



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Expresión de los genes HSP90AA1 y
HSP90AB1 en pacientes con carcinoma renal de
células claras y su implicación clínica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LIC. BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

BRENDA LARISSA CALVO HERNÁNDEZ

ASESOR:

Dr. Carlo César Cortés González

ASESOR INTERNO:

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Expresión de HSP90AA1 y HSP90AB1 en carcinoma renal de células claras y su implicación clínica.

Que presenta la pasante: **Brenda Larissa Calvo Hernández**

Con número de cuenta: **309073527** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Julio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|---------------------------------------|--------------|
| PRESIDENTE | Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo | |
| VOCAL | M. en C. Tais Nopal Guerrero | |
| SECRETARIO | M. en C. Maritere Domínguez Rojas | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. María Lucero Paniagua García | |
| 2do. SUPLENTE | L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cea*

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México con sede en el Instituto Nacional de Cancerología, durante el período febrero 2016 - 2017.

La presente tesis estuvo bajo la tutoría del Dr. Carlo César Cortés González y recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto de Ciencia Básica 243380. Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, porque ninguno de mis logros hubiera sido posible sin su esfuerzo, dedicación y apoyo. Gracias por ser esa ancla que me mantiene más allá de las corrientes.

A mi papá, por enseñarme el significado de realizar sacrificios y materializar la recompensa que viene con ellos. Porque contigo he aprendido que los errores son parte de ser humano y traen consigo un sinfín de aprendizaje.

A mis hermanas: Syaney, Gala y Frida, porque además de ser mi familia son las mejores amigas que alguien puede tener y han estado incondicionalmente para mí.

A Paola, Abraham, Jair y Alejandro, porque hemos logrado formar un verdadero equipo y siempre han estado para escucharme, apoyarme, aconsejarme o simplemente hacer que me olvide de un mal día. Gracias a ustedes la etapa universitaria ha sido de las mejores de mi vida y siempre la recordaré con mucho cariño y amor.

Al grupo de investigación al que pertenezco: Gaby, Aline, Octavio, Eduardo, Cristian y Rafael, porque además de ser mis compañeros de trabajo se han convertido en amigos y han contribuido notoriamente a mi crecimiento profesional desde el primer día que estuve con ustedes.

A mi compañera de laboratorio y amiga, Ilse Mariana porque sin su apoyo el proceso licenciatura-maestría hubiera sido más complejo de lo que imaginé. Gracias por el gran equipo que hemos formado.

A mi tutor, el Dr. Carlo César, por brindarme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación, los sacrificios que implica, sus recompensas y la audacia que se debe de tener para saber resolver problemas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de conocer lo que más me apasiona en ésta vida, siempre será un orgullo ser egresada de Nuestra Máxima Casa de Estudios, estaré a la altura de las circunstancias.

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 9 |
| Proteínas de Choque Térmico (Hsp) | 11 |
| Proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) | 14 |
| Dominios estructurales y funcionales de la proteína Hsp90..... | 15 |
| Co-chaperonas de Hsp90..... | 17 |
| HSP90AA1 y HSP90AB1 | 20 |
| Localización cromosómica de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 20 |
| Regulación transcripcional de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 | 21 |
| Hsp90α y Hsp90β | 25 |
| Expresión diferencial de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β | 25 |
| Diferencias bioquímicas entre isoformas de Hsp90..... | 25 |
| Interactoma de Hsp90 α y Hsp90 β | 27 |
| Hsp90 en cáncer. | 30 |
| Inhibición farmacológica de Hsp90 en cáncer | 32 |
| Hsp90α y Hsp90β en cáncer | 33 |
| El papel de Hsp90 en tumores genitourinarios..... | 34 |
| Cáncer Renal (Carcinoma de células renales) | 36 |
| Hsp90 en carcinoma renal | 39 |
| Antecedentes Directos | 42 |
| Objetivo General | 44 |
| Objetivos particulares | 44 |
| Hipótesis | 45 |
| Material y Métodos | 46 |
| Selección de pacientes y tratamiento de muestras | 47 |
| Análisis <i>in silico</i> de oligonucleótidos para la amplificación de los genes HSP90AA1, HSP90AB1 y 18s..... | 47 |
| Extracción de RNA total e integridad de muestras..... | 48 |
| Reacción en cadena polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)..... | 49 |
| Análisis semi-cuantitativo de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 49 |
| Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes | 50 |

| | |
|--|----|
| Resultados | 51 |
| Cohorte de pacientes diagnosticados con Cáncer Renal..... | 52 |
| Expresión del gen constitutivo 18S a partir de RNA total de tejido renal | 54 |
| Perfil de expresión de los genes Hsp90AA1 y Hsp90AB1..... | 56 |
| Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes | 60 |
| Discusión | 61 |
| Conclusiones | 70 |
| Bibliografía | 71 |

Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CD1 | Dominio de carga 1 |
| CD2 | Dominio de carga 2 |
| cDNA | DNA complementario |
| CR | Cáncer renal |
| CRcc | Carcinoma renal de células claras |
| CTD | Dominio Carboxilo terminal |
| D.O | Densidad Óptica |
| HIF-1 α | Factor inducible por hipoxia 1-alfa |
| HSF | Heat Shock Factor (Factor de choque térmico) |
| HSP90AA1 | Gen que codifica a la proteína Hsp90 alfa |
| HSP90AB1 | Gen que codifica a la proteína Hsp90 beta |
| Hsp | Proteínas de choque térmico |
| Hsp90 | Proteínas de choque térmico de 90kDa |
| kDa | Kilodalton |
| MAPK | Proteína cinasa activada por mitógeno |
| MD | Dominio medio |
| NFk- β | Factor nuclear kappa-beta |
| RCE | Respuesta celular al estrés |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa |
| TC | Tejido tumoral |
| TN | Tejido normal (área adyacente al tumor) |
| VHL | Von Hippel-Lindau |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de la subfamilia de las Hsp; miembros, localización y función intracelular..... | 11 |
| Tabla 2. Dominios estructurales y funcionales de la proteína Hsp90..... | 15 |
| Tabla 3. Principales características distintivas de cada miembro de la subfamilia de proteínas Hsp90..... | 18 |
| Tabla 4. Relación de número de copias entre RNAm de HSP90AA1/HSP90AB1 y proteína de Hsp90 α /Hsp90 β | 23 |
| Tabla 5. Vida media de RNAm y proteína de Hsp90 alfa y Hsp90 beta..... | 24 |
| Tabla 6. Principales diferencias en la expresión y función de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β | 28 |
| Tabla 7. Secuencias de primers para la amplificación de los genes 18s, HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 48 |
| Tabla 8. Variables clínicas en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal...54 | |
| Tabla 9. Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes..... | 60 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de Hsp90..... | 17 |
| Figura 2. Localización genómica de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 | 20 |
| Figura 3. Diagrama esquemático de intrones y exones en los genes HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 21 |
| Figura 4. Regulación transcripcional de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 23 |
| Figura 5. Interactoma y comparación de la ontología de genes de HSP90AA1 y HSP90AB1..... | 27 |
| Figura 6. Características de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal con base a género, I.M.C y edad del diagnóstico | 53 |
| Figura 7. Expresión del gen constitutivo 18S a partir de RNA total de tejido renal | 56 |
| Figura 8. Perfil de expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en tejido renal..... | 57 |
| Figura 9. Expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en área adyacente al tumor (TN) y área tumoral (TC)..... | 58 |
| Figura 10. Porcentaje de cambio de expresión de los genes de HSP90, respecto al área adyacente al tumor. | 59 |
| Figura 11. Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes | 61 |
| Figura 12. Niveles de RNAm y proteína de Hsp90 alfa y Hsp90 beta en condiciones fisiológicas, respuesta adaptativa al estrés y cáncer. | 67 |

I. Introducción

Introducción

El estrés celular puede ser definido como las restricciones del microambiente celular que difieren de las condiciones óptimas para una determinada célula, limitando el crecimiento y desarrollo adecuado de la misma (Waddington C.H. 1961). La respuesta celular encargada de intervenir cualquier condición de estrés es denominada respuesta celular al estrés (RCE), considerándose un mecanismo universal en todos los organismos, con una significancia fisiológica y fisiopatológica extensa. Muestra de ello, son las células y tejidos que se encuentran constantemente expuestos a condiciones extremas de estrés celular agudo o crónico, pudiendo alterar la homeostasis celular. Bajo estas condiciones de estrés, la viabilidad celular depende de los mecanismos que la célula sea capaz de desarrollar para responder a estas condiciones sub-óptimas, permitiéndole detectar y responder a las fluctuaciones de su ambiente celular, proceso evolutivo conocido como adaptación al estrés celular (Kültz D. 2005).

El genoma de todos los organismos, tanto procariontes como eucariontes, es capaz de modificar la expresión de proteínas de respuesta al estrés, responsables de mediar y determinar la adaptación o muerte celular. La RCE mediada por estas proteínas, incluye mecanismos fisiológicos que son capaces de detectar y resolver diversas condiciones de estrés celular, dentro de las que se encuentran: proteínas mal-plegadas, daño al DNA, inestabilidad en el estado óxido-reducción de la célula,

alteraciones en el ciclo celular y del metabolismo energético, entre muchas otras condiciones fisiopatológicas (Rodway G. *et al.*, 2003).

Durante la RCE, las células pueden cuantificar el estrés y activar un programa de muerte celular cuando se exceden los límites de tolerancia. La maquinaria de genes que principalmente se activa durante esta respuesta celular involucra forzosamente la expresión de proteínas chaperonas, dentro de éste grupo se encuentran las proteínas de choque térmico ó Heat Shock Protein (Hsp, por sus siglas en inglés) (Swindell *et al.*, 2007).

En 1962, Ritossa y colaboradores describieron por vez primera a las Hsp, encontrándolas en las glándulas salivares de un modelo de *Drosophila melanogaster*, reportándose años más tarde su presencia en todos los organismos vivos desde las bacterias hasta los seres humanos (Ritossa F. 1962). Actualmente las Hsp se consideran potentes amortiguadores del estrés celular, contra múltiples condiciones fisiopatológicas debidas a cambios del microambiente celular, e incluso por variaciones genéticas (Carey *et al.*, 2006).

Las propiedades citoprotectoras de las Hsp se encuentran estrechamente vinculadas a sus funciones primarias como chaperonas moleculares; lo que condujo a su designación como proteínas chaperonas (Calderwood *et al.*, 2006).

Proteínas de Choque Térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés, Heat Shock Protein), pertenecen a una familia proteica con un peso molecular que varía entre los 10 y 150 kDa. Clasificándose de acuerdo a su peso molecular aparente en kilodaltons (kDa) en 6 subfamilias: Hsp pequeñas, de bajo peso molecular (sHsp) (18-30kDa), Hsp40 (~40kDa), Hsp60 (~60kDa), Hsp70 (~70kDa), Hsp90 (~90kDa) y Hsp de alto peso molecular (>100 kDa). (Sreedhar AS, *et al.*, 2004). En la tabla 1, se describen los miembros pertenecientes a cada subfamilia de Hsp, indicando su localización intracelular mayoritaria y su función más estudiada.

Tabla 1. Clasificación de la subfamilia de las Hsp; miembros, localización y función intracelular

| Subfamilia | Miembros | Localización intracelular | Función |
|---------------|---|---------------------------|--|
| sHsp | Ubiquitina Hsp10 Hsp20-30 | C, N, y M | Degradación de proteínas, tolerancia al estrés oxidativo, co-factor de Hsp60. |
| Hsp40 | Hsp40 Hsp47 | C, N, y RE | Co-chaperona de Hsp72, plegamiento de proteínas. |
| Hsp60 | Hsp60 | C y M | Plegamiento de proteínas. |
| Hsp70 | Hsp72 Hsp73 mtHsp70 | C, M, y RE | Termotolerancia, plegamiento de proteínas, transporte de proteínas. |
| Hsp90 | Hsp90 α Hsp90 β TRAP-1 Grp94 Hsp90-N | C, M, RE, y N | Plegamiento y degradación de proteínas, interacción con receptores hormonales y factores de transcripción. |
| Hsp100 | Hsp104-110 ORP150 | C, N, RE | Termotolerancia, tolerancia isquémica. |

Abreviaturas: Citosol (C), mitocondria (M), retículo endoplásmico (RE), núcleo (N).

Como se observa en la Tabla 1, cada uno de los miembros de la subfamilia de las Hsp, tienen una función específica en el mantenimiento de la homeostasis celular. Dentro de la subfamilia de Hsp90, se encuentran dos tipos de miembros: los independientes de adenosin trifosfato (ATP) y los ATP dependientes. Las Hsp pequeñas (sHsp) son las encargadas de unirse a proteínas desnaturalizadas y evitar su agregación irreversible (Jacob *et al.*, 1993), mientras que Hsp40 se considera el principal controlador de la función de Hsp70, ambas chaperonas moleculares tienen una función independiente de ATP (Misselwitz B. *et al.*, 1998).

Dentro de las proteínas dependientes de ATP se encuentran: a) la subfamilia Hsp60, que funge como chaperona a nivel mitocondrial; b) la subfamilia Hsp90, que es una de las proteínas más abundantes en organismos eucariotas y su función no solo se ha limitado a la degradación y plegamiento de proteínas, sino que su diversa gama de sustratos o también denominadas proteínas “cliente”, como receptores de hormonas esteroideas y proteínas cinasas, han hecho que juegue un papel clave en la transducción de señales (Csemerly P. *et al.*, 1998).

La subfamilia Hsp100, es una familia de proteínas involucradas en la termotolerancia celular, además de asociarse con la capacidad de promover la proteólisis de algunas proteínas como la caseína (Lund P.A. 2001).

Las Hsp se han observado sobre expresadas en distintas patologías, un ejemplo son distintos tipos de tumores sólidos y malignidades hematológicas. Muchas proteínas

oncogénicas responsables de la transformación de células cancerosas son sustratos de la Hsp90, colocándola como una molécula clave en el entendimiento y tratamiento del cáncer (Mahalingam D. *et al.*, 2009).

Proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)

Las Hsp90 pertenecen a la superfamilia de ATPasa/cinasa, con dominio GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidine, Kinase, MutL), un grupo de proteínas que se caracterizan por tener una hendidura de ATP, además de ser la chaperona molecular más abundante en el citosol de las células eucariontes (Buchner J. 1999). La función molecular más estudiada y conocida de las Hsp90 es que actúan como moduladores alostéricos de sus proteínas “cliente”, las cuales pertenecen a diferentes familias de proteínas y no comparten estructura o funcionalidad similar. La función de Hsp90 está relacionada con su capacidad para hidrolizar ATP, ésta acción es regulada tanto por proteínas accesorias denominadas co-chaperonas, como por modificaciones post-traduccionales y regulación transcripcional (Pearl, 2016).

Actualmente se conoce que Hsp90 regula la maduración de más de 200 proteínas “cliente”, siendo las cinasas el grupo más grande de interacción con Hsp90 (Las proteínas “cliente” de Hsp90 pueden ser consultadas en www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf).

Las proteínas “cliente” de Hsp90 juegan un papel importante en procesos biológicos, donde Hsp90 actúa como regulador de diversos procesos celulares, tales como: mantenimiento de telómeros, transducción de señales, transporte vesicular, respuesta inmune, señalización de esteroides, muerte celular, homeostasis proteica, ciclo celular, y procesos de carcinogénesis (Rohl, *et al.*, 2013).

Dentro de las principales funciones celulares de Hsp90 se encuentran: asistir al plegamiento de proteínas inmaduras, proporcionar la conformación adecuada y evitar la agregación proteica, favorecer la translocación de sus proteínas “cliente” a organelos o a la membrana celular y nuclear, así como activar proteínas “cliente” a través de su fosforilación y/o dimerización (Cortés-González, C. *et al.* 2008).

Dominios estructurales y funcionales de la proteína Hsp90.

Para la comprensión de las funciones de Hsp90 es necesario conocer los dominios que conforman a la proteína y las funciones que desempeñan. Hsp90 se conforma de 5 dominios, de los cuales los principales o mejor estudiados son el dominio N-terminal, dominio medio y el C-terminal (Obermann *et al.* 1998). En la siguiente tabla se enlista de manera genérica los dominios y su respectiva función.

Tabla 2. Dominios estructurales y funcionales de la proteína Hsp90

| Dominios de Hsp90 | Función |
|--------------------------|--|
| Dominio N-terminal | Sitio de unión a ATP y a algunas co-chaperonas. |
| Dominio de carga 1 (CD1) | Influye sobre la unión de otras proteínas al dominio N-terminal. Facilita los re-arreglos intermoleculares de la proteína. |
| Dominio medio (MD) | Sitio de unión de las proteínas “cliente”. |
| Dominio de carga 2 (CD2) | No se encuentra funcionalmente definido. |
| Dominio C-terminal | Dominio de dimerización de Hsp90. |

Como se explicó anteriormente, la proteína Hsp90 tiene 3 principales dominios y obtiene su mayor actividad en conformación dimérica. El ciclo de Hsp90 es dependiente de la hidrólisis de ATP. En ausencia de unión a ATP, el dímero ocupa una

conformación en forma de “V” ó también llamada abierta, en la que se separan los dominios N-terminal y las dos subunidades se mantienen juntas a través del dominio C-terminal. El ATP se une al dominio N-terminal, estimulando el cierre de la molécula, para la posterior formación relativamente lenta de una conformación cerrada. Después de la hidrólisis de ATP, se produce un remodelado considerable para regenerar las formas abiertas de la proteína (*Figura 1*). El ciclo de ATPasa es relativamente lento en levaduras, donde Hsp90 hidroliza una molécula de ATP entre 1-2 minutos. Este ciclo de conformación difiere entre especies, pero sigue siendo crucial para la maduración de proteínas “cliente”. Los inhibidores farmacológicos clásicos de Hsp90; Geldanamicina y Radicol, se unen al sitio de unión de ATP en el dominio N-terminal (Leach *et al.*, 2012).

Para un correcto funcionamiento de este ciclo, varias co-chaperonas son necesarias, además de que la interacción entre las co-chaperonas se produce de manera ordenada y secuencial (*Figura 1*) (Li, *et al.*, 2011)

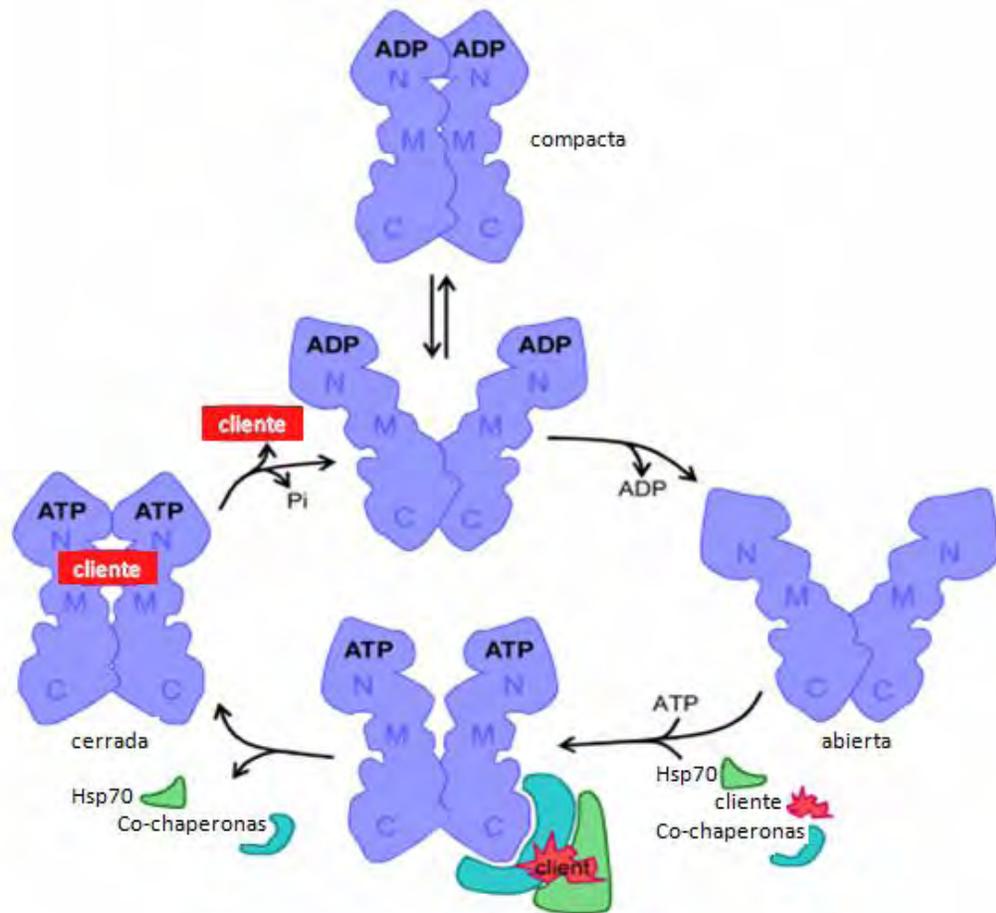


Figura 1. Ciclo de Hsp90. Hsp90 adquiere conformaciones dinámicas que varían cuando se encuentra con su ligando de ADP. Cuando los dominios N- terminal (marcados como N) se encuentran estrechamente asociados se dice que la proteína ha adquirido una forma “cerrada”, la cual es perdida con la liberación de ADP, adquiriendo una conformación “abierta”. La interacción con ATP está asociada a la participación de Hsp70, co-chaperonas y proteínas “cliente”. Esto es seguido por la lenta formación de un complejo cerrado y la liberación de Hsp70 y co-chaperonas. Finalmente, la proteína plegada “cliente” se libera y el ATP se hidroliza (Modificada de Li, *et al.*, 2011).

Co-chaperonas de Hsp90

Las co-chaperonas son proteínas de unión a las proteínas “cliente” de Hsp90 y participan libremente en la función de otras chaperonas moleculares. Se encargan de evitar la agregación de polipéptidos y se unen de manera simultánea que la proteína “cliente” a Hsp90; donde en muchas situaciones la unión de la proteína “cliente” a Hsp90 es dependiente de su interacción con co-chaperonas específicas. Algunas co-

chaperonas no interactúan con los polipéptidos de la proteína “cliente” y tienen una función reguladora. La funcionalidad de una co-chaperona radica en la elección de la proteína “cliente”, presentándola a Hsp90 y en la posterior coordinación del ciclo de unión y liberación de Hsp90 (Ciclo chaperónico de Hsp90 que será explicado posteriormente) facilitando el plegado del polipéptido o el desmontaje de la proteína (Caplan. 2003). La función principal de las co-chaperonas abarca 4 puntos; coordinación de la interacción entre Hsp90 y otros sistemas de proteínas chaperonas, simulación o inhibición de la actividad de ATPasa de Hsp90, reclutamiento de proteínas “cliente” de Hsp90 y actividad enzimática (Taipale, M. *et al.*, 2010).

La subfamilia de las proteínas Hsp90 está compuesta principalmente por cinco isoformas, en la Tabla 3, se enumeran los genes por los que son codificadas, nombre completo y la localización subcelular.

Tabla 3. Principales características distintivas de cada miembro de la subfamilia de proteínas Hsp90.

| Gen | Nombre completo | Proteína a la que codifica | Localización subcelular |
|-----------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| HSP90AA1 | Proteína de choque térmico de 90kDa alfa, clase A, miembro 1 | Hsp90 alfa Hsp86 | Citosol |
| HSP90AB1 | Proteína de choque térmico de 90kDa beta, clase B, miembro 1 | Hsp90 beta Hsp84 | Citosol |
| HSP90B1 | Proteína de choque térmico de 90kDa beta, miembro 1 | Grp94/96 | Retículo endoplásmico (RE), citosol |
| Trap1 | Proteína 1 asociada a receptor al receptor de TNF | HSP90L | Mitocondria |
| HSP90N | Proteína de choque térmico de 90kDa N | Hsp90N Hsp89αΔN | Membrana |

Como se observa en la Tabla 3, las Hsp90 se encuentran en el citosol, RE y mitocondria. La función de cada isoforma está relacionada con el compartimento celular en el que se encuentra. Por ejemplo, la proteína Grp94 codificada por el gen HSP90B1 al encontrarse en el RE sus proteínas “cliente” es distinta a la de otros miembros de la subfamilia de Hsp90. Las proteínas plegadas en el RE contienen pliegues distintos, en su mayoría compuestos por una gran cantidad de puentes disulfuro, además de ser dependientes del plegamiento oxidativo. Las cisteínas en estas proteínas tienden a oxidarse debido a que el lumen del RE es aproximadamente 30 veces más oxidante que el citosol; estas características hacen que las proteínas “cliente” de Grp94 sean específicas (Marzec M. *et al.*, 2012).

Las dos isoformas citosólicas más abundantes corresponden a Hsp90 α y Hsp90 β , codificadas por los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, respectivamente. En conjunto, Hsp90 α y Hsp90 β interactúan con aproximadamente el 10% del proteoma eucarionte (Zhao, R. *et al.*, 2005), lo que representa alrededor de 2,000 proteínas (Echeverría, P.C. *et al.*, 2011), de las cuales experimentalmente se han confirmado ~725 interacciones proteína-proteína (Taipale, M. *et al.*, 2014). Al ser ambas isoformas responsables de la maduración de las principales proteínas de señalización, como factores de transcripción, ubiquitinas ligasas y cinasas reguladoras, el interés en conocer cómo es que participan y regulan distintos procesos celulares, las ha sugerido como un excelente blanco terapéutico (Prodromou, C. 2016).

HSP90AA1 y HSP90AB1

Los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 codifican las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , respectivamente. Ambas isoformas son el resultado de la duplicación de genes de hace 500 millones de años. Existe una alta conservación dentro de ambas isoformas; sin embargo, las funciones de las chaperonas son distintas (Gupta, RS. 1995).

Localización cromosómica de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1

El gen HSP90AA1 se encuentra en el cromosoma 14q32.33 y traduce a la isoforma Hsp90 α , una proteína de 732 a.a, mientras que el gen HSP90AB1 se encuentra en el cromosoma 6p21.1, y traduce la proteína de choque térmico Hsp90 β de 723 a.a (Haase, M. *et al.*, 2016; Zuehlke, A. D. *et al.*, 2015). A continuación se muestra el esquema de localización para los genes HSP90AA1 y HSP90AB1.

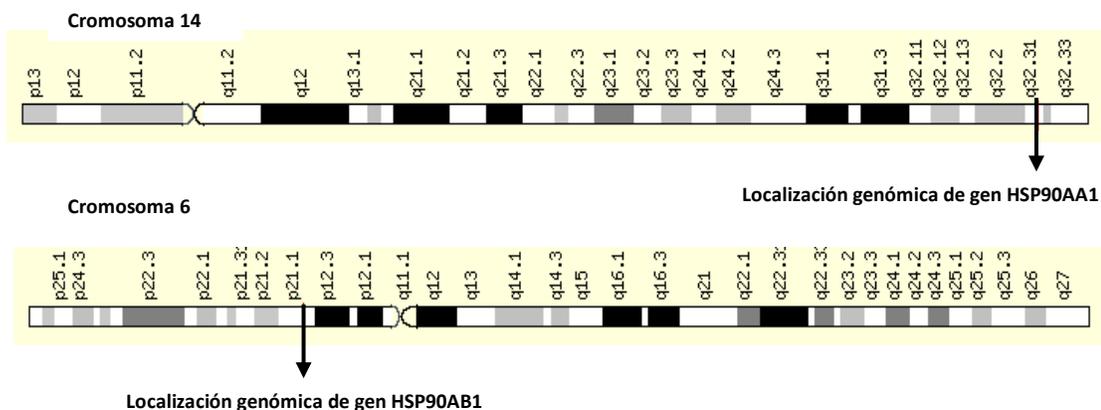


Figura 2. Localización genómica de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1. El gen HSP90AA1 que codifica la isoforma Hsp90 α se encuentra en el brazo largo del cromosoma 14 y el gen HSP90AB1, que codifica la isoforma Hsp90 β en el brazo largo del cromosoma 6. La localización genómica de los genes dentro de los cromosomas se indica con una flecha negra. (Imágenes tomadas y modificadas de www.genecards.org)

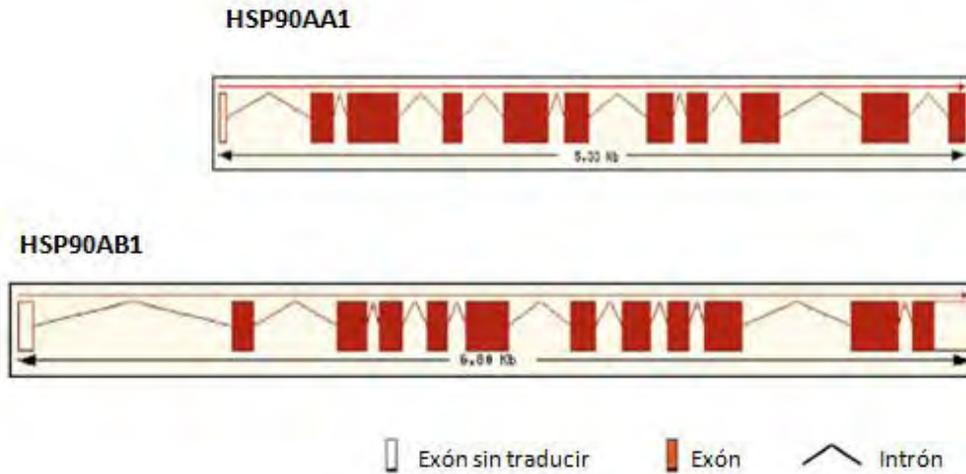


Figura 3. Diagrama esquemático de intrones y exones en los genes HSP90AA1 y HSP90AB1. El gen HSP90AA1 consta de 11 exones y 10 intrones, mientras que el gen HSP90AB1 está formado por 12 exones y 10 intrones. En ambas isoformas el primer exón no se traduce (Modificada de Zuehlke, A. 2015).

