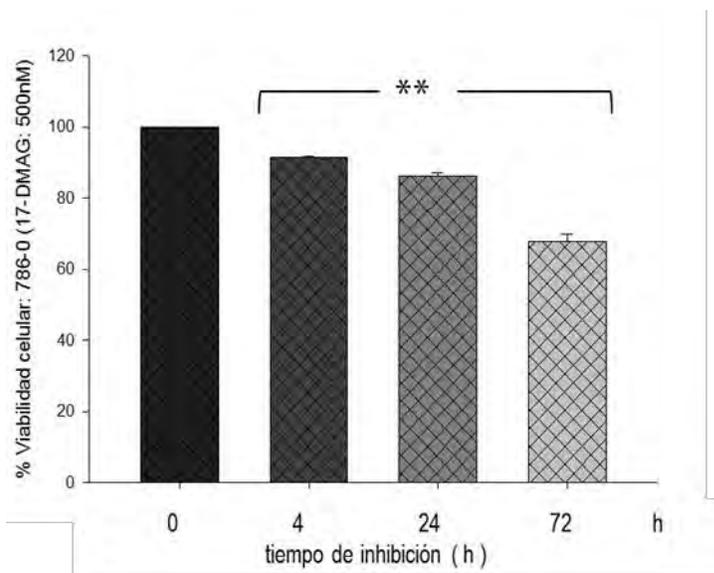
Empleando el modelo de inhibición en la línea 786-O se observó que a partir de las 4 h con 250 nM de 17-DMAG existe una diferencia significativa con respecto al control; sin embargo, sólo a las 72 h la viabilidad celular disminuye hasta un 60%. Del mismo modo, empleando una concentración de 500nM del 17-DMAG se observa una diferencia significativa en todos los tiempos con respecto al control y la disminución de viabilidad celular va disminuyendo paulatinamente hasta llegar a un 70% (figura 2). La viabilidad celular a una dosis de 1 μ M no tuvo diferencias sobre las demás concentraciones, llegando a un 55% de viabilidad celular (Figura suplementaria 1). Empleando la línea celular ACHN no se observó lo mismo, pues no hubo una disminución significativa comparada con la línea celular 786-O, siendo esta la línea más sensible al tratamiento (Figura suplementaria 2).



Gráfica 1. Viabilidad celular en células de carcinoma renal humano 786-O normalizada con línea normal de riñón HEK-293, con tratamiento de 250 nM de inhibidor de Hsp90 17-DMAG.

* $p < 0.007$ con respecto a células HEK-293T.

Gráfica 1. Ensayo de viabilidad en la línea celular 786-O tratadas con una concentración de 250nM del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en línea a diferentes tiempos.

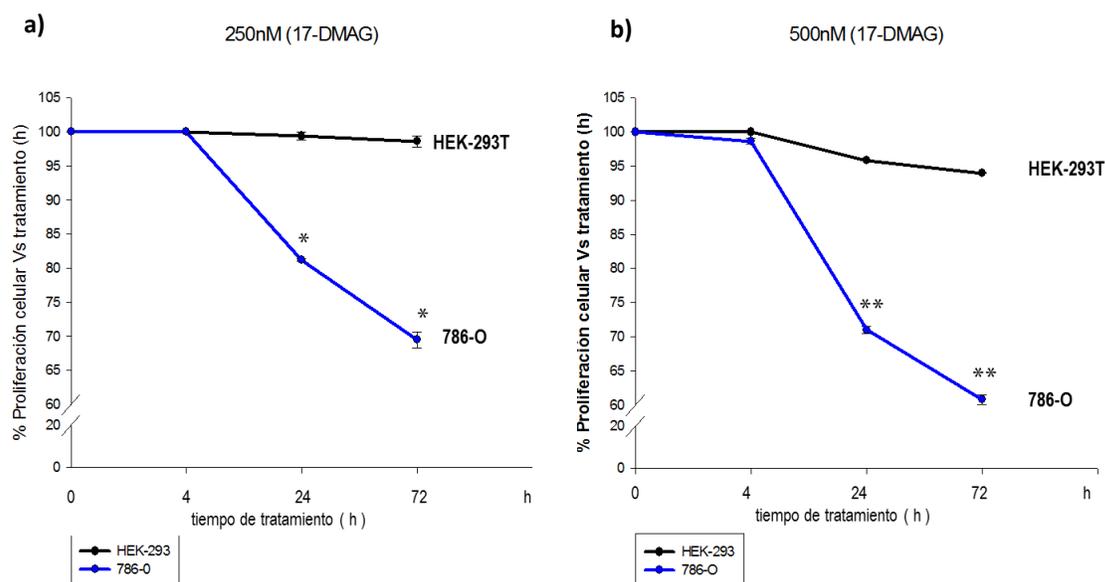


Gráfica 2. Viabilidad celular en células de carcinoma renal humano 786-O normalizada con línea normal de riñón HEK-293T, con tratamiento de 500 nM de inhibidor de Hsp90 17-DMAG.

** $p < 0.001$ con respecto a células control.

Gráfica 2. Ensayo de viabilidad en la línea celular 786-O tratadas con una concentración de 500nM del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG en línea a diferentes tiempos.

Para corroborar la viabilidad celular obtenida por la técnica de exclusión azul tripano se empleó un ensayo de proliferación celular con el reactivo MTT. A partir de aquí se descartó la línea ACHN al no observar cambios significativos sobre la línea celular 786-O obtenido por la exclusión de azul de tripano. La inhibición de Hsp90 por 17-DMAG a concentraciones de 250 y 500nM disminuye la proliferación celular hasta un 70 y 60% respectivamente (gráfica 3a y 3b). Así mismo se observa que en la línea normal HEK-293T no se afecta la proliferación celular.



* $p < 0.0001$ con respecto a la línea celular normal (HEK-293)