A pesar de que las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β poseen una alta identidad de aminoácidos, a nivel de nucleótidos Hsp90 α y Hsp90 β muestran cambios evidentes, especialmente en las regiones 3' y 5' no codificantes. Las diferencias en estas regiones no codificantes permiten la regulación específica de la expresión de Hsp90 α por diferentes factores de transcripción, dependiendo de las condiciones celulares, variaciones que divergen en las funciones específicas de cada proteína (Ver Tabla 4) (Haase, M., y Fitze, G. 2015).

Regulación transcripcional de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1

Los niveles de Hsp90 en la célula son dependientes de su regulador transcripcional HSF1-1 (Heat Shock Factor-1. Las proteínas HSF son las encargadas de regular la respuesta al choque de calor (HSR, Heat Shock Response) a través de la respuesta a distintos estímulos o estresores como: incremento de temperatura, infecciones

virales o estrés oxidativo (Sorger, P.K. 1991). Para que HSF-1 sea traslocado al núcleo debe de estar trimerizado y en estado fosforilado para posteriormente unirse con el elemento de choque de calor (HSE, Heat Shock Element) e iniciar la transcripción de los genes de HSP90; HSP90AA1 y HSP90AB1 (Ammirante, M *et al.*, 2008).

Los genes codificadores contienen secuencias de intrones y la traducción de ambos genes se encuentra en el inicio del segundo exón. Dentro del primer intrón de HSP90AB1, hay dos HSE típicos que son los responsables de mantener un alto nivel de expresión constitutiva, además de dos elementos HSE atípicos. Un tercer sitio se encuentra río arriba del sitio de inicio transcripcional. Por el contrario, HSP90AA1, posee dos HSE típicos inmediatamente río arriba de la caja TATA, dos sitios atípicos adicionales más arriba y otro sitio atípico dentro del primer intrón (Zhang, S.L *et al.*, 1999).

Los elementos HSE situados en los intrones de HSP90AB1, están estrechamente vinculados con HSF1 y parecen ser los responsables del mantenimiento del nivel constitutivo de la isoforma (Shen, Y *et al.*, 1997).

En la figura 4, se muestra el esquema de la regulación transcripcional de HSP90AA1 y HSP90AB1 en condiciones fisiológicas, donde hay una mayor expresión de la isoforma Hsp90 beta.

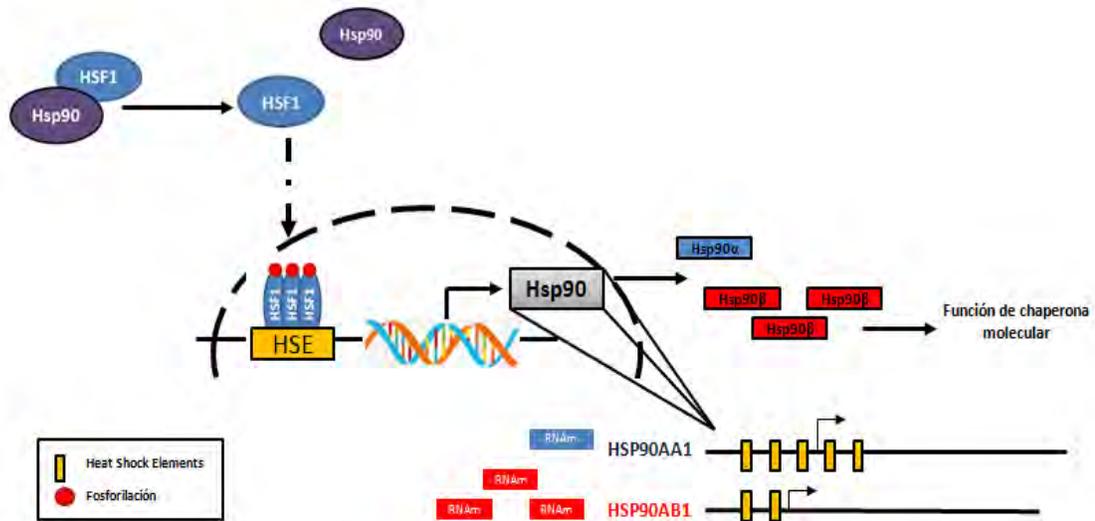


Figura 4. Regulación transcripcional de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1. HSF1 debe de encontrarse en conformación trimérica y en estado fosforilado para que sea traslocado al núcleo. Una vez en el núcleo forma un complejo con HSE que va dar lugar a la transcripción de los genes de Hsp90. En condiciones fisiológicas, existe una mayor proporción de HSP90AB1 que HSP90AA1, esta proporción se mantiene a nivel de proteína.

En un estudio realizado en 2008, se reportó el número de copias de RNAm y de proteína para las isoformas Hsp90 alfa y Hsp90 beta, así como el promedio de vida media de los productos, a nivel de transcrito y de proteína. A continuación se muestran las tablas donde se resume dicha información (Cox y Mann. 2008).

Tabla 4. Relación de número de copias entre RNAm de HSP90AA1/HSP90AB1 y proteína de Hsp90α/Hsp90β

| | No. de copias [moléculas/célula] |
|--------------------------|----------------------------------|
| HSP90AA1/HSP90AB1 | 1:3 |
| Hsp90α/Hsp90β | 1:3 |

Tabla 5. Vida media de RNAm y proteína de Hsp90 alfa y Hsp90 beta

| | Promedio de vida media de RNAm (h) | Promedio de vida media de proteína (h) |
|-------------------|---|---|
| Hsp90 alfa | 12.17 | 169.2 |
| Hsp90 beta | 19.09 | 77.4 |

Hsp90 α y Hsp90 β

Como se mencionó en el capítulo anterior, Hsp90 α y Hsp90 β son las proteínas citosólicas más abundantes de la subfamilia de Hsp90, aunque ambas proteínas comparten una identidad de 86% a nivel de aminoácidos, existen diferencias entre ellas que les confieren una funcionalidad exclusiva.

Expresión diferencial de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β .

La expresión de las isoforma Hsp90 α y Hsp90 β , se caracterizó por primera vez en células transformadas de ratón, donde se mostró que Hsp90 β se expresa de manera constitutiva, con un valor 2.5 veces más alto que Hsp90 α en condiciones fisiológicas. Sin embargo, tras el choque térmico, la expresión de Hsp90 α aumentó 7 veces contra 4,5 veces de Hsp90 β (Ullrich *et al.*, 1986).

Al ser Hsp90 α la isoforma inducible, una alta expresión de Hsp90 α se ha asociado en procesos que tienen lugar durante la carcinogénesis como progresión del tumor, regulación del ciclo celular y de factores de crecimiento mediados por la señalización a través de tirosinas quinasas. La expresión de Hsp90 β se ha asociado con el desarrollo de la resistencia a fármacos (Betram, J. *et al.*, 1996).

Diferencias bioquímicas entre isoformas de Hsp90

Una diferencia bioquímica importante entre las isoformas de Hsp90, es que la isoforma Hsp90 α dimeriza fácilmente, mientras que la isoforma Hsp90 β lo hace con una menor eficiencia. Hsp90 es principalmente un dímero constitutivo, encontrándose en ($\alpha\alpha$ ó $\beta\beta$); sin embargo, los monómeros (α ó β), heterodímeros

($\alpha\beta$) y oligómeros superiores de ambas isoformas también existen (Csermely, P. 1998). Aunque el potencial de dimerización reside en el extremo C-terminal, hay ciertas áreas en las secuencias de ambas isoformas que involucran una especificidad mayor y marcan la diferencia de la unión a la proteína “cliente” entre Hsp90 α y Hsp90 β . La especificidad de las isoformas no sólo se limita a un nivel bioquímico, el papel funcional de los dímeros de Hsp90 también cambia, principalmente en el desarrollo y diferenciación celular (Grammatikakis, N. *et al.*, 2002).

En condiciones fisiológicas, la proporción de la proteína Hsp90 α es menor en comparación con Hsp90 β , ya que mientras la primera constituye 40% de la proteína total citosólica de Hsp90, la segunda conforma el 60%. Ambas isoformas pueden encontrarse en forma monomérica, dimérica o heterodimérica. Sin embargo, Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimérica, mientras que Hsp90 β en forma monomérica. Cabe mencionar que la conformación dimérica de Hsp90 es la forma funcional (Cortés-González *et al.*, 2008).

Interactoma de Hsp90 α y Hsp90 β

En conjunto, Hsp90 α y Hsp90 β interactúan con aproximadamente el 10% del proteoma eucarionte (Zhao. *et al.*, 2005).

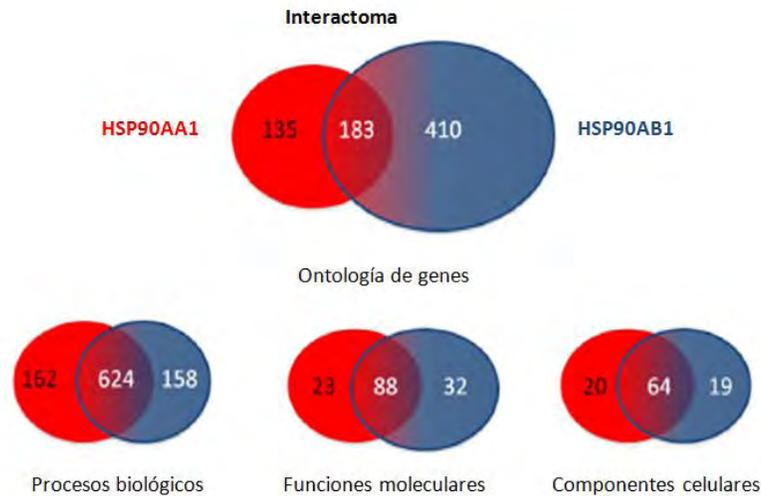


Figura 5. Interactoma y comparación de la ontología de genes de HSP90AA1 y HSP90AB1. En color rojo se aprecian las interacciones que corresponden al gen HSP90AA1, mientras que de color azul las de HSP90AB1. Los números dentro de cada conjunto representan las posibles interacciones proteína-proteína entre ambas isoformas y en la parte de abajo se indica el proceso en el que podrían estar involucrados (Modificada de Zuehlke, A. 2015).

En la realización del interactoma se observó que Hsp90 α y Hsp90 β interactúan con más de 725 diferentes proteínas, donde: (Taipale, M. *et al.*, 2010)

- Hsp90 α interactúa exclusivamente con 135.
- Hsp90 β se encuentra relacionada 410 proteínas.
- Ambas isoformas comparten interacción con 183 proteínas.

De acuerdo a los datos obtenidos, fue posible predecir las funciones únicas para cada isoforma, asociando la isoforma Hsp90 α con 162 términos únicos para procesos biológicos, una cantidad poco mayor que la isoforma Hsp90 β , que mostró 158

interacciones, ambas isoformas comparten 624 proteínas involucradas en procesos biológicos (Zuehlke, A. D. *et al.*, 2015).

Aunque la isoforma Hsp90 β interactúa con un mayor número de proteínas que su parólogo, Hsp90 α se asocia con mayores procesos biológicos, dato que resulta interesante si se toma en cuenta que Hsp90 α no es necesaria para los mamíferos, mientras que la presencia de Hsp90 β es esencial (Voss *et al.*, 2000; Grad *et al.*, 2010)

Los datos encontrados apoyan la idea de que los procesos biológicos asociados con Hsp90 β son más relevantes para el mantenimiento de la viabilidad, mientras que los procesos involucrados con Hsp90 α se relacionan con la adaptación al estrés y otras funciones especializadas (Zuehlke, A.D *et al.* 2015).

Tabla 6. Principales diferencias en la expresión y función de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β

| Isoforma | Funciones intracelulares | Estado de expresión |
|---------------------------------|--|----------------------------|
| Hsp90α | Promoción del crecimiento Regulación del ciclo celular Inducible por estrés Citoprotección | Inducible |
| Hsp90β | Desarrollo embrionario temprano Maduración de células germinales Estabilización del citoesqueleto Transformación celular Transducción de señales | Constitutiva |

El dominio carboxilo terminal (CTD) es el dominio de dimerización en ambas isoformas de Hsp90, sin embargo, en HSP90AB1 se encuentran residuos de 5 aminoácidos Met-Glu-Glu-Val-Asp (dominio MEEVD) que constituye una repetición tetratricopeptídica altamente conservada (TPR) que media la interacción con algunas proteínas co-chaperonas (Voss, AK,. 2000; Owens-Grillo, JK. *et al.*, 1996).