** $P < 0.018$ con respecto a línea celular normal (HEK-293)

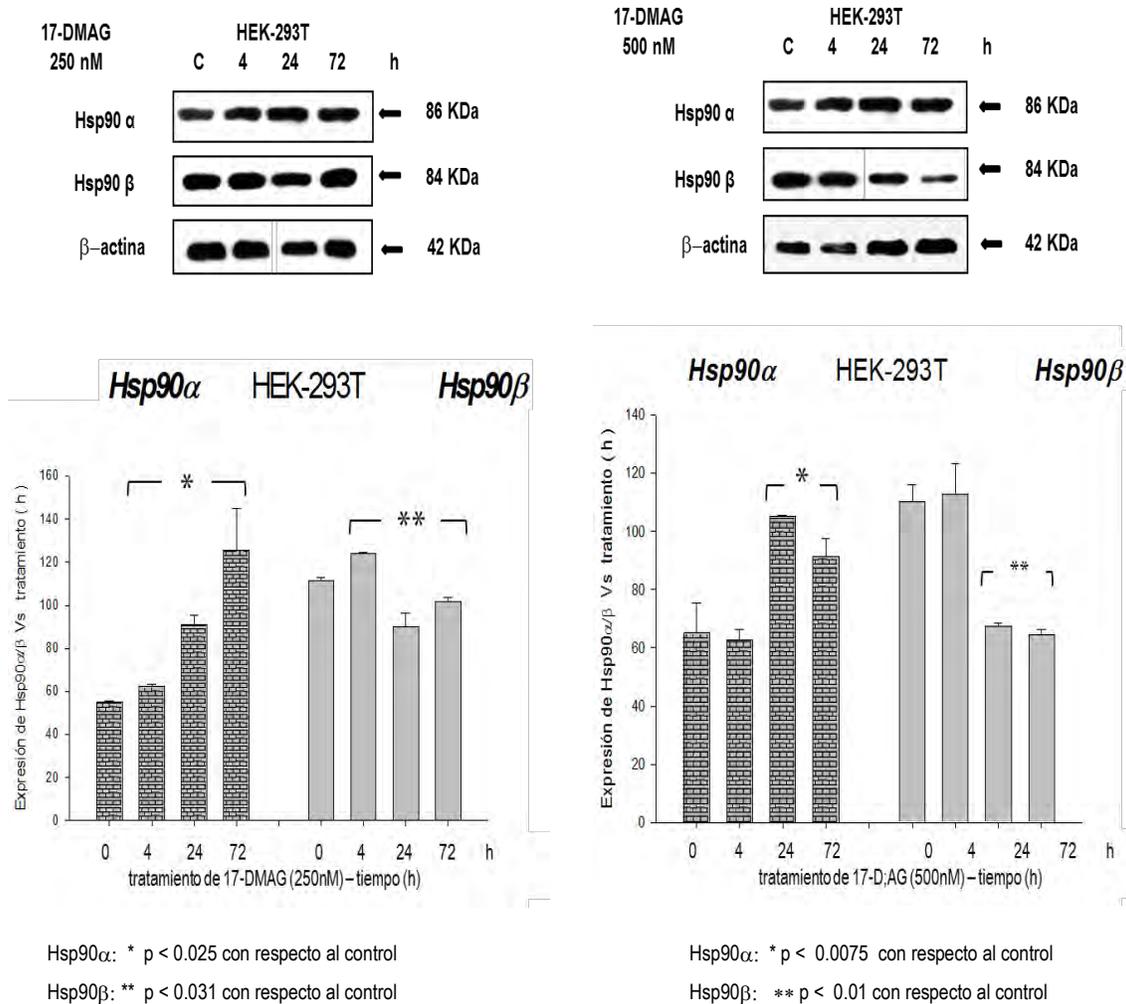
Gráfica 3. Ensayo de proliferación celular por inhibición de Hsp90 en línea celular de carcinoma renal humano 786-O a tiempos largos. a) Ensayo de proliferación celular a concentración de 250nM con 17-DMAG, y b) Ensayo de proliferación celular a concentración de 500nM con 17-DMAG

2. Perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en inhibición aguda y crónica.

2.1 Perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en inhibición aguda y crónica en línea celular renal normal HEK-293T.

Empleando células HEK-293T tratadas con una concentración de 250nM y 500nM del 17-DMAG se extrajeron proteínas totales de cada grupo celular y se evaluó el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β empleando anticuerpos anti-Hsp90 α y anti-Hsp90 β .

En la gráfica 4 se puede observar que la isoforma Hsp90 α mostró un aumento significativo con respecto al control ($p < 0.025$). Con respecto a la isoforma Hsp90 β , se observa que el tratamiento con 250nM de 17-DMAG mostró un ligero aumento de expresión con respecto al control y después se mantuvo ($p=0.019$). Por el contrario, a una concentración de 500nM con 17-DMAG, la isoforma Hsp90 α mostró un aumento entre los tiempos de 24 y 72h con una $p < 0.0075$. Por el contrario, la isoforma Hsp90 β mostró una disminución de hasta un 65% a partir de las 24 h con respecto al control ($p= 0.01$).

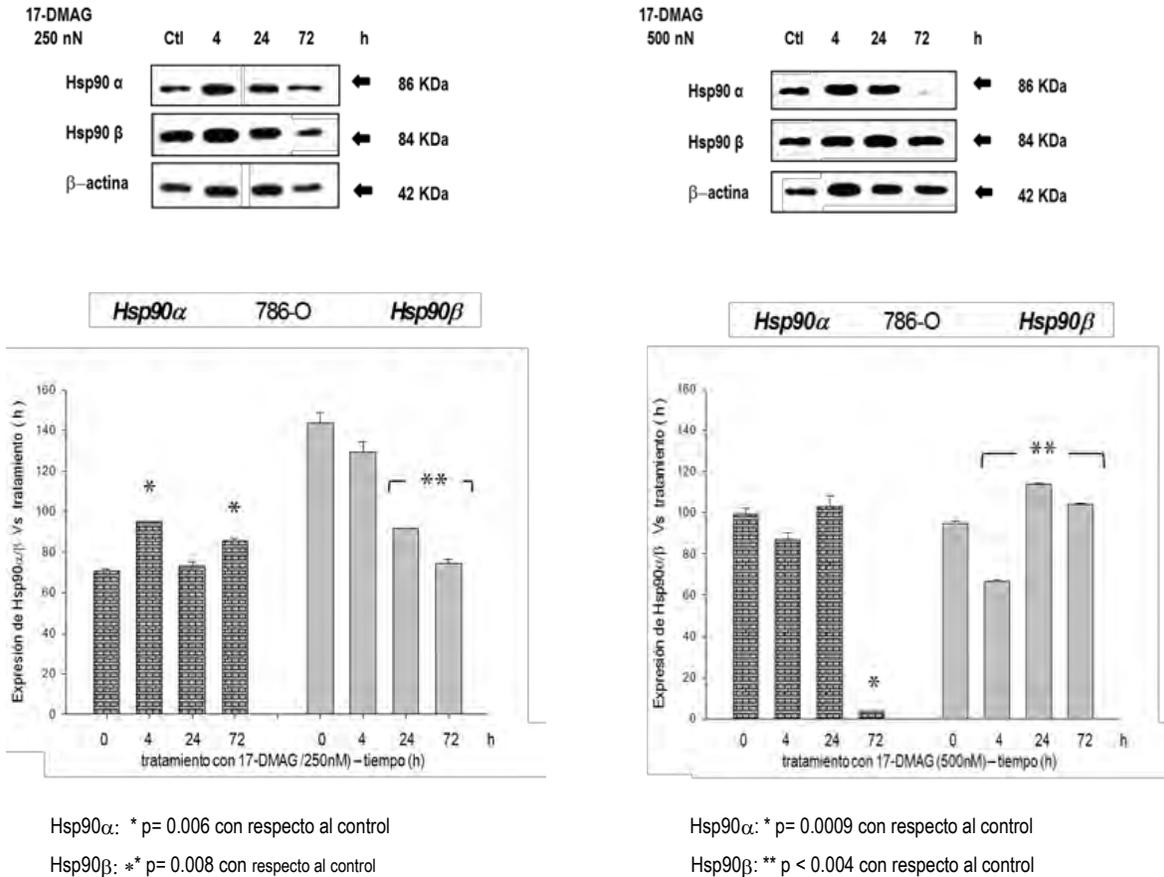


Gráfica 4. Perfil de expresión de las proteínas Hsp90α y Hsp90β durante la inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en la línea celular de riñón normal HEK-293T

2.2 Perfil de expresión de las isoformas Hsp90α y Hsp90β en inhibición aguda y crónica en línea celular de carcinoma renal humano 786-O, PTEN -/- y VHL -/-.

Empleando células 786-O tratadas con una concentración de 250nM y 500nM del 17-DMAG se extrajeron proteínas totales de cada grupo celular y se evaluó el perfil de expresión de las isoformas Hsp90α y Hsp90β por ensayo de western blot.

En la gráfica 5 se observa que a una concentración de 250nM la isoforma Hsp90 α mostró un aumento significativo a las 4 h con una $p= 0.006$ con respecto al control, pero después la expresión se mantuvo en tiempos largos. Para la isoforma Hsp90 β a partir del tiempo de 4 h y hasta 72 h se observó una disminución de expresión con una $p= 0.01$ con respecto al control. Por el contrario, a una concentración de 500nM la isoforma Hsp90 α se mantiene y hasta las 72h baja drásticamente sin ser casi apreciable con una $p= 0.00009$. Para la isoforma Hsp90 β mostró una disminución sólo a las 4 h y a partir de las 24 h hubo un aumento de la expresión de la isoforma con una $p < 0.004$ con respecto al control y a las 72 h se mantuvo el nivel de expresión. Tomando en cuenta los datos obtenidos se observa que la línea carcinoma renal 786-O presenta una expresión basal de ambas isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , y el cambio diferencial de expresión de dichas isoformas depende de la concentración de 17-DMAG.



Gráfica 5. Perfil de expresión de proteínas Hsp90 α y Hsp90 β durante la inhibición aguda y crónica de Hsp90 en la línea celular de carcinoma renal humano 786-O

3. Perfil de expresión de proteínas “cliente” de Hsp90 asociadas a muerte celular

Con el fin de determinar si las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β pueden trabajar de manera diferencial ante proceso de muerte celular inducido por 17-DMAG, a la línea de carcinoma renal 786-O y línea normal HEK-293t

T se les administró 17-DMAG a una concentración de 500nM para evaluar a los tiempos de 4, 24 y 72 h por medio de western blot, y de la misma evaluar a proteínas asociadas a dicho proceso donde Hsp90 presenta relación con ellas, ya sea para su activación o estabilización.

Como se observa en la figura 13. las células HEK-293T muestran activación de PARP independiente de Caspasa 3, y una sobre expresión de Hsp70 conforme transcurre el tiempo. Para la línea 786-O se muestra activación de PARP desde las 4 h, independiente de Caspasa 3 y una ausencia de Hsp70 incluso en el control. Para corroborar la expresión de dichas proteínas se empleó un control positivo empleando la línea de cáncer de próstata donde ante un tratamiento con staurosporina 1.5µM se activan PARP y Caspasa 3 (figura 13).

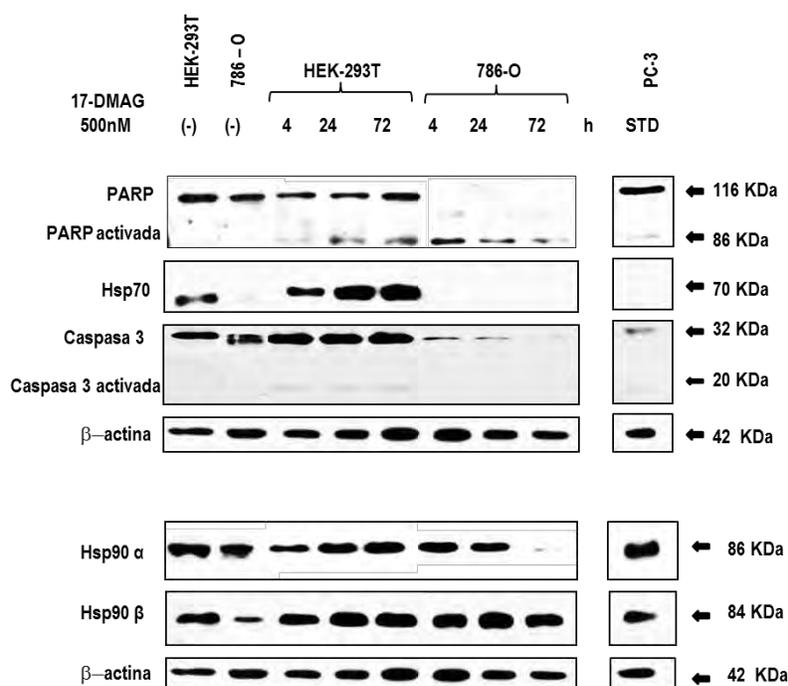


Figura 13. Western blot de las proteínas "cliente" de Hsp90 asociadas a muerte celular por tratamiento con 17-DMAG

4. Cambios nucleares asociados a muerte celular por apoptosis por la inhibición de Hsp90 con 17-DMAG en células de cáncer renal 786-O.

Las células se trataron con 250 y 500 nM, y se visualizaron a partir de las 24 h y hasta las 72 h, y se tuvo un grupo control sin tratamiento. En la figura 14 se observan células íntegras, con presencia de nucleolos y sin daño en membrana plasmática aún a 72 h, y se observa una célula en división celular

lo que indica que las células sin tratamiento incluso a 72 h mantiene su ciclo de división celular normal.

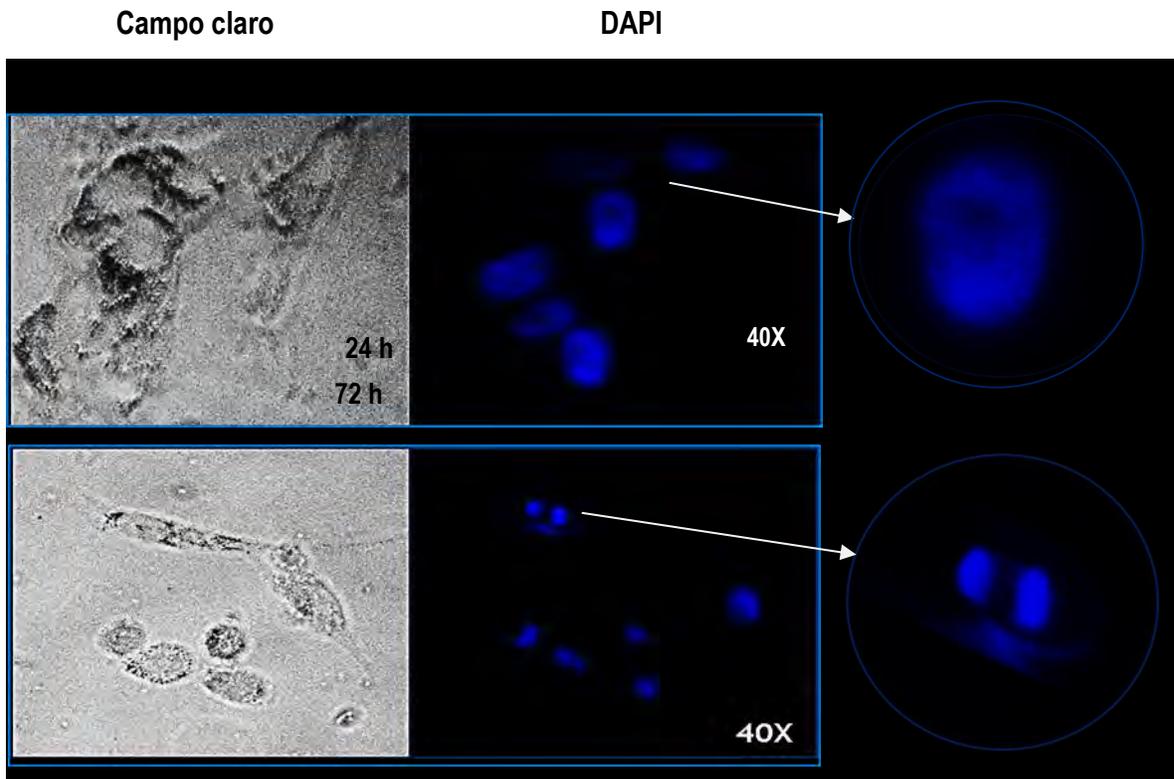


Figura 14. Línea celular de cáncer renal 786-O sin tratamiento: morfología nuclear mediante tinción de DAPI

A diferencia de las células sin tratamiento, bajo una concentración de 250nM y 500nM se observó condensación de la cromatina y un ligero daño en la membrana plasmática a partir de las 24 h (figura 15 y 16), sin embargo, específicamente en concentración de 500 nM es predominante la fragmentación del DNA que aumenta con el tiempo (figura 16). Esto indica que el daño sobre el DNA es señal de apoptosis tardía.