Hsp90 en cáncer.

El cáncer es un conjunto de enfermedades que abarca cambios sutiles como mutaciones puntuales hasta reordenamiento cromosómico. La característica más fundamental de las células cancerosas es su capacidad de proliferar excesivamente. Las células normales de mamíferos llevan una maquinaria molecular para regular con precisión su proliferación, crecimiento, diferenciación y muerte. Las células cancerosas, por el contrario, tienen defectos en los circuitos reguladores que rigen la proliferación celular normal y homeostasis (Miyata, Y. *et al.*, 2013).

Las proteínas “cliente” de Hsp90 incluyen una amplia variedad de moléculas transductoras de señales, como proteínas cinasas y receptores de hormonas esteroideas. La división y el crecimiento celular está regulado por distintas señales de transducción donde están involucradas varias proteínas cinasas, la formación de complejos Hsp90-proteínas “cliente” cinasas está profundamente involucrado en la proliferación y supervivencia de células cancerosas, dependiendo de la actividad chaperona de Hsp90.

Muchos factores promotores de cáncer dependen de Hsp90. Las células normales requieren de Hsp90, sin embargo cuantas más rápida es la proliferación, existe mayor dependencia de Hsp90. Es decir, las células cancerosas son adictas a Hsp90, mientras que las células normales dependen moderadamente de Hsp90. El ambiente tumoral está caracterizado por un metabolismo acelerado donde hay un alto consumo de

nutrientes y oxígeno, además de la generación de basura metabólica que reduce el pH del ambiente, donde Hsp90 actúa como un buffer bioquímico soportando condiciones de estrés que en un estado fisiológico serían letales para la célula (Kamal, A. *et al.*, 2004).

Distintas evidencias indican que Hsp90 y sus co-chaperonas, como la proteína del ciclo celular (Cdc37, por sus siglas en inglés), son requeridas para estabilizar un amplio rango de proteínas oncogénicas y mantener el crecimiento. La inhibición de Hsp90 conduce a la destrucción y reducción de la tasa de oncoproteínas asociadas a una amplia gama de tipos de cáncer (Gray, P.J. *et al.*, 2008) y (Trepel J *et al.*, 2010). Estos efectos son esencialmente debido a la habilidad de Hsp90 de contar con blancos de proteínas “cliente” oncogénicas. Por ejemplo, Hsp90 estabiliza los receptores del factor de crecimiento, la supervivencia de señalización de quinasas (tales como Akt y PI3K), oncogenes, (como v-Src, Bcr/Abl, Raf-1, ERB-2 y formas mutantes de p53) y las proteínas menos estables producidas por mutaciones en el DNA. (Taipale M., *et al.*, 2010).

Inhibición farmacológica de Hsp90 en cáncer

La inhibición farmacológica de Hsp90 resulta en la degradación proteosomal de proteínas “cliente” oncogénicas, dando lugar a una potente actividad anti-tumoral (Kamal, A y Burrows, F.J. 2004).

Se ha identificado el papel de Hsp90 en múltiples vías de transducción de señales y se ha observado que el mecanismo molecular de la selectividad del tumor por los inhibidores de Hsp90 es el resultado de una conformación activa con una alta afinidad de Hsp90 en tumores. La selectividad terapéutica de los inhibidores de Hsp90 es el resultado de la presencia de una alta afinidad por la forma activa de Hsp90 en tumores (conformación dimérica), formando un complejo multichaperónico con alta actividad de ATPasa. En condiciones fisiológicas, Hsp90 se encuentra poco activa, con baja afinidad y actividad de ATPasa. De esta manera, los inhibidores de Hsp90 desestabilizan diversas oncoproteínas en múltiples vías de señalización, lo que ha sugerido que la inhibición de Hsp90 podría ser una terapia blanco principalmente selectiva hacia células cancerosas en etapa tempranas y tardías del cáncer (Pearl, 2016).

Hsp90 α y Hsp90 β en cáncer

Un análisis sistemático de la expresión de proteínas HSP90AA1, HSP90AB1, co-chaperonas (Aha1, Cdc37, p23, TPR2) y el factor de transcripción dependiente de Hsp90 Heat Shock Factor (HSF), empleando 17 tipos de cáncer, sugirieron que la sobre-expresión es específica de tumor. Sin embargo, se demostró la sobre expresión de ambas isoformas HSP90AA1 y HSP90AB1 en más de la mitad de los tejidos (McDowell, CL. *et al.*, 2009).

Estudios previos en nuestro grupo de investigación (Datos por publicar) sugieren que el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β y sus co-chaperonas pueden ser usados en el diagnóstico y pronóstico del cáncer renal, así como en el uso de inhibidores de Hsp90 en tumores específicos del subtipo histológico de carcinoma renal de células claras.

Resulta de gran interés la relación entre los dímeros de Hsp90 α y Hsp90 β , que en condiciones de estrés cambian a favor de Hsp90 α , modificándose como consecuencia de una transformación favorable al fenotipo maligno en cáncer. Un análisis adicional reveló que Hsp90 está implicada en muchos procesos fundamentales en la oncogénesis, tales como la autosuficiencia en las señales de crecimiento, estabilización de proteínas mutantes, angiogénesis y metástasis (Whitesell, L. y Lindsquit, S.L. 2005).

El papel de Hsp90 en tumores genitourinarios

El papel de Hsp90 en tumores genitourinarios malignos ha sido descrito, abarcando las vías moleculares involucradas, ensayos clínicos con el uso de inhibidores de Hsp90 y el potencial del diseño farmacológico de un inhibidor específico de isoforma. En condiciones de estrés, Hsp90 ayuda a la reparación de las proteínas dañadas, restableciendo la homeostasis celular, logrando la interacción con sus proteínas “cliente” que participan en el desarrollo de tumores malignos genitourinarios. Algunas proteínas “cliente” de Hsp90 que participan son: receptor de andrógenos, Factor Inducible de Hipoxia (HIF-1 α), proteína cinasa B/Akt, Her2/Neu, C-met y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (Lattouf, J.B. *et al.*, 2006).

Se piensa que las mutaciones específicas en proteínas “cliente” de Hsp90 son mantenidas a través de amortiguamiento bioquímico que ocurre en la célula, incluso en un ambiente hostil (Whitesell, L. y Lindquist, S.L. 2005). La participación de Hsp90 en la tumorigénesis de diversos tipos de cáncer genitourinario es debido a la regulación, estabilidad y activación de diversas oncoproteínas “cliente”.

En cáncer de próstata, ensayos por inmunohistoquímica muestran que Hsp90 se expresa fuertemente en distintos grados Gleason. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la Geldanamicina y su derivado 17-AAG (inhibidores de Hsp90) causan la degradación de su proteína “cliente” el receptor de andrógenos, teniendo el mismo efecto en líneas celulares con el receptor de andrógenos silvestre que el mutado (Solit, DB. *et al.*, 2002).

Hsp90 evaluada por inmunohistoquímica en cáncer urotelial, se expresó en mayor medida en tejido canceroso que en tejido normal. (Lebret T. *et al.*, 2003). En éste mismo estudio se observó que los niveles bajos de expresión de Hsp90 encontrados en tumor se correlacionaron con un mal pronóstico. Utilizando los mismos métodos de detección en un estudio posterior se concluyó que la tinción de Hsp90 no se encuentra en tejido normal, mientras que en tejido tumoral correlaciona positivamente con el grado tumoral (Cardillo, M.R. *et al.*, 2000).

Cáncer Renal (Carcinoma de células renales)

Los carcinomas de células renales que se originan dentro de la corteza renal, son responsables del 80% al 85% de todas las neoplasias renales primarias. Dentro de los factores de riesgo para desarrollar cáncer renal se encuentran la edad, obesidad, hipertensión, daño renal crónico, tratamiento de diálisis y piedras en los riñones. Las enfermedades hereditarias también aumentan el riesgo, como el síndrome de Von Hippel Lindau, Birt-Hogg-Dubé y carcinoma renal papilar hereditario (Garfield, K. *et al.*, 2017).

Dentro de los subtipos histológicos de cáncer renal se encuentran el papilar, cromóforo y células claras, siendo el último el más común. (Rini, B.I. *et al.*, 2009)

Carcinoma renal de células claras (CRcc)

El carcinoma renal de células claras es la forma más común de cáncer renal, representa del 75% al 85% de los tumores. Los tumores de CRcc se caracterizan por estar altamente vascularizados y se encuentran dentro de los tumores renales más letales (Bohonowych, J. E. *et al.*, 2011). A nivel mundial se encuentra entre los 10 tipos de cáncer más común en hombres y mujeres, reportando aproximadamente 61,560 casos nuevos por año y 14,080 muertes (Ferlay, J. *et al.*, 2015).

Éste tipo de cáncer recibe su nombre porque al ser observado en el microscopio, las células que conforman el carcinoma renal lucen pálidas o totalmente claras (López, J.I. *et al.*, 2008).

Sistema de clasificación y diagnóstico

El grado Fuhrman es el sistema de clasificación más utilizado por los patólogos, éste sistema categoriza al CRcc en grados 1, 2, 3 y 4 basado en las características nucleares y representa uno de los pronósticos más significativos en pacientes de todas las etapas con CRcc.

El grado Fuhrman está estrechamente asociado con la supervivencia del paciente, los grados 1 y 2 muestran una tasa de supervivencia a 5 años. En tanto que los grados 3 y 4, demuestran tasas de supervivencia de sólo el 59% y 31% respectivamente. La mejora cualitativa del grado Fuhrman se ha correlacionado con el aumento de expresión de marcadores moleculares individuales, sin embargo, no se ha explorado un patrón global de expresión de genes relacionados directamente con el pronóstico del paciente (Czarnecka, A.M. *et al.*, 2014).

El diagnóstico del carcinoma renal en la mayoría de los casos se realiza mediante nefrectomía total o parcial para la obtención del tejido y el posterior análisis histopatológico. La expresión elevada de la proteína HIF-1 α y la fosforilación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFk- β) se han visto involucrados en la progresión de quistes y desarrollo del cáncer en el riñón (Wiesener, M.S., *et al.*, 2001).

La clasificación de tumores malignos (TNM) es un sistema que describe el estadio del cáncer originado de un tumor sólido acompañado de un código alfa-numérico. El CRcc entra en ésta clasificación.

- La letra **T**, describe el tamaño del tumor primario, el código empleado va de la letra x cuando el tumor no puede ser evaluado y de 1-4 dependiendo del tamaño y de la extensión del tumor.
- **N**, grado de diseminación a ganglios linfáticos, cuanto más grande es el número después de la N, más son los ganglios linfáticos que tienen cáncer.
- **M**, presencia de metástasis, ocupando el 0 cuando no hay presencia de metástasis y 1 cuando sí existe.

Hsp90 en carcinoma renal

En el 60% de los tumores de CRcc, el gen supresor Von Hippel-Lindau (VHL) se encuentra inactivado. La proteína VHL es un componente crítico de la vía de señalización HIF1- α , la cual sensa los cambios y niveles de oxígeno intracelular, regulando a su factor de transcripción HIF1- α , que facilita la adaptación a la hipoxia tisular, a través de la formación del complejo transcripcional del elemento de respuesta hormonal (HRE) y las subunidades HIF1- α y Hif1- β (Kaelin, W.G. 2004).

En condiciones fisiológicas, la proteína VHL está involucrada en la degradación de la subunidad HIF1- α , específicamente cuando el oxígeno es abundante. Las células deficientes del gen VHL, acumularán la subunidad α de HIF, por lo que la expresión de los genes regulados por HIF aumentará, incluidos diversos factores angiogénicos, jugando un papel importante en la tumorigénesis (Krieg, M., *et al.*, 2000). Al ser HIF1- α un participante importante en el desarrollo del CRcc dentro del contexto de pérdida de VHL, se ha empleado el uso de moléculas que modulen la expresión, transcripción, traducción, dimerización, transactivación, y la estabilidad de HIF (Bohonowych, J. E. *et al.*, 2011).

Las proteínas “cliente” de Hsp90 en Cáncer Renal, incluyen HIF-1 y HIF-2 que funcionan como factores de transcripción nuclear implicados en la transactivación de numerosos genes diana participando en la promoción de angiogénesis y adaptación a un ambiente hipóxico. La base molecular para la inestabilidad de estas proteínas en

normoxia depende de VHL, el componente de reconocimiento de sustrato de un complejo de ubiquitina ligasa E3 que se dirige a HIF-1 y HIF-2 para la degradación proteosomal (Maxwell et al., 1999).

La administración de inhibidores de Hsp90, se ha utilizado como agente anti-tumorigénico, por su capacidad para bloquear el plegamiento de la proteína, promueve su degradación y por lo tanto la supresión de su actividad transcripcional; es importante mencionar que nada de esto sería posible si HIF1- α no fuera una proteína "cliente" de Hsp90 (Isaacs, J.S. *et al.*, 2002; Majeesh, N.J. *et al.*, 2002; Katschinski, D.M. *et al.*, 2004).

II. Antecedentes directos

Antecedentes Directos

En el año 2010, nuestro grupo de investigación reportó que las isoformas citosólicas de Hsp90; Hsp90 α y Hsp90 β regulan de manera diferencial la cinasa Akt. El estudio fue realizado en la línea celular HEK-293T; correspondiente a células embrionarias de riñón, donde ambas isoformas fueron sobre expresadas y silenciadas. Estos datos mostraron por primera vez que Hsp90 α y Hsp90 β promueven cambios en la fosforilación de Akt, una cinasa clave en la vía de señalización Akt/mTOR/HIF1- α , que se caracteriza por estar desregulada en carcinoma renal (Cortés-González, C. *et al.*, 2008).

Siguiendo con la misma línea de investigación, estudios preliminares, donde se analizó la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en muestras de tejido renal de pacientes diagnosticados con CRcc, se encontró que los niveles de expresión de la proteína Hsp90 α identifica a un subgrupo de pacientes con menor sobrevida, teniendo una asociación directa en el perfil de expresión y activación de la vía de proliferación celular Akt/mTOR/HIF-1 α , mientras que la isoforma Hsp90 β se asoció a un mayor tamaño del tumor (Romero-Mandujano. Datos no publicados).