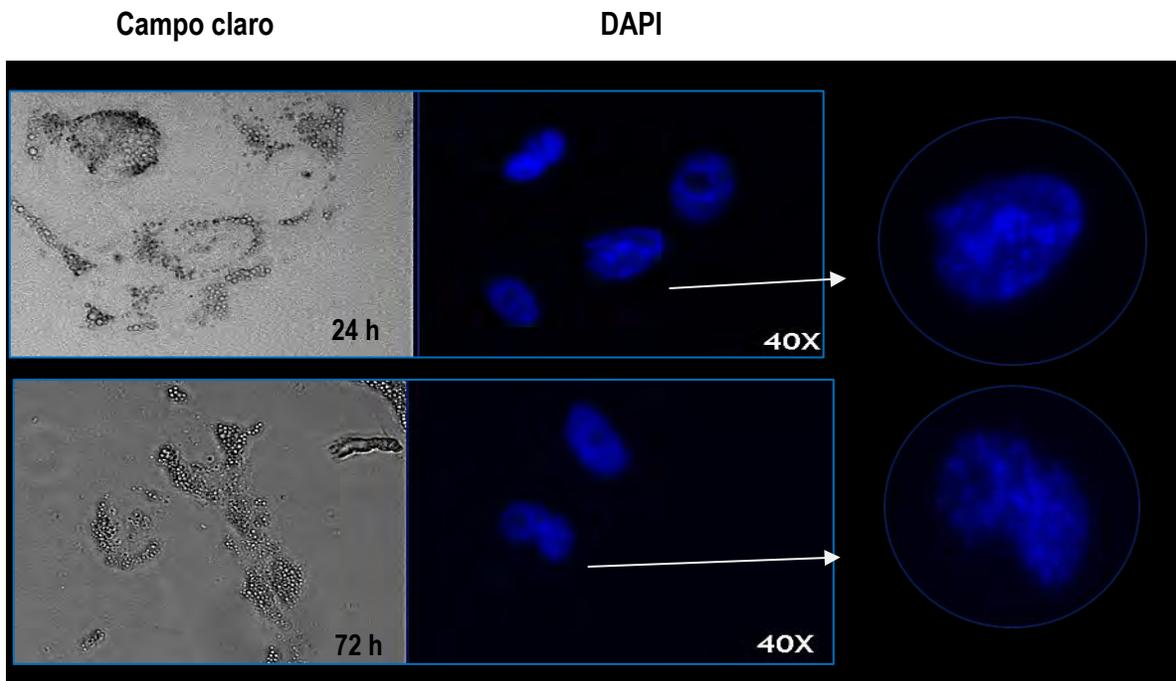


Figura 15. Línea celular 786-O tratadas con 17-DMAG a una concentración 250nM: morfología nuclear mediante tinción de DAPI

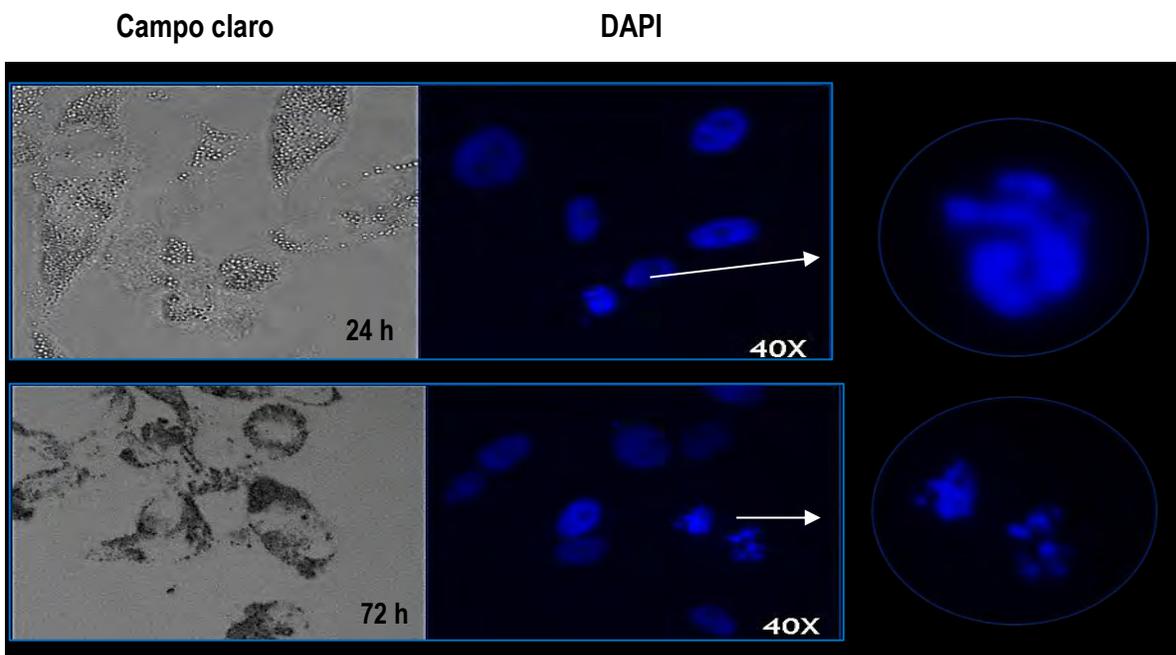


Figura 16. Línea celular 786-O tratadas con 17-DMAG a una concentración 500nM: morfología nuclear mediante tinción de DAPI.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se estableció un modelo de inhibición aguda y crónica de Hsp90 con 17-DMAG en la línea de carcinoma renal 786-O y en la línea normal HEK-293T, evaluándose la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , donde finalmente se estudiaron las proteínas que intervienen en el proceso de muerte celular.

Diversos estudios sobre los inhibidores de Hsp90 han mostrado selectividad para las células cancerosas en comparación con muchas células normales. Nosotros corroboramos que la inhibición de Hsp90 presenta mayor sensibilidad en las líneas celulares de carcinoma renal humano en comparación con la línea normal HEK-293T, la cual mantuvo su viabilidad y proliferación celular por encima del 90%, mientras que en la línea de carcinoma renal disminuyó de un 30-40% la cual fue dependiente del tiempo de tratamiento. Esto se puede atribuir al hecho de que, en primer lugar, Hsp90 se encuentra principalmente en heterocomplejo de chaperona el cual tiene mayor afinidad por 17-DMAG, en comparación con la forma no complejada, que predomina en células normales. La selectividad también puede producirse debido a la mayor dependencia de las células cancerosas en las vías oncogénicas afectadas por la inhibición de Hsp90 y debido al estado de estrés al que están sometidas muchas de las células cancerosas (Kamal et al., 2003).

El inhibidor 17-DMAG presenta una potente actividad antitumoral ya que inhibe la actividad de ATPasa de Hsp90 y que actualmente se encuentra en fase clínica II y muestra evidencia de actividad biológica e implicación clínica favorable. Sin embargo aún se cuestiona si la inhibición es específica para alguna de las isoformas citosólicas de Hsp90: Hsp90 α y Hsp90 β . Para poder identificar que isoforma de Hsp90 pudiera conferir dicha sensibilidad en la línea de carcinoma renal humano 786-O, se analizó su expresión por western blot. Para la línea celular de riñón normal la expresión de Hsp90 α aumentó de manera dependiente del tiempo, y sólo la isoforma Hsp90 β mostró una expresión dependiente de la concentración. Esto corrobora los datos ya reportados

sobre Hsp90 α , donde en células normales Hsp90 β es la isoforma constitutiva mientras que Hsp90 α es la isoforma inducible por estrés (Sreedhar et al., 2004).

En la línea de carcinoma renal humano 786-O presentó una mayor expresión de Hsp90 β en condiciones normales, y durante la inhibición con 17-DMAG hubo una disminución de su expresión; mientras que Hsp90 α ante una inhibición crónica disminuyó drásticamente a las 72 h. Esto puede explicarse debido a que Hsp90 β es la isoforma constitutiva, y es probable que esté involucrada en la adaptación celular a largo plazo. Hsp90 α es inducible y una alta expresión de ésta se demostró que se asocia con la progresión del tumor, la regulación del ciclo celular y evasión de la apoptosis. En contraste, la expresión de Hsp90 β se ha asociado con el desarrollo a resistencia a fármacos (Bertram et al., 1996), y se ha observado que Hsp90 β participa en funciones celulares normales como el mantenimiento de la arquitectura celular, la diferenciación y la citoprotección (Sreedhar et al., 2004). Dicho lo anterior, nuestras células ante una disminución de Hsp90 α inducida por el inhibidor 17-DMAG y una expresión considerablemente baja de Hsp90 β en comparación con la célula normal, se puede atribuir la disminución de la viabilidad celular y proliferación celular.

Tomando en cuenta que la línea celular 786-O mantiene un genotipo VHL $-/-$ y PTEN $-/-$, la inhibición de Hsp90 fue más sensible, pudiéndose explicar esta sensibilidad a una sobre expresión de las proteínas Akt y HIF-1 α , proteínas "cliente" de Hsp90. Lo anterior se asocia a la pérdida de función de PTEN y con ello permitir que la vía de señalización de Akt continúe hasta llegar a la inducción de HIF-1 α . A su vez HIF-1 α no puede ser degradado por la proteína VHL y la célula puede ser dependiente de Hsp90 para la estabilización de dichas proteínas. Se sabe que 17-DMAG induce la degradación de la proteína HIF-1 α acompañado por la inhibición de la actividad transcripcional de HIF-1 α inducida (Isaacs et al., 2002). Lo anterior es debido a que Hsp90 desempeña su función como chaperona mediante la regulación de la actividad de HIF-1 α incluso en normoxia (Minet et al., 1999). También se ha reportado que la inhibición de Hsp90 desregula a la baja la regulación de la vía dependiente de PI₃K/Akt causando una disminución de la expresión de la proteína Akt (Hostein I. et al., 2001). Dicha disminución de Akt sugiere que requiere la asociación con Hsp90 funcional, y ante una disminución de la misma, la estabilidad de Akt se pierde. Considerando que en nuestros

estudios de expresión, la abundancia entre Hsp90 α y Hsp90 β fue diferencial y dependiente de la concentración del inhibidor 17-DMAG, nuestro modelo de inhibición presenta cierta asociación con lo ya reportado por Cortés-González y colaboradores, donde exponen que Hsp90 β previene la fosforilación de Akt en la serina 473, y Hsp90 α permite su activación por el mismo residuo. Por lo tanto una disminución de Hsp90 α podría favorecer la sensibilidad de la célula ante el tratamiento con 17-DMAG potenciando un efecto pro-apoptótico.

Como ya se mencionó, 17-DMAG es un inhibidor competitivo de la actividad ATPasa dirigiendo a degradación proteínas “cliente” de Hsp90 agotando las oncoproteínas y la detención del ciclo celular y la apoptosis consecuente (Pearl y Prodromou, 2000). También se sabe que la inhibición de Hsp90 por 17-DMAG promueve un incremento de Hsp (ej. Hsp27 y Hsp70) y su activación se da como respuesta al estrés, la cual podría ser responsable de la protección de las células contra la inducción de apoptosis (Georgakis et al., 2006).

Durante la inhibición de Hsp90 con 17-DMAG, la línea celular renal normal HEK-293T presentó una sobre-expresión de Hsp70, una activación de la Caspasa 3 y activación de PARP, encargada de la reparación del DNA. Se ha reportado que la expresión de Hsp70 también puede rescatar a las células de la apoptosis, río abajo de la activación de Caspasa 3 (Jaattela et al., 1998). Durante las fases finales de la apoptosis, el DNA es digerido por la DNAasa CAD (DNAasa activada por Caspasa), después de la activación por Caspasa 3. La actividad enzimática y el repliegamiento correcto de CAD se ha informado que se regula por Hsp70 (Sakahira y Nagata, 2002), por lo tanto, los altos niveles de Hsp70 puede rescatar a la célula de la apoptosis aún después de una activación de Caspasa 3. Esto explicaría el por qué las células de tejido normal se mantuvieron viables a pesar del tratamiento.

En el caso de la línea 786-O, hubo ausencia de Hsp70, activación de PARP independiente de Caspasa 3. Estos datos correlacionan con la ausencia de Hsp70, el cual conduce a la inhibición de la proliferación celular y apoptosis. Podría deberse a que existe un posible mecanismo de acción a través de la unión de Hsp70 con proteínas pro-apoptóticas, ante la ausencia de esta chaperona y la

inhibición de Hsp90, las proteínas que intervienen en la muerte celular podrían degradarse perdiendo la protección contra la muerte celular inducida por 17-DMAG. Añadiendo que existe activación de PARP, la cual es crucial para dictaminar la célula a apoptosis.

Finalmente se evaluó la muerte celular por apoptosis a través de la tinción con DAPI solo en la línea celular 768-O. Los datos demuestran que a una concentración de 250nM se promueve la condensación de la cromatina, y a una concentración de 500nM se favorece la fragmentación del DNA y por lo tanto la pérdida de la estructura nuclear. Tomando en cuenta que Hsp90 β está relacionada con el mantenimiento celular y la citoprotección, una disminución de esta proteína por el tratamiento con 17-DMAG permite a la célula entrar en apoptosis y observar cambios en la morfología nuclear.

CONCLUSIÓN

En conclusión, 17-DMAG ejerce una actividad pro-apoptótica y esto parece estar relacionado con la degradación de proteínas cliente de Hsp90 en células cancerosas VHL-/- y PTEN -/-, debido a que existe una sobre-expresión de proteínas que intervienen en la angiogénesis, tales como, Akt y HIF-1 α , la cuales son proteínas “cliente” de Hsp90. Tomando en cuenta los datos obtenidos se observa que la línea carcinoma renal 786-O presenta una expresión basal de ambas isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , y el cambio diferencial de expresión de dichas isoformas depende de la concentración de 17-DMAG.

Una disminución de Hsp90 α podría dictaminar la sensibilidad de la célula, favoreciendo el efecto pro-apoptótico de 17-DMAG. La ausencia de PTEN en el desarrollo de CCR podría sugerirse como un marcador pronóstico como agente terapéutico en combinación con un inhibidor de Hsp90 específico de isoforma. Por otro lado, la biodisponibilidad oral y la solubilidad de 17-DMAG podrían ser ventajoso para un programa de administración de forma crónica para mantener la inhibición de Hsp90 por periodos prolongados, asegurando por lo tanto el agotamiento sostenido de proteínas “cliente”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baeuerle P.A., Baltimore D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell*. Vol (1),13-20.
2. Baeuerle, P. A. (1995) Inducible Gene Expression. *Environmental Stresses and Nutrients*, Vol 1, 284
3. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M. (1996) Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp 90 beta. *Anticancer Drugs*. Vol 7, 838-45.
4. Bottoni P, Giardina B, Scatena R. (2009). Proteomic profiling of heat shock proteins: An emerging molecular approach with direct pathophysiological and clinical implications. *Proteomics Clin Appl*. Vol 3, 636-53.
5. Bukau B., Weissman J., Horwich A. (2006), Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*.; 125:443–451
6. Chatterjee M, Jain S, Stühmer T, Andrulis M, Ungethüm U, Kuban RJ, Lorentz H, Bommert K, Topp M, Krämer D, Müller-Hermelink HK, Einsele H, Greiner A, Bargou RC. (2007). STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood*, Vol. (2):720-8.
7. Chen B, Zhong D, Monteiro A. (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics*, Vol. (7), 156.
8. Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. (2006) Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood*, Vol.(4), 1413-20.
9. Cortes-González C, Barrera-Chimal J, Ibarra-Sánchez M, Gilbert M, Gamba G, Zentella A, Flores ME, Bobadilla NA. (2006) Opposite effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cell Physiol Biochem*, Vol. (4-6), 657-68.
10. Cortés-González CC, Ramírez-González V, Ariza AC, Bobadilla NA. (2008) Functional significance of heat shock protein 90. *Rev Invest Clin*. Vol. (4), 311-20.
11. Crestani A, Rossanese M, Calandriello M, Sioletic S, Giannarini G, Ficarra V. (2016) Introduction to small renal tumours and prognostic indicators. *Int J Surg*. pii: S1743-9191(16) 00256-9.

12. Csermely P, Agoston V, Pongor S. (2005) The efficiency of multi-target drugs: The network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. (4), 178–182.
13. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. (1998) A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* Vol. (2), 129-68.
14. Deuerling E., Bukau B. (2004) Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* Vol. 39, 261–277.
15. Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V. (2015) Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet World.* Vol. (8), 46-51.
16. Feige U, van Eden W. Infection, autoimmunity and autoimmune disease. *EXS.* 1996; 77:359-73. Review.
17. Felts, S. J., Karnitz, L. M., Toft, D. O., (2007) Functioning of the Hsp90 machine in chaperoning checkpoint kinase I (Chk1) and the progesterone receptor (PR). *Cell Stress Chaperones*, Vol.12, 353–363.
18. Georgakis GV, Li Y and Younes A. (2006) The heat shock protein 90 inhibitor 17-aag induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell line by depleting cyclin D1, AKT, Bid and activating caspase 9. *BrJ haematol*, 135: 68-71
19. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfisen CB. (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver *J Biol Chem.* 238:628-35
20. Gupta Rs. (1995) Phylogenetic Analysis of the 90 kD Heat shock family of protein Sequence and Examination of Relationship Among Animals, Plants, and Fungi Species. *Mol Biol Evol*; 12: 1063-73.
21. Haque A, Alam Q, Alam MZ, Azhar EI, Sait KH, Anfin N, Mushtaq G, Kamal MA, Rasool M. (2016) Current Understanding of HSP90 as a Novel Therapeutic Target: An Emerging Approach for the Treatment of Cancer. *Curr Pharm Des.* PMID 26601965
22. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science.* 295:1852–1858.
23. Hightower LE. (1980) Cultured animal cells exposed to amino acid analogs or puromycin rapidly synthesize several polypeptides *J. Cell Physiol:* 407-427.

24. Hostein I., Robertson D., DiStefano F., Workman P., Clarke P. A. (2001) Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res.* 61:4003–4009
25. Hsu PL, Hsu SM. (1990) Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 50(2):350-7.
26. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN Database. (2012) <http://globocan.iarc.fr>
27. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM. (2002) Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem*, 277 (33):29936-44
28. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J.* 17:6124–6134.
29. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Belldegrun AS. (2003) Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urol Clin North Am.* 30:843–852.
30. Jiang B.H., Liu L.Z. (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.*, 102, 19–65
31. Johnson JL. (2012) Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *BiochimBiophysActa.* 1823 (3): 607-13.
32. Jolly C, Morimoto RI. (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 92(19):1564-72.
33. Jonasch E, Futreal PA, Davis IJ, Bailey ST, Kim WY, Brugarolas J, et al. (2012) State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res.* 10:859–880.
34. Kaelin WG Jr. (2004) The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res.* 10 (18 Pt 2): 6290S-5S. Review.
35. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*, 425:407–10.
36. Katschinski DM, Le L, Schindler SG, Thomas T, Voss AK, Wenger RH. (2004) Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol Biochem*, 14 : 351 -60.

37. Klymkowsky M.W., Savagner P. (2009) Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol.*, 174. pp. 1588–1593.
38. Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR y Vierling E. (1997) A small shock protein stably binds heat-denatured model substrate in a folding-competent state *EMBO J.* 16(3):659-71
39. Less-Miller SP, Anderson CW. (1989) The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, Hsp90 alpha at two NH₂-terminal threonine residues. *J Biol Chem.* 264(29):17275-80
40. Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 22:631-677
41. Lis J., Wu C. (1993) Protein traffic on the heat shock promoter: Parking, stalling, and trucking along. *Cell.* 74(1):1-4. Review. No abstract available.
42. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, Kiemeny LA. (2011) The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 60(4):615-21.
43. Ljungberg B., Campbell S.C., Cho H.Y., et al. (2011) The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur. Urol.*, 60. pp. 615–621.
44. Masilamani S, Kim GH, Mchell C. (1999) Aldosterone-mediated regulation of ENAC alpha, beta and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*, 104:R19-R23.
45. Mattei J, da Silva RD, Sehr D, Molina WR, Kim FJ. (2014) Targeted therapy in metastatic renal carcinoma. *Cancer Lett.* 343:156–160.
46. Mattei J, da Silva RD, Sehr D, Molina WR, Kim FJ. (2014) Targeted therapy in metastatic renal carcinoma. *Cancer Lett.* 343:156–160.
47. Mayer MP, Prodromou C, Frydman J. The Hsp90 mosaic: a picture emerges. *Nat StructMol Biol.* 2009; 16(1):2-6.
48. McBride WH, Iwamoto KS, Syljausen R, Pervan M, Pajonk F. (2003) The role of the ubiquitin/proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene.* 22(37):5755-73. Review.
49. Minami Y, Kawasaki H, Miyata Y, et al. (1991) Analysis of Native Forms and Isoform Compositions of the Mouse 90-kDa Heat Shock Protein, Hsp90. *J BiolChem*, 266: 100099-103.
50. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *FEBS Lett.* 460(2):251-6.

51. Molina AM, Nanus DM. (2016) Recent advances in the management of renal cell carcinoma. *F1000Res*; 5. pii: F1000 Faculty Rev-391. Review.
52. Morimoto R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259 (5100):1409-10. Review
53. Morimoto R.I., Santoro M.G. (1998) Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol.* 16(9):833-8. Review
54. Morimoto RI. (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 22(11):1427-38. Review.
55. Morimoto, RI., Sangerg, KD. Abravaya, K. (1992) Transcriptional Regulation of Heat Shock Genes. *The journal of biological chemistry.* Vol. 267, No. 31, pp. 21987-21990, 1392.
56. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Kay A, Ravaud A; (2010) RECORD-1 Study Group. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer.* 116(18):4256-65..
57. Neckers L, Lee YS. (2003) Cancer: the rules of attraction. *Nature.* 425(6956):357-9.
58. Neckers L, Tsutsumi S, Mollapour M. (2009) Visualizing the twists and turns of a molecular chaperone. *Nat StructMol Biol.* 16(3):235-6.
59. Neckers L. (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med.* 8 (4 Suppl):S55-61. Review
60. Nollen EA, Morimoto RI. (2002) Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci.* 115(Pt 14):2809-16. Review
61. O'Neill S, Ingman TG, Wigmore SJ, Harrison EM, Bellamy CO. (2013) Differential expression of heat shock proteins in healthy and diseased human renal allografts. *Ann Transplant.* 18:550-7.
62. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 401(6748):82-5.
63. Pacey S, Wilson RH, Walton M, Eatock MM, Hardcastle A, Zetterlund A, Arkenau HT, Moreno-Farre J, Banerji U, Roels B, Peachey H, Aherne W, de Bono JS, Raynaud F, Workman P, Judson I. (2011) A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res,* 17: 1561–1570.

64. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., and Kharbanda, S.S. (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19(16): 4310–4322.
65. Parmiani, G., Testori, A., Maio, M., Castelli, C. et al., (2004) Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines. *Clin. Cancer Res.* 10, 8142–8146
66. Pearl LH, Prodromou C, Workman P. (2008) The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J.* 410(3):439-53. Review.
67. Pearl LH, Prodromou C. (2000) Structure and in vivo function of Hsp90. *Struct Biol.* 10 (1):46-51. Review.
68. Pearl LH, Prodromou C. (2001) Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv Protein Chem.* 59:157-86. Review.
69. Perona R. (2006) Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* 8, 77–82.
70. Prodromou C, Roe Sm, O'Brien R. (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-Binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, 90:67-75.
71. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*; 90(1):65-75.
72. Rebbe NF, Ware J, Bertina RM, Modrich P, Stafford DW. (1987) Nucleotide sequence of a cDNA for a member of the human 90-kDa heat-shock protein family. *Gene*, 53, 235-45.
73. Richter K., Buchner J. (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*, 188: 281-90.
74. Ron D., Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519–529.
75. Sakahira H, Nagata S. (2002) Co-translational folding of caspase-activated DNase with Hsp70, Hsp40, and inhibitor of caspase-activated DNase. *J Biol Chem.* 277:3364–3370
76. Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., Garrido, C., (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 81, 15–27.

77. Seok JH, Hong JH, Jeon JR. (1999) Aldosterone directly induces Na, K-ATPase alpha 1-subunit Mrna in renal cortex of rat. *BiochemMolBiolInt*, 47: 251-4
78. Sharma SV, Agatsuma T, Nakano H. (1998) Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol. *Oncogene*. 16(20):2639-45.
79. Shen Y, Liu J, Wang X. (1997) Essential role of the first intron in the transcription of Hsp90beta gene. *FEBS Lett*; 413: 92-8.
80. Sherr C.J., McCormick F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2. 103–112
81. Sobin LH, Fleming ID. (1997) TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 80(9):1803-4.
82. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. (2000) Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*. 14(10):1833-49.
83. Soti C, Pal C, Papp B. (2005) Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol* , 17: 210-5.
84. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett*. 562(1-3):11-5. Review.
85. Sreedharan R, Van Why SK. (2016) Heat shock proteins in the kidney. *PediatrNephrol*. 1-10
86. Sufan RI, Jewett MAS, Ohh M. (2004) The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* , 287: 1-6.
87. Teng SC, Chen YY, Su YN, Chou PC, Chiang YC, Tseng SF, Wu KJ. (2004) Direct activation of HSP90A transcription by c-Myc contributes to c-Myc-induced transformation. *J Biol Chem*. 279 (15):14649-55.
88. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L. (2010) Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* , 10:537–49.
89. Viel A. (2010) Genetics and oncogenesis of renal cancer. *G ItalNefrol*. 27Suppl 50:S3-9. Italian.
90. Walter S, Buchner J. (2002) Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *AngewChemInt Ed Engl*. 41 (7):1098-113. Review

91. Wandinger Sk, Suhre MH, Wegele H. (2006) The phosphatase ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J* , 25: 367-76.
92. Whitesell, L., Lindquist, S. L., (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 761–772.
93. Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N. (2007) Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci* , 1113:202–16.
94. Wu C. (1996) The 5' ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature*. 286(5776):854-60.
95. Yano M, Naito Z, Tanaka S, Asano G. (1996) Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res*. 87 (9):908-15.
96. Yilmaz M., Christofori G. (2009) EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 28, 15–33.
97. Yuan T.L., Cantley L.C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27, 5497–5510.
98. Zbar B, Kishida T, Chen F, et al. (1996) Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe and Japan. *Hum Mutat* , 8: 348-57.
99. Zhang SL, Yu J, Cheng XK. (1999) Regulation of human Hsp90alpha gene Expression. *FEBS let* , 444: 130-5.
100. Zhu J, Zhu Y, Qi W, Qiu W. (2015) Effects of the novel heat shock protein 90 inhibitor AUY922 in renal cell carcinoma ACHN and 786-O cells. *OncolLett*. 10(2):941-945.
101. Zuehlke A, Johnson JL. (2010) Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers*. 93(3):211-7. Review.
102. Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, Prince T. (2015) Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*. 570 (1):8-16.

ANEXOS

1. Figuras suplementarias

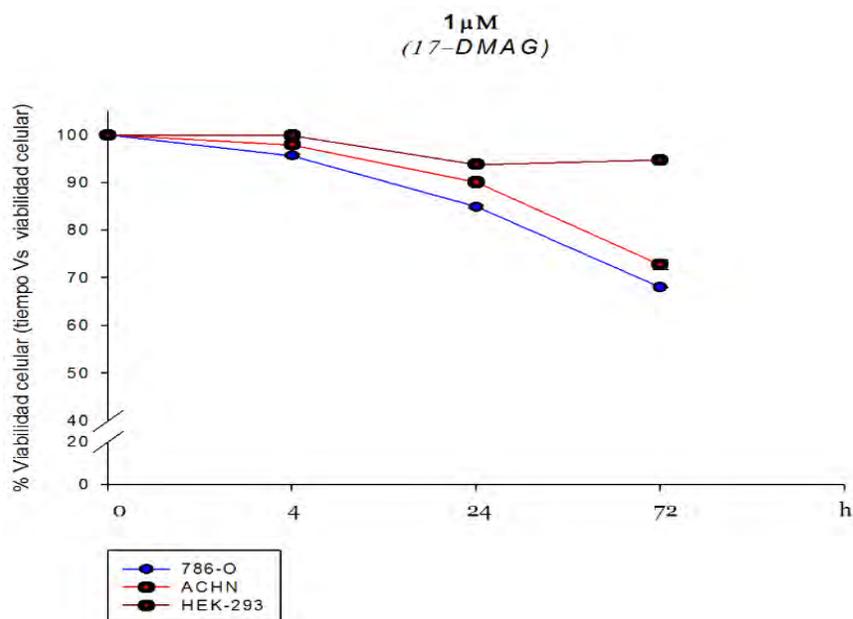


Figura S1. Ensayos de viabilidad celular con 1 μ M de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293). Gráfica de concentración 1 μ M, se observa un comportamiento similar de las líneas de carcinoma renal humano: 786-O (azul) y ACHN (rojo) ante la inhibición de Hsp90 con 17-DMAG.

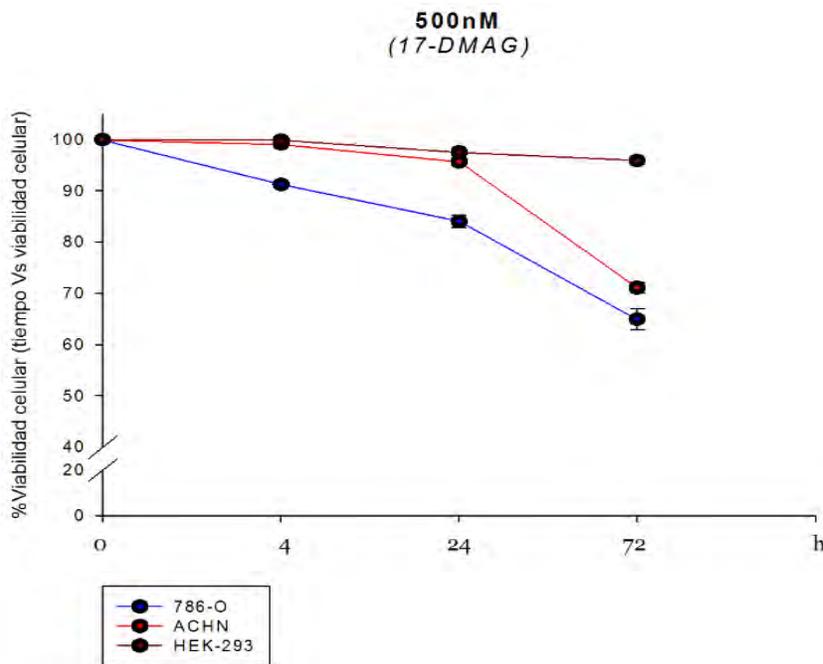
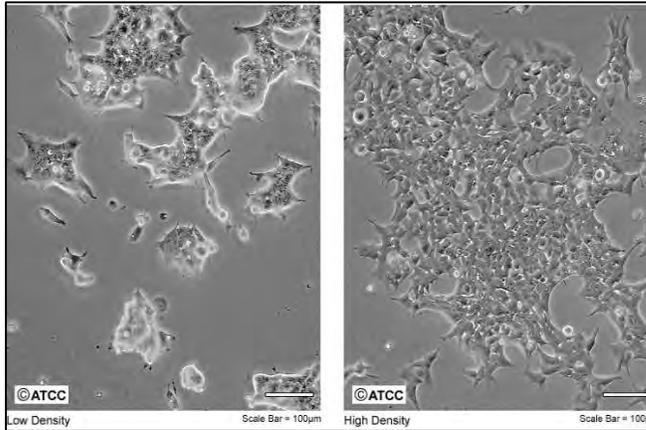


Figura S2. Ensayos de viabilidad celular con 500nM de 17-DMAG en líneas de carcinoma renal humano (786-O y ACHN) y línea normal (HEK-293T). Gráfica de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG con una concentración de 500nM. Se observa un comportamiento similar de las líneas de carcinoma renal humano: 786-O (azul) y ACHN (rojo) ante la inhibición de Hsp90 con 17-DMAG.

2. Líneas celulares

a) morfología de células HEK-293T: obtenidas del catálogo de la ATCC



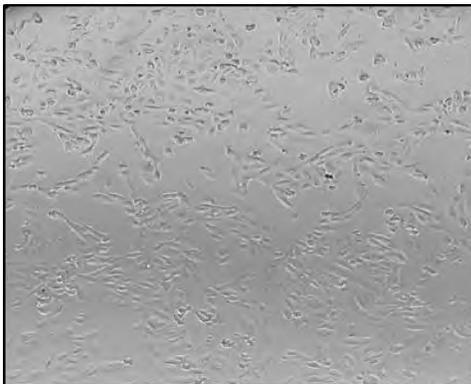
Organismo:	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido:	Riñón, embrionario.
Morfología :	Epitelial
Propiedades de cultivo:	Adherentes
Nivel de bioseguridad:	2 (Células que contienen adenovirus)

b) morfología de células 786-O: Fotografía a 10X en microscopio óptico compuesto.



Organismo:	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido:	Riñón.
Morfología :	Epitelial
Propiedades de cultivo:	Adherentes
Nivel de bioseguridad:	1 (Adenocarcinoma de células renales)

c) morfología de células ACHN: Fotografía a 10X en microscopio óptico compuesto.



Organismo:	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido:	Riñón, derivado de sitio metastásico.
Morfología :	Epitelial
Propiedades de cultivo:	Adherentes
Nivel de bioseguridad:	1 (Adenocarcinoma)

Tabla 3. Anticuerpos empleados en western blot

Anticuerpo (Ab)	Dilución	Anticuerpo secundario	Tipo de Ab	Incubación (tiempo)	Compañía	N° catalogo
Anti-Hsp90α	1:2000	Anti-Rb (Conejo)	Monoclonal	"Over-night"	Merck Millipore	05-594
Anti-Hsp90β	1:250	Goat (Cabra)	Policlonal	"Over-night"	Santa Cruz Biothecnology	Sc-1057
Anti-actina	1:1000	Acoplado a HRP	_____	1 h	Santa Cruz Biothecnology	0869100
Anti-human/mouse Caspasa 3	1:250	Anti-Ms (Ratón)	Monoclonal	"Over-night"	Affymetrix eBioscience	60-6663
Anti-PARP	1:500	Anti-Rb (Conejo)	Policlonal		Merck Millipore	AB16661
Anti-Hsp70	1:2,500	Anti-Ms (Ratón)	Monoclonal	"Over-Night"	Merck Millipore	386032
Anti-Mouse	1:10,000	_____	_____	1 h	Santa Cruz Biothecnology	Sc-2005
Anti-Rabbit	1:10,000	_____	_____	1 h	Merck Millipore	401353

Tabla 4. Preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE

Solución/ reactivo	Separador	Concentrador
H ₂ O	9.68 mL	1.9 mL
Acrid-Bis (29:1)	5 mL	415 µL
Tris HCl (1M)		315 µL
Tris HCl (1.5M)	5 mL	
SDS 10%	200 µL	25 µL
APS 10%	160 µL	45 µL
TEMED	20 µL	5 µL

Tabla 5. Preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% SDS-PAGE

Solución/ reactivo	Separador	Concentrador
H ₂ O	2.3 mL	1.9 mL
Acrid-Bis (29:1)	5.0 mL	415 µL
Tris HCl (1M)		315 µL
Tris HCl (1.5M)	2.5 mL	
SDS 10%	100 µL	25 µL
APS 10%	100 µL	27.5 µL
TEMED	4 µL	3 µL