Considerando el papel de Hsp90 en la activación de la vía de adenocarcinoma renal, se propuso estudiar el comportamiento de las isoformas de Hsp90 a nivel de transcrito y saber si existía alguna implicación clínica en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal, además de que estos resultados preliminares podrían elucidar un posible mecanismo de regulación de las isoformas a nivel transcripcional.

III. Objetivos

Objetivo General

Obtener el perfil de expresión de los genes HSP90AA1 Y HSP90AB1 en tejido renal de pacientes con adenocarcinoma renal y evaluar su implicación clínica.

Objetivos particulares

- Establecer la cohorte de pacientes diagnosticados con CR, tomando en cuenta variables clínicas en CR: metástasis, progresión, recurrencia y tiempo de supervivencia.
- Determinar la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1; obteniendo la expresión relativa de cada isoforma normalizada con la expresión del gen control 18S mediante RT-PCR, a partir de la síntesis de cDNA del RNA total, proveniente de tejido tumoral y adyacente al tumor de cada paciente.
- Evaluar la correlación entre la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con las distintas variables clínicas en pacientes diagnosticados con CR.

IV. Hipótesis

La sobre expresión del gen inducible HSP90AA1 se asociará a un peor pronóstico en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal, mientras que la expresión del gen constitutivo HSP90AB1 no se verá afectada.

V. Material y Métodos

Selección de pacientes y tratamiento de muestras

Se incluyeron muestras de tejido renal; área adyacente (TN) y área tumoral (TC) de 20 pacientes, de acuerdo a los parámetros clínicos de inclusión: metástasis al momento del diagnóstico, progresión de la enfermedad, recurrencia y tiempo de supervivencia global.

Todos los pacientes fueron diagnosticados con CR en el Instituto Nacional de Cancerología y sometidos a nefrectomía. La recolección de muestras frescas se llevó a cabo durante el período 2013-2015, el tejido obtenido fue supervisado por un patólogo y preservadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Análisis *in silico* de oligonucleótidos para la amplificación de los genes HSP90AA1, HSP90AB1 y 18s.

Los *primers* para la amplificación de los genes HSP90AA1, HSP90AB1 y 18S fueron analizados utilizando la plataforma *PrimerBlast*. El apareamiento de los *primers* diseñados para el gen control 18S se realizó contra una secuencia de DNA genómico de *H. sapiens*, así mismos, los *primers* diseñados para la amplificación de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 se aparearon contra RNAm de *H. sapiens*. Es importante mencionar que los *primers* fueron previamente validados en el laboratorio, comprobando que el producto amplificado correspondiera a los genes de interés.

Los criterios de análisis para las secuencias de oligonucleótidos fueron los siguientes:

- Temperatura de fusión (T_m),
- Formación de dímeros u horquillas

- Formación de productos secundarios
- Complementariedad
- Baja afinidad específica en el extremo 3' (%GC 40-60)

Las secuencias de oligonucleótidos analizadas y el tamaño del producto esperado se especifican en la siguiente tabla:

Tabla 7. Secuencias de primers para la amplificación de los genes 18s, HSP90AA1 y HSP90AB1

| Gen | | Secuencia de oligonucleótidos | Amplicón (pb) |
|-----------------|--------------|-----------------------------------|---------------|
| 18S | Sentido | 5' ATG GCC GTT CTT AGT TGG TG 3' | 309 |
| | Anti sentido | 5' TCC TCG TTC ATG GGG AAT AA 3' | |
| Hsp90AA1 | Sentido | 5' TAT AAG GCA GGC GCG GGG GT 3' | 137 |
| | Anti sentido | 5' ACC TCC TCC TCC TCC ATG GGT 3' | |
| Hsp90AB1 | Sentido | 5' CGA GGG CGA TGA GGA TGC GT 3' | 138 |
| | Anti sentido | 5' GGG GAG CCA GGT GGG ACA GG 3' | |

Extracción de RNA total e integridad de muestras

El RNA total se extrajo de cada muestra de tejido renal; área adyacente al tumor (TN) y área tumoral (TC), empleando el reactivo Trizol de la marca Invitrogen. Para todos los tejidos se pesó la cantidad de 30-35 miligramos, el cual fue disgregado mecánicamente con un disruptor de tejidos. La pureza e integridad del RNA se examinó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, la concentración y radios de absorbancia 260/280 y 260/230 se determinaron en el TapeStation, por medio de ScreenTapes.

Reacción en cadena polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

A partir del RNA total extraído del tejido de riñón, TC y TN, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) por una reacción RT-PCR, siguiendo las especificaciones del kit SuperScript III Reverse *Transcriptase*, para luego comprobar la correcta obtención de cDNA utilizando el gen control 18S eucarionte.

Una vez obtenido el cDNA se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos sentido y antisentido para la amplificación del gen constitutivo 18S, el resultado fue un producto de 309 pares de base, aproximadamente. En el caso de los genes de interés se obtuvo un producto amplificado de 137 pb para la isoforma Hsp90 α y de 138 pb para la isoforma Hsp90 β .

Análisis semi-cuantitativo de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1

Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por densitometría en la plataforma *ImageJ*. La expresión de las isoformas de Hsp90 (Hsp90 α y Hsp90 β) de cada paciente fue ajustada con su gen control 18S, correspondiente a cada área renal.

Se realizaron gráficas de expresión absoluto TN y TC de cada paciente, gráficas de porcentaje cambio TN respecto a TC. Las isoformas fueron analizadas de manera independiente.

**Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1
con variables clínicas de la cohorte de pacientes**

La expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, junto con las variables clínicas de interés fue analizada con una correlación de Pearson, generando una matriz de datos. El intervalo de confianza utilizado fue del 95%.

VI. Resultados

Cohorte de pacientes diagnosticados con Cáncer Renal

Con la finalidad de conocer si existe alguna implicación clínica de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en adenocarcinoma renal se estableció una cohorte de 16 muestras de área adyacente al tumor (TN) y área tumoral (TC); proveniente de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal. De estos pacientes se tomaron características clínicas como: género, edad de diagnóstico e Índice de Masa corporal (I.M.C).

En la figura 6 se muestran las características clínicas de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal, con base a su género, edad de diagnóstico e I.M.C. En ella se observa que un 62.5% de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal fueron hombres, mientras que las mujeres representaron un 37.5%, teniendo una relación 2:1, aproximadamente.

De acuerdo al porcentaje de I.M.C fue posible clasificar a los pacientes en normal, sobrepeso, obesidad tipo I u obesidad tipo II; encontrando que un 42.8% de los pacientes presentaron sobrepeso, 7.1% obesidad tipo I, 14.2% obesidad tipo II y 35.75% se encontraron con un I.M.C normal.

Dentro de la cohorte de estudio, el grupo de pacientes más jóvenes fue de 20 a 30 años, curiosamente no hubo pacientes diagnosticados con CR de 31 a 40 años, teniendo una cohorte de pacientes mayor de 50 años. La mediana de edad a la que fueron diagnosticados los pacientes fue de 49 años.

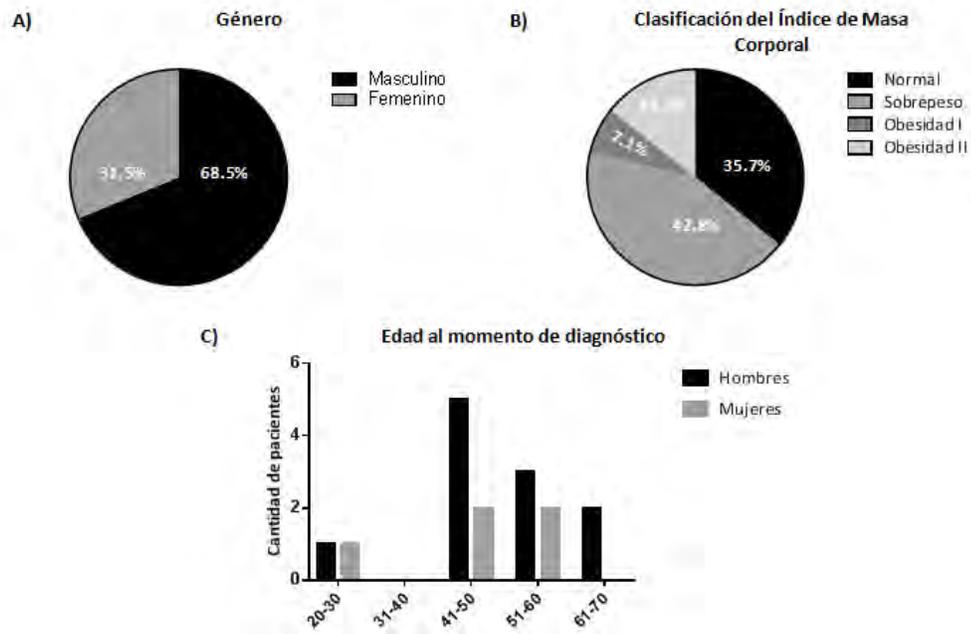


Figura 6. Características de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal con base a género, I.M.C y edad del diagnóstico A) Porcentaje de sexo de pacientes. En color gris se observa el porcentaje de pacientes de género masculino y en color negro el género femenino. B) Distribución de pacientes de acuerdo a su I.M.C. Color negro: Pacientes con un I.M.C normal, color gris claro: pacientes con sobrepeso, color gris: pacientes con obesidad tipo I y color gris pálido: pacientes con obesidad tipo II. C) Edad del diagnóstico. En el eje de las “x” se observa la cantidad de pacientes, mientras que en el eje de las “y” el rango de edad de diagnóstico. Las mujeres se indican con barras color gris y los hombres con barras color negro.

Las variables clínicas fueron recuperadas del Expediente Clínico Electrónico del Instituto Nacional de Cancerología, (INCANET).

Como parte del primer objetivo, se agruparon los pacientes de acuerdo a las variables clínicas de interés, que se sabe, son factores pronósticos en carcinoma renal, como:

- Clasificación TNM (Tamaño del tumor, presencia de nódulos y metástasis)
- Grado Fuhrman: grado de diferenciación de las células (1-4)
- Metástasis al momento de diagnóstico
- Progresión de la enfermedad, se consideraron los primeros 18 meses después de la nefrectomía
- Recurrencia de la enfermedad, + 18 meses
- Tiempo de sobrevida menor a dos años.

En la Tabla 8; Variables clínicas en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal, se enlistan los 16 pacientes incluidos en el estudio de asociación y las variables clínicas que se analizaron. Los pacientes que presentaron alguna de las variables clínicas, se indicaron con el código numérico 1, mientras que en los que no hubo presencia de variable se indicó el número 0.

Es importante mencionar, que el grado Fuhrman no fue tomado en cuenta porque la mayoría de los pacientes fueron grado 1 y 4.

Expresión del gen constitutivo 18S a partir de RNA total de tejido renal

Se realizó extracción de RNA por el método de Trizol y se comprobó la integridad por medio del bioanalizador TapeStation. El uso del bioanalizador permitió la obtención del número de integridad de RNA (RIN, por sus siglas en inglés), éste valor va del 1 al 10 y se basa en la cuantificación de productos de degradación del RNA a lo largo de

su migración electroforética. Los valores de RIN obtenidos estuvieron en el rango de 7.3 a 8.6.

Una vez cuantificado el RNA total y visualizada su integridad, se realizó una reacción de RT-PCR donde se obtuvo el producto amplificado del gen constitutivo 18S, de ~309 pares de bases (pb). Dentro de la cohorte, algunas muestras de pacientes fueron eliminadas mediante los siguientes criterios:

- Muestras contaminadas con sangre o grasa
- Baja eficiencia en la cantidad de RNA obtenido
- RNA contaminado con proteínas o reactivos

A continuación se muestra de manera representativa los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

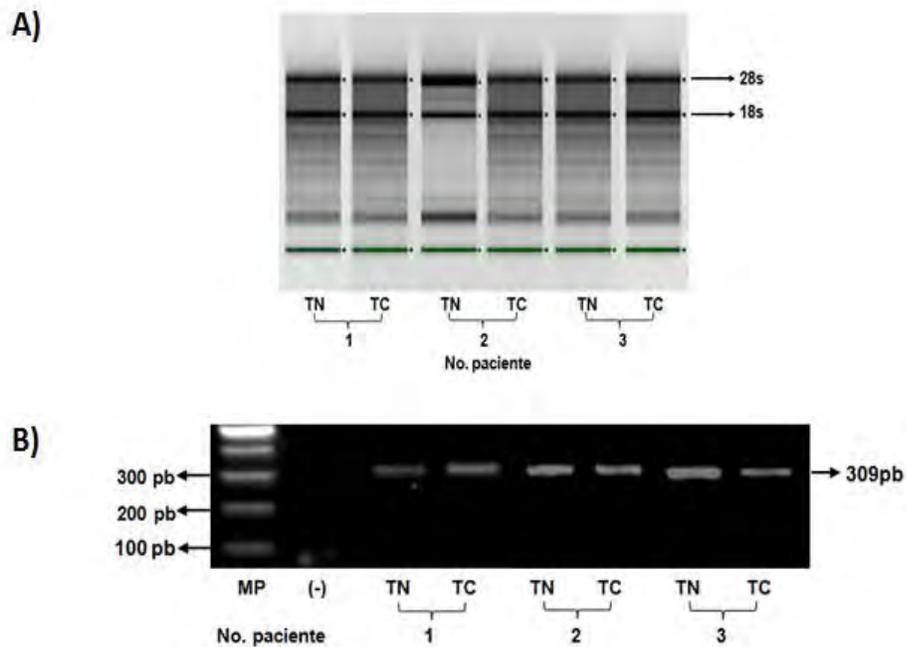


Figura 7. Expresión del gen constitutivo 18S a partir de RNA total de tejido renal. A) Integridad de RNA total a partir de tejido renal, área adyacente al tumor (TN) y área tumoral (TC). Imagen de gel del ScreenTape. En los seis carriles se muestra la integridad del RNA total en TN y TC para los pacientes 1, 2 y 3. Las subunidades ribosomales son indicadas en la parte derecha. B) Amplificación del gen 18S a partir de RNA total de tejido renal, TN y TC. Electroforesis en agarosa de muestras representativas. Carril 1, marcador de tamaño en pares de bases, carril 2, control negativo; y carriles 3-8, producto de RT-PCR amplificado de aproximadamente 309 pb correspondiente al gen control 18S. El rango de RIN fue de 7.3 a 8.6.

Perfil de expresión de los genes Hsp90AA1 y Hsp90AB1

La obtención del perfil de expresión de los genes Hsp90AA1 y Hsp90AB1 se realizó mediante el empleo de oligonucleótidos específicos para ambos genes, las secuencias son mostradas en el apartado de Material y métodos. A través de una reacción RT-PCR se obtuvo un producto de ~137 pb para el gen HSP90AA1 y ~138 pb para el gen HSP90AB1. En los productos amplificados para los genes de interés se observan

diferentes grados de intensidad en el bandeo, esto sugiere un perfil de expresión de isoformas distinto para cada paciente. El valor semi cuantitativo de la expresión de los genes fue obtenido en la plataforma *ImageJ*. Los valores densitométricos del área adyacente al tumor y área tumoral fueron ajustados respecto al gen control 18S.

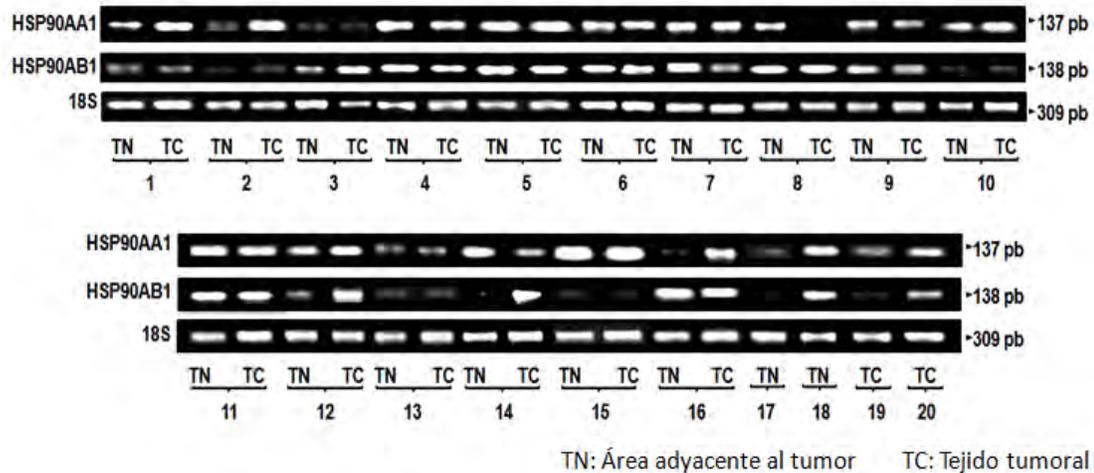


Figura 8. Perfil de expresión de los genes *HSP90AA1* y *HSP90AB1* en tejido renal. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio. Se muestran los productos amplificados para los genes *HSP90AA1*, *HSP90AB1* y 18S para cada paciente en las distintas áreas renales; área adyacente al tumor (TN) y tejido tumoral (TC). El tamaño en pb se indica en la parte derecha del panel, mientras que el número de paciente en la parte inferior.

Como se observa en la figura 9, en los pacientes 17,18, 19 y 20 no fue posible obtener RNA total de tejido renal; área adyacente al tumor o tumoral, según sea el caso, por lo que estas muestras fueron eliminados para el estudio de la expresión del los genes *HSP90AA1* y *HSP90AB1*.

Los valores densitométricos fueron analizados estadísticamente con una prueba de *t*, con el objetivo de saber en qué pacientes existía una diferencia significativa entre el área adyacente al tumor y el tejido tumoral. En la figura 10 se observan las gráficas

de expresión relativa de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en muestras de tejido renal de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal.

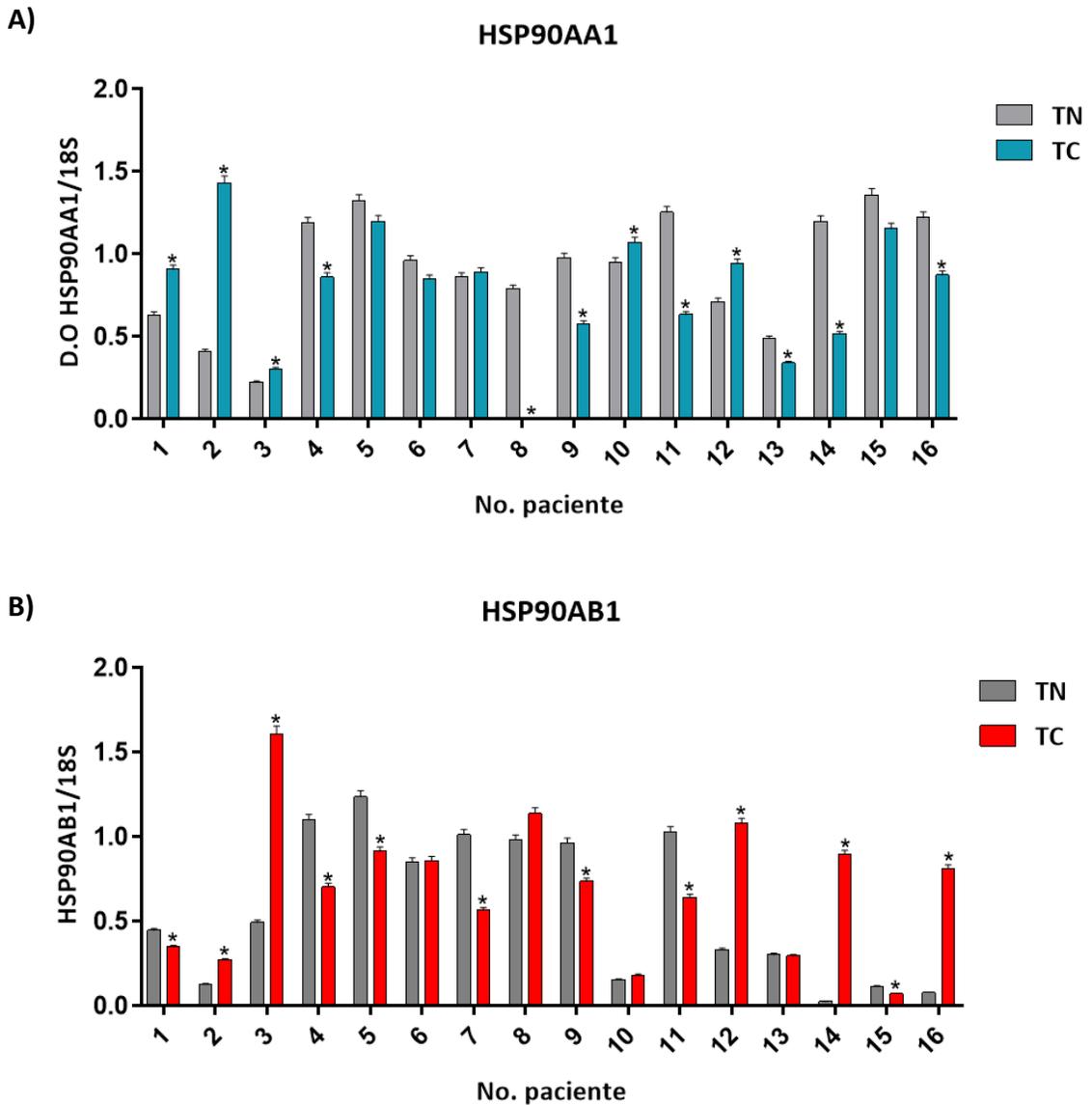
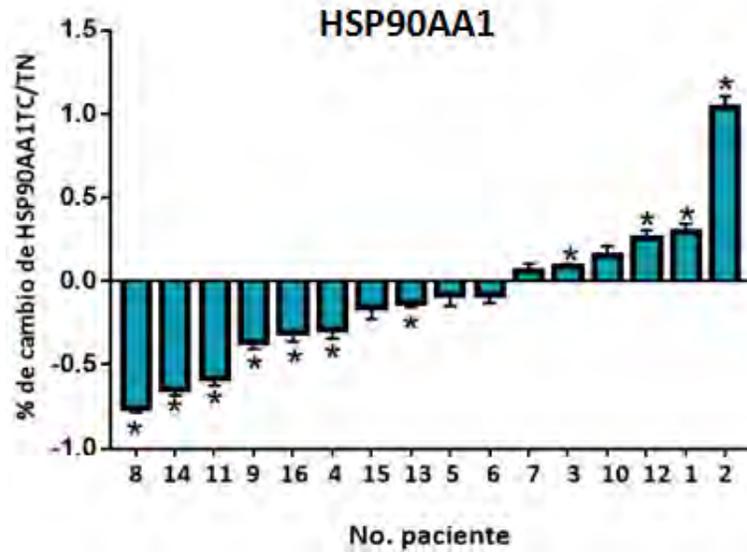


Figura 9. Expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en área adyacente al tumor (TN) y área tumoral (TC). A) Expresión del gen HSP90AA1 en tejido tumoral; barras color azul, comparadas con la expresión de HSP90AA 1 en área adyacente al tumor; barras grises. B) Expresión del gen HSP90AB1 en tejido tumoral; barras color rojo, comparadas con la expresión de HSP90AB1 en área adyacente al tumor; barras grises. *p< 0.05 vs expresión de área adyacente al tumor.

Como se muestran en la Figura 10, en la cohorte hubo pacientes donde la diferencia entre la expresión absoluta de los genes en TN y TC fue significativa, por lo que se realizaron gráficas del porcentaje de cambio de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, respecto al tejido tumoral de cada uno de los pacientes.

A)



B)

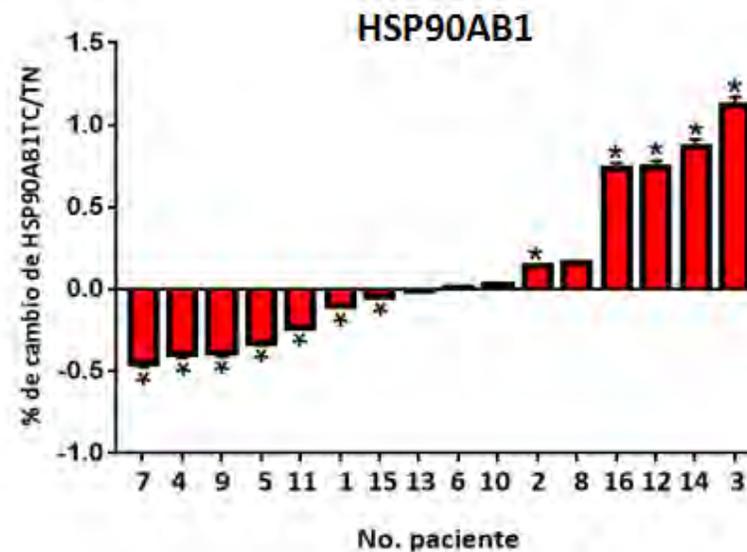


Figura 10. Porcentaje de cambio de expresión de los genes de HSP90, respecto al área adyacente al tumor. A) Porcentaje de cambio del gen HSP90AA1 en tejido tumoral respecto al área adyacente; barras color azul. B) Porcentaje de cambio del gen HSP90AB1 en tejido tumoral respecto al área adyacente; barras color rojo. *p<0.05

Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes

Con la finalidad de saber qué variables clínicas correlacionaban con la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 de manera independiente, se realizó una correlación de Pearson con una matriz de datos dentro de un intervalo de confianza del 95%. En la tabla 9 se observa el comportamiento de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 (aumento ó disminución) y las variables clínicas en las que se realizó el análisis.

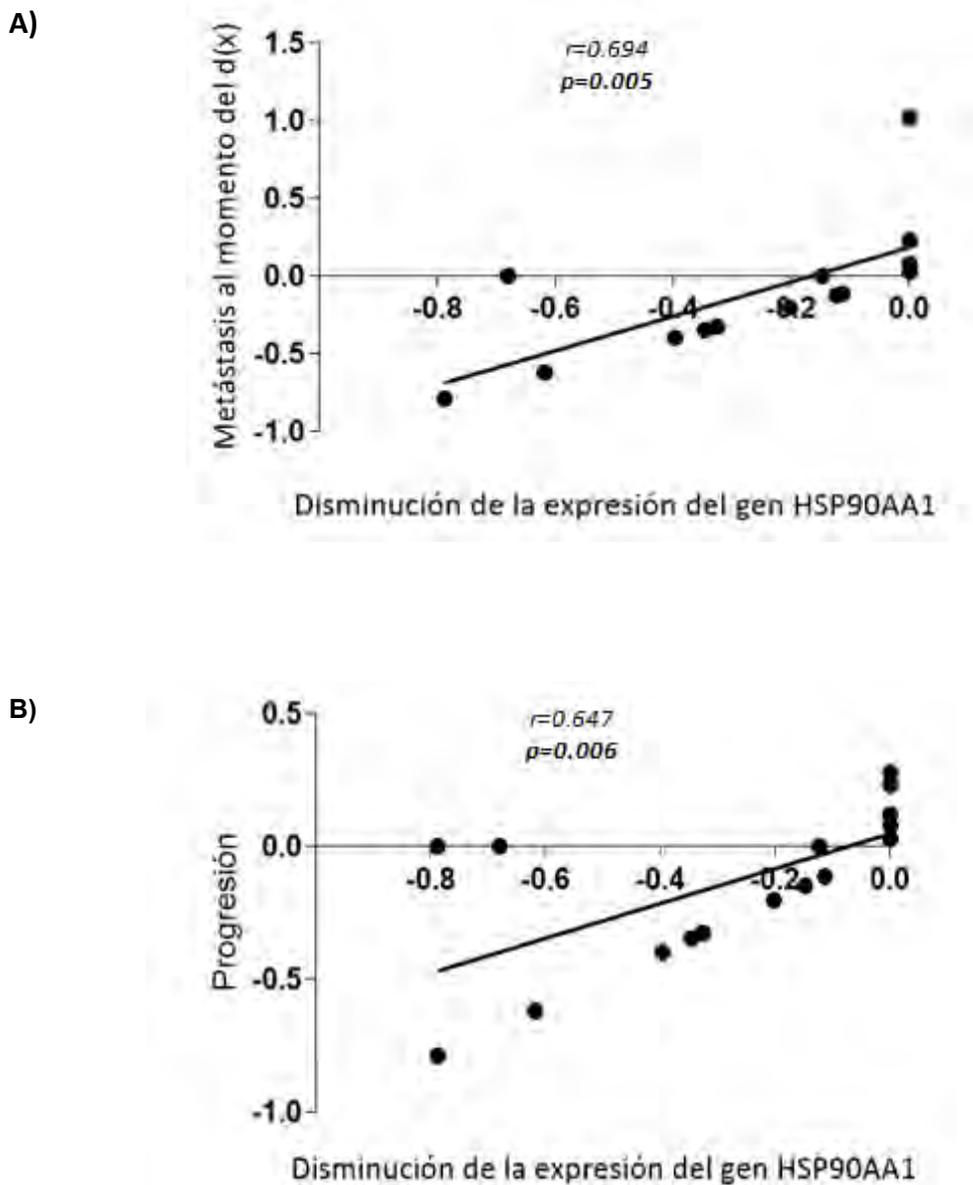
Tabla 9. Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes

| | Metástasis al momento del D(x) | Progresión | Recurrencia | Tiempo de sobrevida < 2 años |
|--|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| Aumento de la expresión de HSP90AA1 | $r=0.372$ $p=0.233$ | $r=0.226$ $p=0.457$ | $r=-0.308$ $p=0.613$ | $r=0.194$ $p=0.713$ |
| Disminución de la expresión de HSP90AA1 | $r=0.694$ $p=0.005$ | $r=0.647$ $p=0.006$ | $r=0.731$ $p=0.161$ | $r=0.389$ $p=0.266$ |
| Aumento de la expresión de HSP90AB1 | $r=0.315$ $p=0.447$ | $r=-0.157$ $p=0.645$ | $r=-0.038$ $p=0.928$ | $r=-0.038$ $p=0.928$ |
| Disminución de la expresión de HSP90AB1 | $r=0.358$ $p=0.348$ | $r=0.354$ $p=0.234$ | $r=0.064$ $p=0.881$ | $r=0.007$ $p=0.983$ |

*r= coeficiente de correlación de Pearson, p Value, *p< 0.05*

De acuerdo al análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, se encontró una correlación positiva y significativa para la disminución del gen HSP90AA1 y pacientes que presentaron metástasis al momento del diagnóstico,

al igual que para pacientes que progresaron. A continuación se muestran las gráficas de correlación para la disminución de HSP90AA1 y las variables clínicas significantes.



*Figura 11. Análisis de asociación de la expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 con variables clínicas de la cohorte de pacientes A) Disminución de la expresión del gen HSP90AA1 y metástasis al momento del diagnóstico. B) Disminución de la expresión del gen HSP90AA1 y pacientes que progresaron. * $p<0.05$*

VII. Discusión

En el presente proyecto de investigación se estudió la implicación clínica de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal.

El cáncer renal es uno de los cánceres con mayor incidencia a nivel mundial. El subtipo histológico más común es el adenocarcinoma renal de células claras, comprendiendo del 70-80% de los casos. La biología molecular del CRcc es la pérdida de función del gen supresor de tumores VHL, dirigiendo la estabilización del factor transcripcional HIF-1 α , que activa la transcripción de genes promotores de crecimiento celular y la sobre producción de factores angiogénicos (Nickerson ML, *et al.*, 2008).

En la mayoría de los pacientes, la primer línea de tratamiento es la nefrectomía; sin embargo, un alto porcentaje de pacientes sometidos a éste tipo de terapia, presenta recurrencia de la enfermedad (Sun M., *et al.*, 2011). Conocer la biología del CR, permitirá desarrollar nuevas terapias contra moléculas blanco; de igual forma, el descubrimiento de nuevos biomarcadores en CR puede ser útil en la identificación de la subpoblación de pacientes que pueden obtener un beneficio máximo de cualquier terapia.

Dentro de la vía activación de adenocarcinoma renal, aparece la proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90), que participa en la estabilización de sus proteínas “cliente”; como Akt, VHL y HIF-1 α , por lo que ha resultado atractivo pensar en su papel como biomarcador. Numerosos estudios han demostrado que Hsp90 se encuentra sobre expresada en tumores sólidos, y que la inhibición de la misma ejerce una terapéutica prometedora sobre ciertos tipos de cánceres; sin embargo, la

mayoría de estos estudios se han enfocado al conocimiento de las Hsp como una subfamilia de proteínas, siendo limitados los estudios que consideran el papel específico de las isoformas; Hsp90 α y Hsp90 β y aún más su relevancia a nivel transcripcional.

Como una primera aproximación para abordar el objetivo general del proyecto, se evaluaron las variables clínicas dentro de la cohorte de estudio, si bien, existen factores pronósticos que han sido reportados para CR, se quiso conocer el tipo de población estudiada y si existían diferencias con lo ya reportado.

Dentro de la cohorte de pacientes estudiada, se encontró una población mayormente masculina. En general, la incidencia del adenocarcinoma renal es de 1.6 a 2.0 veces mayor en hombres que en mujeres (Siegel R. *et al.*, 2013), en nuestra cohorte de estudio esta relación fue conservada. La razón de la alta incidencia en hombres aún no es clara, la genética, ocupación laboral, así como el fumar han sido implicadas (Jonasch, E. *et al.*, 2014).

Por otra parte, el Índice de Masa Corporal (I.M.C) que presentaron los pacientes fue elevado. Dentro de los factores de riesgo de adenocarcinoma renal se encuentran el sobrepeso y obesidad. Datos publicados en estudios observacionales, reportan que aproximadamente la mitad de los tumores renales está relacionado con obesidad y el riesgo de cáncer renal aumenta entre 25-30% por cada 5% de aumento del I.MC (Li, L. *et al.*, 2013). Por otra parte, un estudio donde se evaluó la asociación entre la metilación de 20 genes asociados a obesidad y adenocarcinoma renal, se encontró

que la hipermetilación del Receptor del Leptina (LEPR) está asociado a un alto riesgo de recurrencia del tumor en carcinoma renal (Mendoza-Pérez, J. *et al.*, 2017).

En la cohorte de pacientes, la mediana de edad de diagnóstico fue de 49 años. A nivel mundial, la mediana de diagnóstico es a los 62 años; sin embargo, la edad de diagnóstico ha ido disminuyendo en las últimas dos décadas.

Las Hsp *per se* se encuentran sobre reguladas en cáncer. Una forma de promover la supervivencia de las células cancerosas y la proliferación es mediante la estabilización de proteínas con mutaciones activadoras que de lo contrario serían degradadas. No es la primera vez que se asocia la expresión de las isoformas citosólicas de Hsp90 con algún parámetro clínico; sin embargo, si son los primeros reportes relacionados con adenocarcinoma renal.

En el presente proyecto de investigación se encontró que la disminución de la expresión del gen HSP90AA1 correlacionó positiva y significativamente con pacientes que presentaron metástasis al momento del diagnóstico y progresión de la enfermedad.

Al ser Hsp90 β la isoforma constitutiva, su expresión en condiciones fisiológicas es continua y en mayor proporción que Hsp90 α . Como se ha explicado anteriormente Hsp90 α es la isoforma inducible, que se va a expresar solamente en condiciones de estrés, lo anterior se justifica en que los elementos de choque térmico (HSE's) se localizan río arriba del promotor de Hsp90 α , lo que permite la inducción de su

expresión tras la unión del factor de choque térmico (HSF1), principal regulador transcripcional de Hsp90 (Zhang,S.L et al.1999).

En cáncer, existen distintos tipos de estrés como: daño al DNA genómico, mutágenos, radiaciones ionizantes y metabolismo oxidante. Además, el microambiente tumoral está soportado por el acondicionamiento de las células a un ambiente hostil, que les va a permitir sobrevivir y proliferar en condiciones de estrés cómo: hipoxia, deprivación de nutrientes y acidosis.

Antecedentes en nuestro grupo de investigación asociaron el aumento de los niveles de proteína de Hsp90 α con la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal; considerando que la elevación en la síntesis de proteínas puede estar dada por un aumento en la traducción del RNA mensajero y de acuerdo a los resultados obtenidos, donde la disminución de la expresión del gen HSP90AA1 se asocia a variables clínicas como metástasis al momento de diagnóstico y progresión; proponemos lo siguiente:

Durante la respuesta adaptativa al estrés, existe un aumento en los niveles de RNAm de HSP90AA1; esto se refleja en los niveles de RNAm obtenidos en el área adyacente; un tejido que no se encuentra en condiciones fisiológicas, pero tampoco ha pasado el umbral fisiopatológico para considerarse cáncer; donde en la mayoría de los pacientes se observó un aumento en los niveles de HSP90AA1. Con lo anterior, nosotros sugerimos que una vez que se lleva a cabo la adaptación celular al estrés,

los niveles de RNAm acumulados durante esta etapa, deben de ser traducidos para que Hsp90 cumpla con su rol funcional de chaperona molecular; amortiguando estos estímulos y favoreciendo la progresión del cáncer. Explicando la relación inversa entre el producto traducido de Hsp90 α y el RNAm de HSP90AA1, obtenidos en nuestro grupo de investigación.

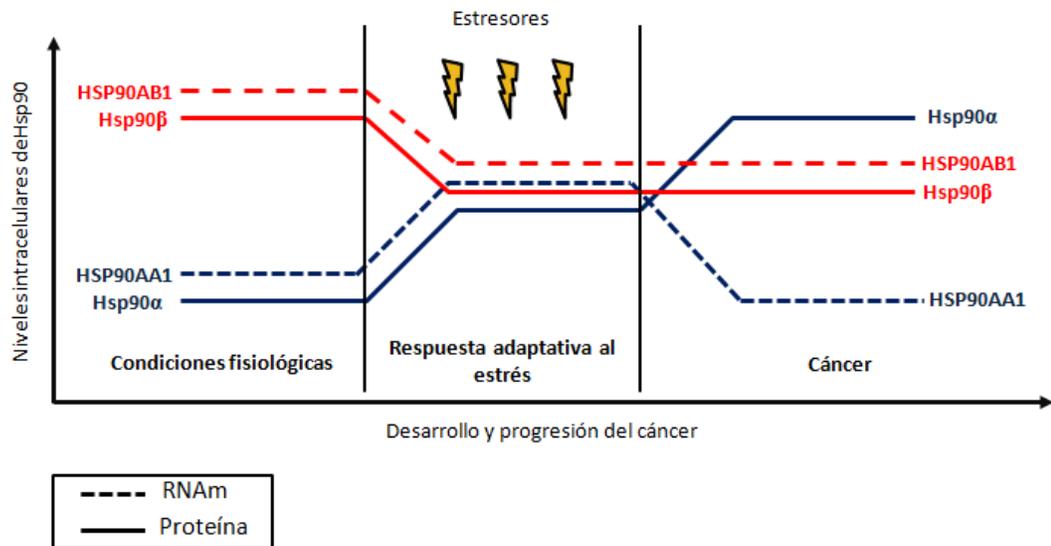


Figura 12. Niveles de RNAm y proteína de Hsp90 alfa y Hsp90 beta en condiciones fisiológicas, respuesta adaptativa al estrés y cáncer. En la figura se muestran tres contextos celulares: condiciones fisiológicas, respuesta adaptativa al estrés y cáncer. Los niveles de RNAm son indicados con una línea punteada, mientras que los niveles de proteína con una línea seguida. Hsp90 alfa es indicada de color azul y Hsp90 beta de color rojo.

En cáncer de origen genitourinario se ha observado que la inhibición de Hsp90 disminuye la motilidad celular y la angiogénesis, a través de interrumpir la función del factor transcripcional HIF1- α (Koga, F.et al. 2007). Específicamente en adenocarcinoma renal, la firma molecular es la inactivación bi alélica del gen supresor de tumores VHL, que resulta en la activación río abajo de HIF. Estos eventos resultan

en la activación de distintas vías de señalización que confieren un fenotipo agresivo y participan en la progresión del cáncer, un ejemplo es el aumento de receptores tirosin-cinasas, como el eje PI3K/Akt/mTOR, que desencadena procesos celulares asociados a metástasis, como proliferación, migración celular y la sobre producción de factores angiogénicos que van a favorecer la progresión del cáncer.

Se ha reportado que Hsp90 participa en la estabilización de Hif-1 α en condiciones de hipoxia, donde en vez de favorecer la degradación proteosomal, favorece su translocación al núcleo. Por otra parte Hsp90 también participa en la estabilización de la proteína VHL mutada, un importante sensor de normoxia que juega un papel crítico en el metabolismo tumoral.

En tumores sólidos, el gen HSP90AA1 es eliminado homocigóticamente, esta pérdida del gen se asocia con un nivel reducido de malignidad (Buffar, *et al.*, 2012), otros estudios informan que la ausencia de Hsp90 α en biopsias de tumor pueden servir como un biomarcador para resultados clínicos positivos (Gallegos *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2012).

VIII. Conclusiones

Conclusiones

- La disminución en los niveles de expresión del gen HSP90AA1 se asoció a las variables clínicas: 1) metástasis al momento del diagnóstico, y 2) progresión, en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal de células claras (CRcc).
- La expresión del gen HSP90AB1 no mostró resultados significativos que lo pudieran asociar con alguna variable clínica, mostrando 50% de los pacientes un incremento del gen y el otro 50% un decremento del transcrito, cuando se normaliza su expresión al tejido adyacente.
- En pacientes diagnosticados con CRcc, los niveles de RNAm y proteína de Hsp90 α , son inversamente proporcionales; sugiriendo que el incremento de RNAm se da durante una respuesta adaptativa al estrés fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer.

IX. Bibliografía

1. Ammirante, M., Rosati, A., Gentilella, A., Festa, M., Petrella, A., Marzullo, L., Pascale, M., Belisario, M.A., Leone, A. and Turco, M.C. (2008) The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NF-kappa B transcription factors. *Oncogene*. 27, 1175–1178
2. Bennetzen et al. (2010). Site specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Molecular & Cell Proteomics* 9 (6).1314–1323.
3. Biaoxue, R., Xiling, J., Shuanying, Y., Wei, Z., Xiguang, C., Jinsui, W., & Min, Z. (2012). Upregulation of Hsp90-beta and annexin A1 correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 31(1), 70.
4. Betram J, Palfner K, Hiddeman W & Kneba M. (1996).Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by Hsp90 beta. *Anti-cancer drugs*. 7 (8). 838-45.
5. Blank M et al. (2003) Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin. *Cancer Research* 63 (1). 8241–8247.
6. Bohonowych, J. E., Peng, S., Gopal, U., Hance, M. W., Wing, S. B., Argraves, K. M., & Isaacs, J. S. (2011). Comparative analysis of novel and conventional Hsp90 inhibitors on HIF activity and angiogenic potential in clear cell renal cell carcinoma: implications for clinical evaluation. *BMC cancer*, 11(1), 520.
7. Bose, S., Weik, I T., Bugl H. & Buchner,J.(1996).Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*. 274 (1). 1715-7.
8. Brugarolas J. (2007). Renal cell carcinoma-molecular pathways and therapies. *The New England Journal of medicine*. 356 (2). 185-187.

9. Buchner, J. Hsp90 & Co.—a holding for folding. (1999). *Trends Biochem. Sci.* 24, 136–141.
10. Calderwood, S.K., M.A. Khaleke, D.B. Sawyer & D.R. Ciocca. (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* 31: 164–172.
11. Caplan, A.J. (2003). What is a co-chaperone?. *Cell Stress & Chaperones.* 8 (2), 105–107
12. Cardillo MR, Sale P, Di Silverio F. (2000) Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. *Anticancer Res* 20: 4579–4583
13. Carey, C.C., Gorman, K.F. and Rutherford, S. (2006) Modularity and intrinsic evolvability of Hsp90-buffered change. *PLoS ONE* 1, 1-6.
14. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. (2013) Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.* 87(1):19–48.
15. Cortés-González, C, Ramírez-González V, Ariza & C, Bobadilla N. (2008). Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90kDa. *Investigación Clínica.*60 (4).311-320.
16. Cortés-González, C., Barrera-Chimal, J., Ibarra-Sánchez, M., Gilbert, M., Gamba, G., Zentella, A., & Bobadilla, N. A. (2010). Opposite effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(4-5), 657-668.
17. Csemely, P. et al. (1998). The 90kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology and therapeutics.*79 (2).129-168.

18. Czarnecka, A. M., Kukwa, W., Kornakiewicz, A., Lian, F., & Szczylik, C. (2014). Clinical and molecular prognostic and predictive biomarkers in clear cell renal cell cancer. *Future Oncology*, *10*(15), 2493-2508. During RCE, cells can quantify stress and activate a cell death program when stress exceeds tolerance limits
19. Chakraborty, A. et al. (2008) HSP90 regulates cell survival via inositol hexakisphosphate kinase-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 1134–1139
20. De Maio A. et al. (2012). Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society and a new journal. *Cell stress and chaperones*. *17*. 139-143.
21. Durkin, A.S et al. (1993) Assignment of an intron-containing human heat-shock protein gene (hsp90 beta, HSPCB) to chromosome 6 near TCTE1 (6p21) and two intronless pseudogenes to chromosomes 4 and 15 by polymerase chain reaction amplification from a panel of hybrid cell lines. *Genomics*. *18* (2). 452-454.
22. Duval, M, Le Boeuf F Huot J & Gratton P. (2007). Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase, *Molecular Biology Cell*. *18* (1). 4659–4668.
23. Echeverria PC, Bernthaler A, Dupuis P, Mayer B & Picard D (2011) An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. *PLoS ONE* *6*, e26044. 1-16.
24. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, *136*(5), E359-E386.
25. Garfield, K. Lagrange, CA. (2017). *Cancer, renal cell*. StatPearls Publishing, 28.

26. Grad, I., Cederroth, C. R., Walicki, J., Grey, C., Barluenga, S., Winssinger, N., De Massy, B., Nef, S. and Picard, D. (2010). The molecular chaperone Hsp90a is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. *PLoS ONE* 5, e15770.
27. Grammatikakis N, Vultur A, Ramana CV, Siganou A, Schweinfest CW, Watson DK, Raptis L (2002) The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *J Biol Chem* 277: 8312–8320
28. Gray, PJ et al. (2008). Targeting the oncogene and kinome chaperone CDC37. *Nature Reviews Cancer*. 8 (7). 491–495
29. Gupta, R.S. (1995). Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*. 12 (6). 1063-1073.
30. Haasse, M & Fitze, G. (2015) HSP90AB1: Helping the good and the bad. *Gene*. 575 (2). 171-186
31. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM: Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 2002, 27.
32. Jacob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268: 1517–1520
33. Jianming, W. et al. (2016). Heat Shock Proteins and Cancer. *Cell Press. Trends in Pharmacological Sciences*. 1-36
34. Jonasch, E., Gao, J., & Rathmell, W. K. (2014). Renal cell carcinoma. *The BMJ*, 349, g4797.

35. Kaelin, W. G. Jr. (2004) The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, S6290—S6295
36. Kamal A & Burrows FJ. (2004) Hsp90 inhibitors as selective anticancer drugs. *Discovery medicine.* 4 (23). 277-80
37. 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 Biochemical*
38. Kelland LR et al. (1999) DT-diaphorase expression and tumor cell sensitivity to 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90. *Journal National Cancer Institute.* 91: 1940–1949
39. Koga, F et al. (2007) Low dose geldanamycin inhibits hepatocyte growth actor and hypoxia-stimulated invasion of cancer cells. *Cell Cycle* 6, 1393-1402.
40. Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., & Plate, K. H. (2000). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 [alpha] and HIF-2 [alpha] under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene*, 19(48), 5435.
41. Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257
42. Lattouf, J. B., Srinivasan, R., Pinto, P. A., Linehan, W. M., & Neckers, L. (2006). Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nature Clinical Practice Urology*, 3(11), 590-601.
43. Leach, MD et al. (2012). Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during therma adaptation in a pathogenic yeast. *Plos pathogens.* 8 (12). 1-20.

44. Lebret T, Watson RW, Molinié V, O'Neill A, Gabriel C, et al. (2013) Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*; 98:970-7.
45. Lees-Miller, SP & Anderson CW. (1989) Two human 90 kDa heat shock proteins are phosphorylated in vivo at conserved serines that are phosphorylated in vitro by casein kinase II. *The journal of biological chemistry*. 264 (5).
46. Leppa, S & Sistonen, L. (1997). Heat shock response-pathophysiological implications. *Ann Med*, 29(1), 73-78.
47. Li L, Kalantar-Zadeh K. (2013). Obesity that makes kidney cancer more likely but helps fight it more strongly. *J Natl Cancer Inst*;105(24):1848- 9.
48. Li, J, Richter, K & Buchner, J. (2011). Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature Structure & Molecular Biology*,18(1), 61-66.
49. López, J. I., Ugalde, A., & Zhou, M. (2008). Carcinomas renales con células claras. *Revista española de patología*, 41(3), 169-182
50. Lund, P.A. (2001) *Molecular chaperones in the cell*. Oxford University Press, Oxford.
51. Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 1151-1191.
52. Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, Kaur B, Van Meir EG, Simons JW, Zhong H. (2002). Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002.

53. Mahalingam, D., Swords, R., Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Bhalla, K., & Giles, F. J. (2009). Targeting HSP90 for cancer therapy. *British journal of cancer*, 100(10), 1523
54. Martinez-Ruiz, L et al. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities, *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 102 (24).8525–8530.
55. Marzec, M., Eletto, D., & Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 774-787
56. Maruyama, T., Umezawa, A., Kusakari, S., Kikuchi, H., Nozaki, M., Hata, J. I. (1996) Heat shock induces differentiation of human embryonal carcinoma cells into trophectoderm lineages. *Exp. Cell Res.* 224: 123-127.
57. McDowell CL, Sutton R & Obermann WM. (2009). Expression of Hsp90 chaperone proteins in human humor tissue. *International of biological macromolecules.* 45 (3). 310-14.
58. Mendoza-Perez J, Gu J, Herrera LA, Tannir NM, Zhang S, Matin S, Karam JA, Wood CG, Wu X. (2017). Prognostic significance of promoter CpG island methylation of obesity-related genes in patients with nonmetastatic renal cell carcinoma. *Cancer*;123:3617–27.
59. Misselwitz, B., Staack, O. y Rapoport, TA (1998) proteínas J catalíticamente activan moléculas de Hsp70 para atrapar una amplia gama de secuencias de péptidos. *Cell Mol* , 2 , 593-603
60. Miyata, Y., Nakamoto, H. y Neckers, L. (2013). The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks. *Current pharmaceutical design.* 19 (3) 347-65.

61. Mollapour, M & Neckers, L. (2012). Post translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 1823 (3). 648-655
62. Nagaraju, G.P. et al. (2015) Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer. *Mol. Carcinog.* 54, 1147–1158
63. Neckers, L & Ivy, S.P. (2003). Heat shock protein 90. *Current Opinion in Oncology*, 15(6), 419-424.
64. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE. (2008). Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res.* 14:4726-4734.
65. Nimmanapalli, R et al (2003). Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic 5135.
66. Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU. (1998) In vivo function of Hsp90 is independent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143, 901-10.
67. Old W.M. et al. (2009). Functional proteomics identifies targets of phosphorylation by B-Raf signaling in melanoma, *Molecular & Cell Proteomics*. 34 (1). 115–131
68. Owens-Grillo JK et al. (1996). A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (23). 13468-75.

69. Ozawa, K., Murakami, Y., Eki, T., Soeda, E. & Yokoyama, K. (1992) Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromosomes 1, 4, 11, and 14. *Genomics* 12 (2). 214-220
70. Pearl, L.H. (2016). Review: The HSP90 molecular chaperone-an enigmatic ATPase. *Biopolymers*, 105(8), 594-607.
71. Prodromou, C. (2016). Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochemical Journal*, 473(16), 2439-2452.
72. Retzlaff et al. (2009) Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain, *EMBO Reports* 10 (10).1147–1153.
73. Rini, BI., Campbell, SC. y Escudier, B. (2009) Renal Cell carcinoma. *The Lancet*. Elsevier. 373.1119-1132.
74. Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573.
75. Rodway, G. W., Russell, M. F., Freer, L., Paton, B. C., Jacobs, M., & Van Tilburg, C. (2003). Exercise and Stress Response: The Role of Stress Proteins. *Wilderness & Environmental Medicine*, 14(3), 207.
76. Rohl A, Rohrberg J & Buchner J. (2013). The chaperone Hsp90: changing partners of demanding clients. *Cell Press*. 38 (5). 253-262.
77. Scheufler et al. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101 (2). 199-210.
78. Shen, Y., Liu, J., Wang, X., Cheng, X., Wang, Y. and Wu, N. (1997) Essential role of the first intron in the transcription of hsp90beta gene. *FEBS letters*. 413, 92–98
79. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63, 11–30, 10.3322/caac.21166.

80. Solit, DB. *et al.* (2002) 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts. *Clinical Cancer Research*. 8. 986–993.
81. Sorger, P.K. (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*. 65, 363–366
82. Sreedhar AS, Kalmár E, Csemerly P y Shen YF. (2004). Hsp90 isoforms: functions expression and clinical importance. *FEBS letters*. 562 (1-3). 11-5
83. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, Pantuck AJ, Zigeuner R, Karakiewicz PI: Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol* 2011, 60:644-661.
84. Swindell, W.R., Huebner, M. and Weber, A.P. (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC genomics* 8, 125-125.
85. Synoradzki, K & Bieganowski, P. (2015). Middle domain of human Hsp90 isoforms differentially binds Aha1 in human cells and alters Hsp90 activity in yeast. *Biochimica et Biophysica acta*. 1853 (2). 445-52
86. Taipale M *et al.*, (2012). Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 150, 987–1001.
87. Taipale M, Jarosz DF & Lindquist S. (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature Reviews. Molecular cell biology*. 11 (7). 515-28.
88. Thibodeau, B *et al.* (2015). Characterization of clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling. *Urologic Oncology*. 34 (4).
89. Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 10(8). 537–549.

90. Tsumuraya, M et al. (2010). A comprehensive analysis of genes involved in the malignancy of Gastrointestinal Stromal Tumors. *Anticancer Research. International Journal of Cancer Research and Treatment.* 30 (7). 2705-2715.
91. Ullrich, S.J., Robinson, E.A., Law, L.W., Willingham, M., and Appella, E. (1986). A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3118–3125.
92. Vara, J. Á. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2), 193-204-
93. Voss, A. K., Thomas, T. & Gruss, P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development* 127, 1–11
94. Urban, JD, Budinsky, RA & Rowlands JC. (2012). An evolution of single nucleotide polymorphism in the human Heat Shock Protein 90kDa alpha and beta isoforms. *Drug metabolism and Pharmacokinetics.* 27 (2). 268-272.
95. Voss AK, Thomas T & Gruss P. (2000). Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development.* 127 (1). 1-11
96. Waddington, C.H. (1961) Genetic Assimilation. *Advances in Genetics* 10, 257-293.
97. Webb CP *et al.* (2000) The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network. *Cancer Research.* 60: 342–349
98. Wen Si Zhu et al. (2016). Hsp90aa1: a novel target gene of miR-1 in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Scientific reports.*

99. Whitesell, S.L. and Lindquist. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 5 (10).761–772.
100. Wiesener, M. S., Münchenhagen, P. M., Berger, I., Morgan, N. V., Roigas, J., Schwiertz, A. & Frei, U. (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Cancer research*, 61(13), 5215-5222.
100. Yin et al. (2006). SGT, a Hsp90 β binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis. *Biochemistry Biophys Res Commun*. 343 (4), 1153-8.
101. Zhang, S.L et al. (1999). Regulation of human hsp90 α gene expression. *FEBS Letters*. 444 (1).130-135.
102. Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., Boone, C., Emili, A. and Houry, W.A. (2005) Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*. 120, 715–727 CrossRef PubMed
103. Zuehlke, A.D et al. (2015) Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*. 570 (1). 8-16.

Páginas web consultadas:

- International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. Recuperado de: <http://gco.iarc.fr/>
- National Institute of Cancer. Cancer Staging. United States of América. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>.
- www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf