



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Efecto del 17-DMAG sobre la expresión y conformación de las
proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata
normal y cáncer.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

CRISTIAN FREDY SOTO JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLO CESAR CORTÉS GONZÁLEZ

ASESOR DE TESIS

DRA. ISABEL SOTO CRUZ

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL CÁNCER DEL INSTITUTO
DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM CON SEDE EN EL
INSTITUTO NACIONAL DE CÁNCEROLOGÍA



FES ZARAGOZA, CD. MX., NOVIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Biomédica del Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología; bajo la dirección del Dr. Carlo César Cortés González y la asesoría de la Dra. Ma. Isabel Soto Cruz de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.



Agradecimientos

Al Dr. Carlo César Cortés González por permitirme desarrollarme en su laboratorio, asimismo por su orientación y enseñanza durante mi estancia en el laboratorio, y especialmente por tiempo que les dedica a sus alumnos.

A la Dra. Ma. Isabel Soto Cruz por brindarme su conocimiento, experiencia y tiempo que me ofreció durante su asesoría de este proyecto.

A la Mtra. Leonor Aguilar Santelises, a la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega y a la M. en C. Taide Laurita Arista Ugalde por su disposición y conocimiento que contribuyeron a la mejora de este trabajo.

A mi amigo Eduardo Aquino, con quien tuve la dicha de trabajar, por su gran ayuda y proveerme de líneas celulares, pero sobre todo por su compañía y amistad que me brindo.

A mis compañeros de laboratorio y las niñas de verano por compartir conmigo sus conocimientos, apoyo, tiempo, alegría y amistad.

“Todos somos genios. Pero si juzgas a un pez por su habilidad de trepar árboles, vivirá toda su vida pensando que es un inútil”

By Albert Einstein.

“Cada final es un nuevo comienzo, pero en el momento no lo sabemos”

Anónimo



Dedicatoria

Hoy que concluye una etapa más de mi vida y alcanzo una importante; quiero dar un reconocimiento a:

A mis padres Carmen y José, por todo que han guiado mis pasos por el buen camino y hecho de mi un hombre de bien, porque siempre han creído en mí y me han alentado a luchar para alcanzar mis metas. Cada desvelo y esfuerzo suyo, me han permitido conseguir este logro. Gracias por sus consejos y por su tiempo.

A mi hermana Brenda la fuente de mi inspiración, que me motiva a superarme y emprender nuevos retos, para poder ser su guía en la vida que apenas empieza.

A mi hermano Lalo por demostrarme que aún hay gente demasiado noble, pro ser un gran hermano, que a me ha hecho valorar tantas cosas.

A mi hermano Toño por ser mí mejor amigo, mi compañero en la vida, por hacer de mi infancia algo inolvidable. Por haberme dado el mejor regalo de la vida.

Gracias a mi familia, que a lo largo de todos estos años no ha dejado de apoyarme; ha estado en mis tristezas y también en mis alegrías.

A mis mejores amigos Javier y Toquero, por acompañarme en la gran etapa de mi vida como fue la universidad, por tantos años llenos de grandes momentos, por no solo ser mis amigos si no mis hermanos.

A Gladis mi mejor amiga, por apoyarme y estar ahí en momentos difíciles, por sus consejos, por compartir sus alegrías y tristezas.

A Erika, Ere, Moni y Jaque, que fueron mis compañeras en la última etapa de la carrera y a su lado esta fue mucho más amena y alegre.



A todos mis amigos del propedéutico y los que fui haciendo durante la carrera, con los que pase grandes días de locura, grandes tardes en una cancha de futbol, momentos increíbles y con los que tengo grandes anécdotas, siendo parte fundamental de mi vida a los largo de estos años y porque me demostraron que hay que aprender a vivir mientras aprendes a estudiar.

Por ultimo quiero compartirles:

“No se necesita mucha fuerza para aferrarse, se necesita mucha más fuerza para dejar ir”

J. C. Watts.

“I’m a shooting star leaping through the sky”

By Freddie Mercury



Índice

Índice	1
I. Índice de figuras	4
II. Índice de Cuadros	5
III. Abreviaturas	5
IV. Introducción	7
V. Marco Teórico	9
1. Proteínas de choque térmico (Hsp)	9
a) Generalidades.	9
b) Clasificación de las proteínas de choque térmico.	9
2. Proteína de choque térmico de 90kDa	11
a) Generalidades.	11
b) Proteínas de choque térmico de 90kDa, Hsp90 α y Hsp90 β	12
c) Co-chaperonas de Hsp90.	15
d) Proteínas “cliente” de Hsp90.....	16
e) Hsp90 y su implicación patológica.	19
3. Hsp90 en Cáncer	19
a) Participación de Hsp90 en los "Hallmarks" del cáncer.	20
b) Inhibición farmacológica de Hsp90 como terapia vs el cáncer. .	23
VI. Planteamiento del problema	29
VII. Hipótesis de trabajo	30
VIII. Objetivos	31



IX. Materiales y métodos	33
1. Reactivos y líneas celulares.....	33
2. Ensayo de migración (<i>Wound healing assay</i>).....	34
3. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG	35
4. Extracción de proteínas totales	35
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	35
6. Electrotransferencia de geles PAGE a membranas PVDF	36
7. Inmunoblot	36
8. Ensayos de Inmunofluorescencia	36
9. Análisis estadístico.....	37
X. Resultados	38
1. Perfil de expresión de Hsp90 α y de Hsp90 β en líneas celulares de tejido normal y de cáncer.....	38
2. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata	40
3. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	41
4. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata ..	43
5. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp70 y Hsp27 en líneas celulares de próstata.....	45



6. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de conformación monómero/dímero entre Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	47
7. Efecto de Hsp90i sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	48
XI. Discusión.....	51
1. Perfil de expresión de Hsp90 α y de Hsp90 β en líneas celulares de tejido normal y de cáncer.....	51
2. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata	52
3. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	52
4. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	53
5. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp70 y Hsp27 en líneas celulares de próstata.....	54
6. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de conformación monómero/dímero entre Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	54
7. Efecto de Hsp90i sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata	55
XII. Conclusiones.....	56
XIII. Perspectivas	58
XIV. Referencias.....	59



XV. Anexos73

I. Índice de figuras

Figura 1. Localización subcelular de las isoformas de la subfamilia Hsp90..... 12

Figura 2. Estructura de Hsp90 y sus principales dominios estructurales y funciones. 13

Figura 3. Ciclo del complejo chaperónico de Hsp90..... 14

Figura 4. Interacción de co-chaperonas con Hsp90, en N-terminal y su motivo MEEVD en el C-terminal. 16

Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer en México estimada en población masculina. 21

Figura 6. Diagrama de los Hallmarks del cáncer..... 22

Figura 7. Participación de proteínas “cliente” de Hsp90 en los “Hallmarks” del cáncer.... 23

Figura 8. Representación propuesta de la abundancia subcelular y conformación monómero/dímero de las proteínas Hsp90 en una célula normal y una célula de cáncer. 24

Figura 9. Estructura de los inhibidores de Hsp90..... 25

Figura 10. Inhibidores de Hsp90 desarrollados y tipo de cáncer evaluado..... 27

Figura 11. Comparación del efecto de Hsp90i sobre la necesidad o adicción hacia Hsp90 en una célula normal y una célula tumoral..... 27

Figura 12. Estrategia experimental..... 33

Figura 13. Perfil de expresión de la proteína Hsp90 en diferentes líneas celulares..... 39

Figura 14. Efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata..... 40

Figura 15. Efecto del Hsp90i sobre el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90 en líneas celulares PrEC y PC3..... 42

Figura 16. Perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90α y Hsp90β con el tratamiento (Hsp90i) en líneas celulares PrEC y PC3..... 44

Figura 17. Perfil de expresión con el tratamiento del inhibidor (Hsp90i) en líneas celulares PrEC y PC3. 46



Figura 18. Perfil de conformación monómero/dímero de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β 47

Figura 19. Efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β 49

II. Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación de las distintas familias de las proteínas de choque térmico. 10

Cuadro 2. Localización subcelular de la familia de proteínas de choque térmico. 10

Cuadro 3. Principales co-chaperonas de Hsp90 que participan en la formación de su complejo chaperónico. 15

Cuadro 4. Listado de algunas proteínas cliente de Hsp90. 17

III. Abreviaturas

17-DMAG: 17-dimetil-amino-etilamino-17-demetoxi-geldanamicina.

17-AAG: 17-alilamino-17-demetoxi-geldanamicina.

AG: Tanespimicina (17-AAG)

ATP: Adenosina trifosfato

BI: BIIB021

C-terminal: Carboxilo terminal

CaM: Cáncer de mama

CaP: Cáncer de próstata

Cdc37: DNA: Acido desoxirribonucleico

Ctrl: Control

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DM: Alvepimicina (17-DMAG)

D.O.: Densidad óptica

ERAD: Degradación de proteínas asociado a Retículo Endoplásmico

GA: Geldanamicina

GN: Ganetespib



Grp94:

Hsf-1: Factor de choque térmico-1

Hsp: Heat Shock Protein

Hsp90: Heat Shock Protein 90kDa

Hsp90i: Inhibidor de Hsp90

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IF: Inmunofluorescencia

IP: Restapimicina

KW: KW-2478

N: Línea celular no tumoral

N-terminal: Amino terminal

Native-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

nM: Nanomolar

NV: NVP-AUY922

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PU: PU-H71

RA: Receptor de andrógenos

RE: Retículo endoplásmico

RNA: Ácido ribonucleico

RP: Receptor de progesterona

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

sHsp: Small Heat Shock Protein

T: Línea celular tumoral

TEM: Transición epitelio mesénquima

TPR: Repetido de tetra-tri-co-péptido

Trap1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF

VHI: Virus de inmunodeficiencia humana

WB: Western blot



IV. Introducción

Las proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) son proteínas altamente conservadas filogenéticamente, ocupando en células de mamífero del 1-2% de la proteína citosólica total en condiciones fisiológicas¹. La familia de las proteínas Hsp90 está integrada por cinco isoformas, dentro de las cuales Hsp90 α y Hsp90 β comprenden el 80% en abundancia². Hsp90 α y Hsp90 β son denominadas isoformas inducible y constitutiva, respectivamente, debido a su abundancia en condiciones fisiopatológicas en relación a condiciones fisiológicas. En cáncer, la abundancia de Hsp90 α y Hsp90 β puede variar afectando vías de señalización, mediante su interacción diferencial con diversas proteínas, denominadas proteínas “cliente” de Hsp90. De esta manera, Hsp90 participa y regula sustancialmente cada uno de los “*Hallmarks*” del cáncer definidos por Hannahan y Weinberg³⁻⁶. Recientemente, Patel D. y colaboradores demostraron mediante un análisis *in silico* que las isoformas de Hsp90 se expresan y regulan proteínas “cliente” de manera específica para cada tumor en especial. Dicho evento depende de la necesidad de la célula tumoral hacia Hsp90, denominándosele “célula adicta a Hsp90”⁷.

En los últimos años, la inhibición de Hsp90 se ha propuesto como una estrategia terapéutica para el tratamiento contra el cáncer; resultando ser una estrategia inespecífica de isoformas de Hsp90. En este aspecto, algunos inhibidores de Hsp90, como el 17-AAG (17-N-alil-amino-17-di-metoxi-geldanamicina), han mostrado tener distinta afinidad para las isoformas de Hsp90. De igual manera, la inhibición de Hsp90 con el inhibidor 17-DMAG (17-dimetil-amino-etil-amino-17-di-



metoxi-geldanamicina) ha mostrado mayor afinidad por la conformación dimérica de las proteínas Hsp90^{7, 8}.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la abundancia (expresión), conformación (monómero/dímero) y localización subcelular de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β empleando células de tejido de próstata normal y tumoral. Con el fin de resaltar la importancia del perfil pre-existente de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , al dar la terapia con inhibidores de Hsp90, para una futura terapia específica de isoforma.



V. Marco Teórico

1. Proteínas de choque térmico (Hsp)

a) Generalidades.

Las proteínas de choque térmico o Hsp (por sus siglas en inglés, *Heat Shock Protein*), se encuentran constitutivamente expresadas en todos los organismos vivos tanto procariontes como eucariontes^{9, 10}.

A nivel celular, la sobre-regulación de las Hsp se presenta como una respuesta de adaptación al estrés. Dicho estrés celular puede ser generado por la exposición a radiaciones ionizantes, agentes tóxicos, a metales pesados, también por infecciones virales, estados febriles o inflamatorios, choque térmico, etc^{9, 11-14}.

b) Clasificación de las proteínas de choque térmico.

La familia de proteínas de choque térmico se clasifica en seis subfamilias con base en su peso molecular que va desde los 10kDa hasta los 110kDa (*Cuadro 1*).







En condiciones fisiológicas, la localización intracelular de las distintas Hsp es citoplasmica, mitocondrial y en retículo endoplásmico (*Cuadro 2*).

Las subfamilias se pueden agrupar en dependientes de ATP como las Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110, e independientes de ATP como las sHsp^{9, 13, 15}.

Cuadro 1. Clasificación de las distintas familias de las proteínas de choque térmico.

Subfamilia	Miembros de las Hsp	Masa molecular	Conformación (n-meros)	Funciones
Hsp110	Hsp105	≈100 kDa	Heptámeros	Inhibe agregación proteica (retención), trabaja en conjunto con Hsp70 ¹⁶⁻¹⁸ .
Hsp90	Hsp90α Hsp90β Grp94 Hsp90N Trap1	≈90 kDa	Oligómeros, Dímeros, monómeros	Plegamiento y estabilización de proteínas “cliente”, participación en la transcripción/ procesamiento de RNA, involucrado en recombinación y reparación del DNA, metabolismo ¹⁹⁻²² .
Hsp70	Hsp70 Hsp72 Grp78Bip Hsc70	≈70 kDa	Monómeros	Control de calidad en el plegamiento y estabilización de proteínas recién sintetizadas, protección de apoptosis y de agregación proteica ^{19, 23-26} .
Chaperoninas (Hsp60)	Cpn60 GroEL Hsp60	≈60 kDa	Tetradecámero	Ayuda al plegamiento de proteínas, actúa como señal de daño, confiere protección ante el stress ^{15, 16, 27} .
DNAJ (Hsp40)	Hsp40	≈40 kDa	Dímeros, monómeros	Sustrato de Hsp70, participación en degradación de proteínas, participación en el proceso retranslocación de degradación de proteínas asociado a Retículo Endoplásmico (ERAD) ^{16, 23} .
Hsp pequeñas	Hsp27 Hsp25 α-cristalina Hsp22 H11	15-30 kDa	Tetracosámero	Impide agregación de proteínas mal plegadas, ayuda en orientación de macroautofagia, interactúa con chaperonas de alto peso molecular ^{16, 23, 28} .

Cuadro 2. Localización subcelular de la familia de proteínas de choque térmico.

Proteína	Conformación	Localización	Dependencia de ATP
Hsp110		Citoplasma	Si
Hsp90		Citoplasma, Mitocondria, RE	Si
Hsp70		Citoplasma, Mitocondria, RE	Si
Hsp60		Citoplasma, Mitocondria	Si
Hsp40		Citoplasma	Si
sHsp		Citoplasma	No



2. Proteína de choque térmico de 90kDa

a) Generalidades.

Dentro de la familia de Hsp, la subfamilia más abundante y conservada es la Hsp90. La subfamilia Hsp90 representa el 1-2% de la proteína celular en eucariotas, siendo una proteína que se caracteriza por estar involucrada a nivel celular en: 1) Plegamiento de proteínas, 2) Translocación de proteínas a compartimentos celulares, 3) Degradación vía proteosomal de proteínas mal plegadas, 4) Regulación de la expresión génica, 5) Estabilidad y activación de proteínas, 6) Prevención de daño proteotóxico, 7) Inducción de respuesta inmune innata, 8) Presentación cruzada de antígeno, entre otras. En humanos, Hsp90 comprende cinco isoformas: Grp94 ubicada principalmente en retículo endoplásmico, Trap1 con localización en matriz mitocondrial, Hsp90N asociada a membrana; y las isoformas más abundantes: Hsp90 α y Hsp90 β ubicadas generalmente en citoplasma. Estas dos últimas isoformas comprenden el 80% de la subfamilia (*figura 1*)^{1, 6, 9, 29-42}.

En publicaciones recientes se reporta la presencia de Hsp90 en la superficie celular y en el espacio extracelular para llevar a cabo importantes funciones extracelulares como, promover la migración de queratinocitos, respuesta a estrés celular, alarma, regular la activación de MMP2, etc^{38, 43-48}.

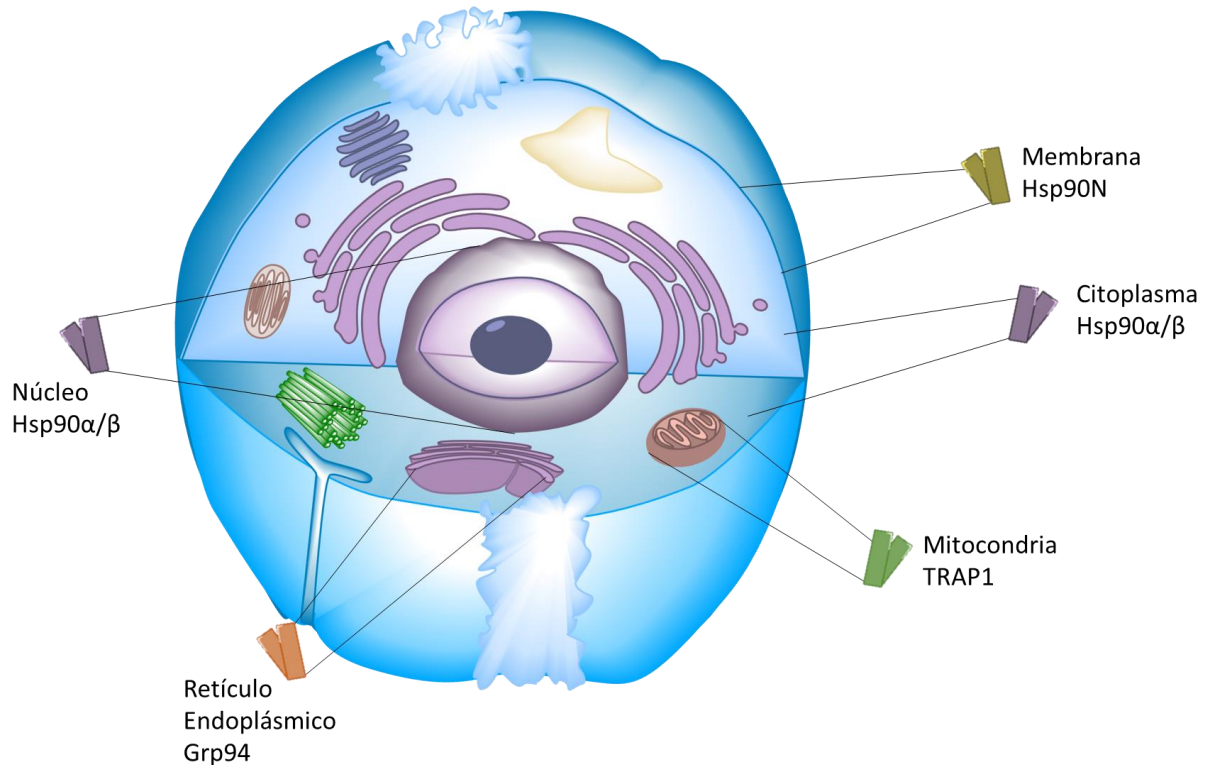


Figura 1. Localización subcelular de las isoformas de la subfamilia Hsp90. Hsp90 α/β se encuentra en núcleo y citoplasma, Hsp90N en membrana, Grp94 en retículo endoplásmico y TRAP1 en mitocondria.

b) Proteínas de choque térmico de 90kDa, Hsp90 α y Hsp90 β .

Las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β son el resultado de la duplicación de genes, esto hace aproximadamente 500 millones de años. Representan el 80% de la subfamilia de Hsp90, mantienen una identidad en su secuencia de aminoácidos del 85.9%. En condiciones fisiológicas Hsp90 β constituye una mayor proporción respecto a Hsp90 α , por lo que Hsp90 β se denomina isoforma constitutiva y Hsp90 α isoforma inducible. Las conformaciones estructurales que pueden presentar las Hsp90 son: monomérica y dimérica, esta última con una tendencia a asociarse en tetrámeros, hexámeros y oligómeros; dentro de las cuáles la conformación dimérica tiene mayor actividad. En este aspecto, Hsp90 α tiende a adoptar la conformación

dimérica; mientras que Hsp90 β abunda en su mayoría en conformación monomérica^{4, 29, 30, 39, 49, 50}.

La estructura tridimensional de las Hsp90 está conformada por una estructura conservada de 3 dominios: un dominio amino terminal de aproximadamente 25 kDa (N-terminal) que contiene un motivo de unión a co-chaperona y un bolsillo de unión al ATP; así como una región de carga responsable de la flexibilidad y estabilidad de la conformación; un dominio medio con sitio de unión a co-chaperonas y unión a proteínas “cliente”; un dominio carboxilo terminal de aproximadamente 55 kDa (C-terminal) donde se encuentra el motivo de dimerización y la secuencia conservada MEEVD (que es reconocida por Hsp70) (figura 2)^{29, 30, 44, 51-53}.

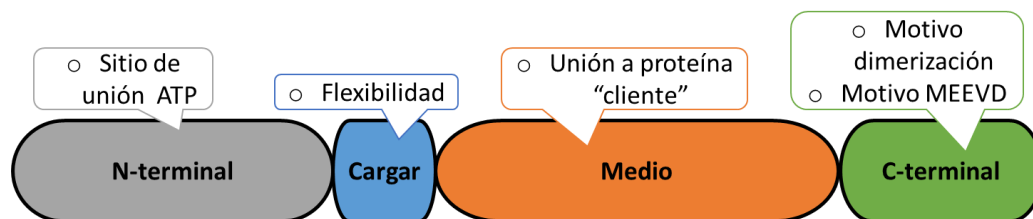


Figura 2. Estructura proteica de Hsp90 y sus principales dominios estructurales y funciones. En los recuadros se indica la función de cada dominio de Hsp90.

Hsp90 es una chaperona molecular que interviene en numerosos procesos celulares como: ciclo celular, proliferación, supervivencia, procesos apoptóticos, señalización hormonal y respuesta al estrés, resultando ser una molécula clave en el mantenimiento de la homeostasis celular^{51, 54-58}.

Además de participar en procesos celulares, también tiene un papel importante en la homeostasis proteica: plegamiento, maduración y translocación de proteínas “cliente”; incluyendo la activación de las mismas al facilitar su fosforilación y/o dimerización, o en su defecto, favorecer su degradación vía proteosomal^{4, 29}.

Asimismo Hsp90 es una chaperona que tiene funciones dependientes e independientes de la hidrólisis de ATP. Durante el ciclo de ATPasa adopta conformaciones de estructuras abiertas y cerradas, estas conformaciones son importantes para la estabilización de las proteínas “cliente”. La actividad de ATPasa de Hsp90 es modulada por su interacción con otras proteínas llamadas co-chaperonas, dando lugar a un complejo multi-proteico denominado complejo chaperónico de Hsp90 (figura 3)^{6, 44, 51, 59, 60}.

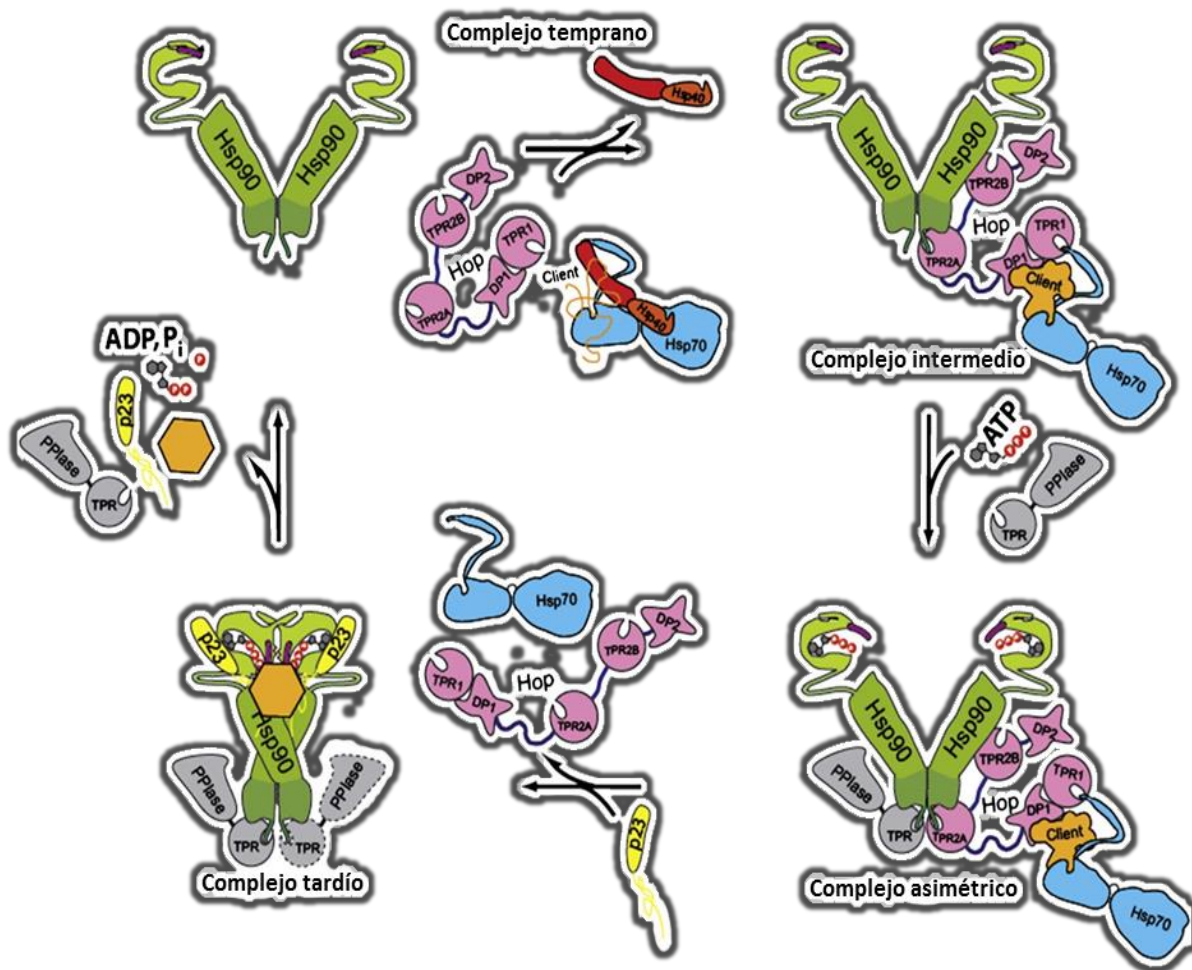


Figura 3. Ciclo del complejo chaperónico de Hsp90. Tomada de Jin Li et al. 2012. Ciclo representando el plegamiento de una proteína “cliente” y la participación del complejo chaperónico de Hsp90.

c) Co-chaperonas de Hsp90.

Las co-chaperonas interactúan con cada uno de los monómeros que dan lugar al dímero flexible de la proteína Hsp90. Cada protómero contiene un dominio N-terminal (sitio de unión e hidrólisis de ATP), seguido por la región de carga, un dominio medio y un dominio C-terminal con el motivo MEEVD de anclaje a TPR importante para la unión a co-chaperonas (*figura 4*)⁵².

Dentro de estas proteínas accesorias o co-chaperonas se encuentran proteínas de andamiaje, como p23 y Hop, y otras proteínas de choque térmico como Hsp40 y Hsp70 (*Cuadro 3*)^{4, 51}.

Cuadro 3. Principales co-chaperonas de Hsp90 que participan en la formación de su complejo chaperónico.

Proteína	Gen	Función
<i>Hop</i>	STIP1	Andamiaje para la interacción Hsp90/Hsp70; involucrados en la maduración de proteínas "cliente" ⁶¹⁻⁶³ .
<i>Fkbp52/51</i>	FKBP4/5	Peptidil-prolil-isomerasa; chaperonas; involucrados en la maduración de proteínas "cliente" ^{6, 62} .
<i>Cyp40</i>	PPID	
<i>CHIP</i>	STUB1	Marcaje para degradación vía ubiquitina ⁵¹ .
<i>PP5</i>	PPP5C	Fosfatasa ⁶³ .
<i>Tpr2</i>	DNAJC7	Forma complejos con Hsp90 y Hsp70 ⁵¹ .
<i>Sgt</i>	SUGT1	Forma complejo con Hsp90 ⁶⁴ .
<i>Ttc4</i>	TTC4	Activador de actividad ATPasa de Hsp70, proteína de transporte nuclear ⁶⁴ .
<i>Aha1</i>	AHSA1	Activador de la actividad ATPasa de Hsp90 ^{65, 66} .
<i>p23</i>	PTGES3	Involucrada en maduración de proteínas "cliente", estabiliza conformación cerrada ⁶⁷ .
<i>Cdc37</i>	CDC37	Involucrada en maduración de proteínas "cliente" ⁶⁸ .
<i>Chp1</i>	CHORDC1	Forma complejo con Hsp90 y sgt1 ⁶⁴ .
<i>Hsp40</i>	DNAJB1	Unión a su sustrato en Hsp70 ⁶ .

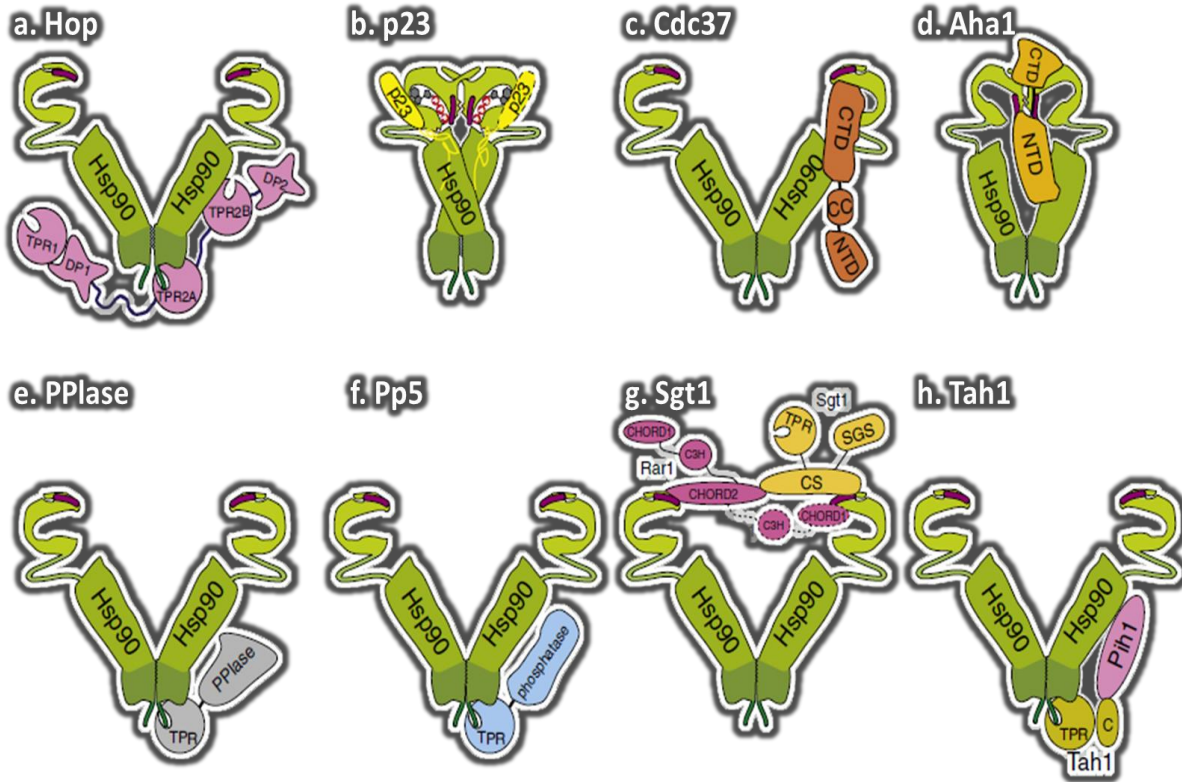


Figura 4. Interacción de co-chaperonas con Hsp90, en N-terminal y su motivo MEEVD en el C-terminal. Tomada de Jin Li et al. 2012. a. Hop/Sti1 se une al motivo MEEVD en C-terminal de Hsp90 por medio del dominio TPR2A, adicionalmente se une a sitios en el dominio medio de Hsp90. b. p23/Sba1 asociado con el N-terminal de Hsp90. c. Cdc37 interactúa con el C-terminal y el N-terminal de Hsp90. d. se une a sitios localizados en N-terminal y dominio medio de Hsp90, la asociación con Aha1 induce una conformación parcialmente cerrada de Hsp90. e. PPlases se une al C-terminal en el motivo MEEVD en los dominios TPR de Hsp90. f. Pp5/ppt1 se conoce que interactúa con el C-terminal en el motivo MEEVD de Hsp90. g. Sgt1, Rar1 y Hsp90 forma un complejo ternario. Sgt1 se une a N-terminal de Hsp90 a través del dominio CS. Esta unión es diferente a la de p23/Sba1. El dominio CHORD2 media la interacción con el N-terminal de Hsp90. h. Tah1 se ancla al C-terminal en el motivo MEEVD de Hsp90 por medio del dominio TPR. Phi1 interactúa con el dominio medio de Hsp90 y el C-terminal de Tah1.

d) Proteínas “cliente” de Hsp90.

El complejo chaperónico de Hsp90 regula la actividad de más de 300 proteínas “cliente” resultando en la estabilización, activación o maduración de

dichas proteínas. En la *Cuadro 4* se detallan algunas proteínas “cliente” de Hsp90 incluyendo de manera interesante oncoproteínas involucradas en los “*Hallmarks*” del cáncer. Estas proteínas “cliente” incluyen moléculas de señalización como receptores hormonales, factores de transcripción y cinasas, así como proteínas estructurales como actinas y tubulinas. Si todas estas proteínas no comparten una secuencia o características estructurales, ¿Cómo es que Hsp90 reconoce a sus proteínas “clientes”?^{4, 44, 54, 69, 70}.

Cuadro 4. Listado de algunas proteínas cliente de Hsp90.

Familia de proteínas “cliente” de Hsp90	Ejemplos
Factores de transcripción	ATF3, BCL-6, HSF-1, IRF-3, Met1, p53, p73, Stat2, VDR, eIF-2.
Cinasas intracelulares	Akt2, Akt/PKB, Bcr-Abl, Cdc2, Cdk11, CDK14, MAPK’s, JAK1, IRAK, GSK3 β , mTOR, Raf-1.
Receptores hormono esteroideos	Receptor de andrógenos (RA), receptor de progesterona (RP), receptor de glucocorticoides (RG).
Otras moléculas de señalización celular	Apaf-1, ATG8, Bcl-2, Bcl-x, β -catenina, Cdc13, cyclina B, DNA pol, Histonas, Rad51, PCNA.

Para explicar el reconocimiento de una proteína “cliente” por Hsp90, ejemplificaremos la unión de Hsp90 con el receptor de progesterona (RP). Recién sintetizada la proteína RP, ésta interactúa con las co-chaperonas Hsp40 y Hsp70, quienes se unen a Hsp90 mediante sus motivos TPR transfiriendo secuencialmente los aminoácidos susceptibles de conformación de la proteína RP a Hsp90. En este caso, la unión entre Hsp90-RP es favorecida y dependiente de la unión del receptor RP a la co-chaperona Hop. En el estado Hop-RP, Hsp90 se une en conformación



abierta a RP, donde la maduración de RP es dependiente de la unión de ATP a Hsp90. Finalmente ocurre el desplazamiento de Hop por otras co-chaperonas que se unen al motivo TRP de Hsp90, como lo es Cyp40, formando una conformación cerrada de Hsp90, y p23 se une para favorecer la dimerización de los extremos N-terminal de Hsp90⁷¹⁻⁷³.

El proceso antes explicado demuestra que las proteínas “cliente” de Hsp90 requieren la función de un subconjunto específico de co-chaperonas (complejo chaperónico). El plegamiento de los receptores de progesterona y glucocorticoides requiere de Hsp90 en la presencia de Hop y p23, mientras que por otro lado la cinasa Chk1, necesita de la unión entre Hsp90 y Cdc37-Ck2. La presencia de ciertas co-chaperonas en el complejo chaperónico, varía de una manera proteína “cliente” específica⁷⁴.

Una de las proteína “cliente” de Hsp90 mas estudiadas es el factor transcripcional de choque térmico (Hsf-1), el cual regula la expresión de distintas Hsp: Hsp90, Hsp70, Hsp27. En condiciones normales Hsf-1 adopta una conformación monomérica inactiva a través de la interacción transitoria con Hsp90. Este complejo es altamente dinámico, donde Hsf-1 se asocia y disocia de Hsp90 constantemente. Durante condiciones de estrés, Hsp90 se disocia de Hsf-1, promoviendo la trimerización y activación por fosforilación de Hsf-1. Posteriormente Hsf-1 se transloca al núcleo uniéndose a sus elementos de respuesta de choque térmico en el DNA, donde juega un papel importante como regulador de la expresión de proteínas en respuesta al estrés, incluyendo a Hsp90⁷⁵⁻⁷⁷.



e) Hsp90 y su implicación patológica.

Gran número de estudios demuestran que Hsp90 juega un papel importante en la progresión de múltiples enfermedades, incluyendo: procesos de isquemia/reperfusión, infecciones bacterianas, parasitarias, virales y cáncer³¹.

Se sabe que en procesos de isquemia/reperfusión renal, cardíaca o cerebral, Hsp90 se sobre-expresa en respuesta al estrés por daño isquémico, acompañado del efecto citoprotector de Hsp70⁷⁸.

En infecciones bacterianas, parasitarias o virales, Hsp90 participa en la replicación o sobrevivencia del patógeno: leishmania, tripanosoma, estafilococo, rotavirus, dengue, VIH, entre otros. También se ha observado estar implicado en enfermedades autoinmunes, como lo es el Lupus eritematoso sistémico, donde se han encontrado anticuerpos dirigidos contra Hsp90 del paciente^{31, 79}.

Finalmente, una gran cantidad de evidencia apoya el papel de las chaperonas moleculares en el mantenimiento de la transformación y fenotipo maligno del cáncer. Entre ellos, Hsp90 posee un papel importante en el mantenimiento de múltiples vías oncogénicas siendo necesaria para el plegamiento, estabilidad y conformación funcionalmente activa de diversas oncoproteínas⁸⁰⁻⁸².

3. Hsp90 en Cáncer

Desde una visión médico-biológica, el cáncer se considera como una enfermedad multifactorial y heterogénea por su complejidad a nivel molecular y constitución celular al fenotipo, clasificándose de manera general en etapas clínicas de diagnóstico y terapéuticas. Sin embargo, mediante la simplificación de la naturaleza del cáncer, se ha descrito como un proceso de células autónomas



intrínseco a la célula cáncerosa^{5, 83}. A nivel celular, el crecimiento descontrolado de células cáncerosas implica la capacidad para mantener su proliferación celular, esto mediante la activación de vías de señalización que aumentan la expresión de diferentes factores de crecimiento.⁷ En estas vías de señalización participan proteínas que dictaminan la activación o inhibición de las mismas, dentro de las que destaca la familia de proteínas Hsp. La sobre-expresión de Hsp se ha asociado con el cáncer, como Hsp27 su sobre-expresión esta correlacionado con el grado Gleason (sistema empleado para medir el grado de agresividad del cáncer de próstata) en Cáncer de próstata, Hsp90 se ha asociado con una supervivencia de las células cáncerosas en diferentes tipos de cáncer^{9, 13, 38, 82, 84}.

a) Participación de Hsp90 en los "Hallmarks" del cáncer.

El cáncer es un proceso de múltiples etapas que reflejan alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células humanas normales en derivados altamente malignos. Muchos tipos de cáncer son diagnosticados en la población humana con una incidencia dependiente de la edad. Las células cáncerosas tienen defectos en los circuitos reguladores que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. Hay más de 100 tipos y subtipos diferentes de tumores que se pueden encontrar dentro de órganos específicos, esta complejidad provoca que sea difícil su estudio⁸⁵.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo⁸⁶. En el 2012, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), a través de su portal Globocan, reporto 14.1 millones de casos nuevos cáncer, provocando 8.2 millones de muertes y que 32.6 millones de personas viven

con cáncer a nivel mundial. La tasa de incidencia de cáncer en general estandarizada por edad es casi un 25% mayor en los hombres que en las mujeres, con tasas de 205 y 165 por cada 100.000, respectivamente⁸⁷.

El IARC ubicó al cáncer de mama en primer lugar de incidencia seguido por cáncer de próstata a nivel mundial. En México, el cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia (*figura 5*). Los datos más recientes publicados por el Instituto Nacional de Cancerología indican una tasa de mortalidad de 13 defunciones por cada 100,000 hombres⁸⁸⁻⁹⁰.

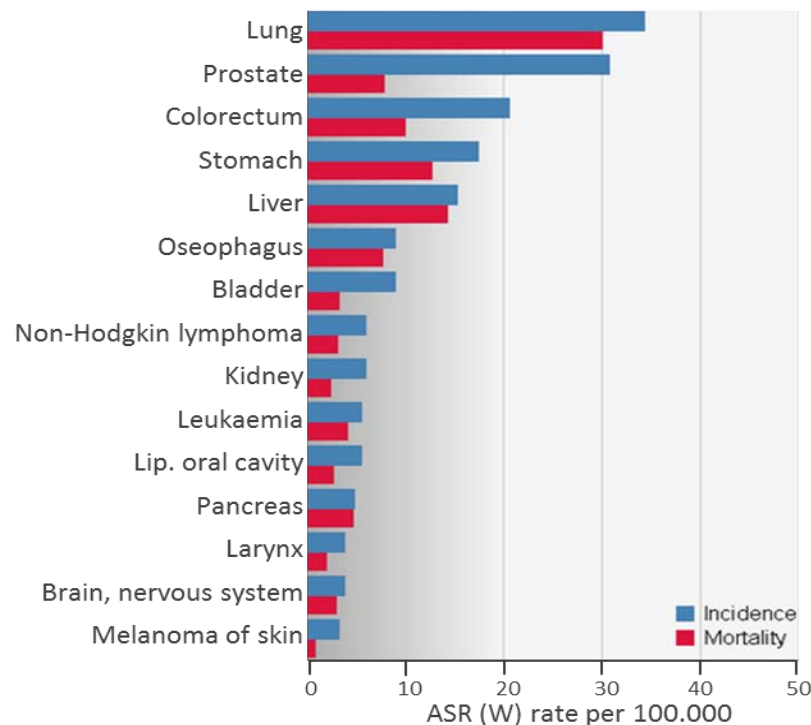


Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer en México estimada en población masculina. Tomada de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer.

En células de cáncer la expresión de las Hsp se ve aumentada participando en procesos de proliferación, síntesis proteica, supervivencia celular, entre otros, denominados “*Hallmarks*” del cáncer (*figura 6*)^{9, 14}. La complejidad del cáncer es tan grande que Hanahan y Weinberg describieron 10 características biológicas

distintivas del cáncer, “Hallmarks” del cáncer: 1) Señalización de proliferación sostenida, 2) Evasión de efectos supresores de crecimiento, 3) Resistencia a la muerte celular programada, 4) Adquisición de inmortalidad, 5) Desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis), 6) Invasión a tejidos adyacente formación de metástasis distantes, 7) Inestabilidad genómica, 8) Inflamación, 9) Reprogramación de metabolismo energético, y 10) Evasión de la respuesta inmune⁵.

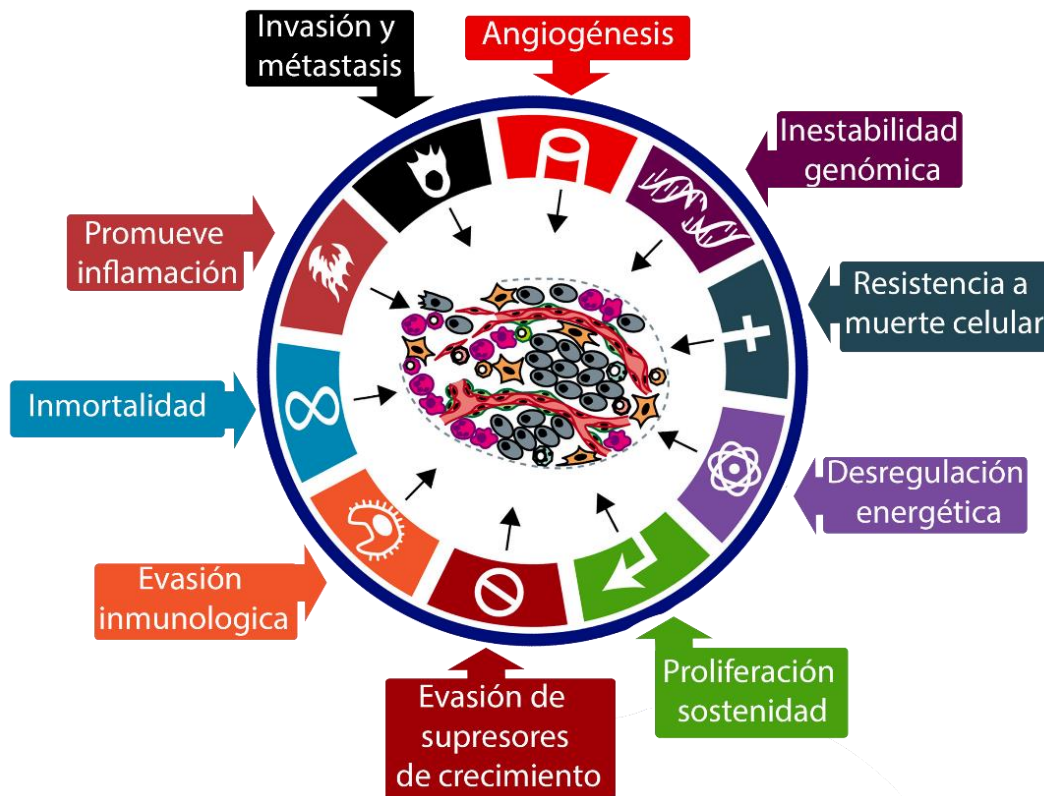


Figura 6. Diagrama de los Hallmarks del cáncer. Tomada y modificada de Hanahan, Weinberg, et al. 2011.

Se han realizado estudios en los que indican que Hsp90 tiene un papel crítico en el mantenimiento de múltiples vías oncogénicas y que es necesario para mantener el plegamiento, la estabilidad y conformación activa de muchas oncoproteínas aberrantes⁹¹.

Algunas oncoproteínas son proteínas “cliente”, incluyendo HER-2, Akt, Raf-1, CDK4, H1F1- α , Bcr-Abl, y p53 mutada, que normalmente están activadas, mutadas o sobre-reguladas en células de cáncer, son dependientes de Hsp90. Hay oncoproteínas y supresores de tumor que a su vez promueven o inhiben proliferación o supervivencia de una célula cáncerosa. La regulación de todos estos oncogenes y genes supresores le han dado a Hsp90 un papel importante en el tratamiento del cáncer (*figura 7*)^{5, 51, 83, 92, 93}.

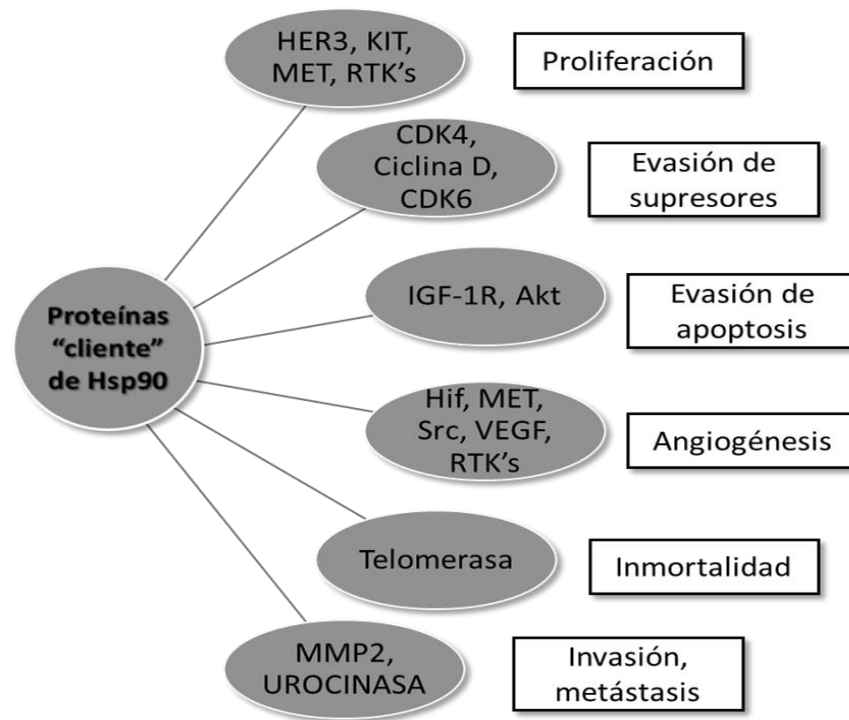


Figura 7. Participación de las proteínas “cliente” de Hsp90 en los “Hallmarks” del cáncer. Se mencionan algunas proteínas “cliente” de Hsp90 y con que “Hallmarks” del cáncer se encuentra involucrada.

b) Inhibición farmacológica de Hsp90 como terapia contra el cáncer.

La expresión de Hsp90 en cáncer esta sobre-regulada debido a que la célula se encuentra en constante estrés y necesita activar la síntesis de más moléculas de Hsp90 para cubrir las necesidades vitales de la célula: homeostasis proteica,

energética y celular. En este aspecto, la abundancia de Hsp90 aumenta dentro de la célula de cáncer; sin embargo, se desconoce si la conformación monómero/dímero y localización subcelular de las Hsp90 es específica de isoforma entre los distintos miembros de la subfamilia o es independiente (*figura 8*)³⁻⁷.

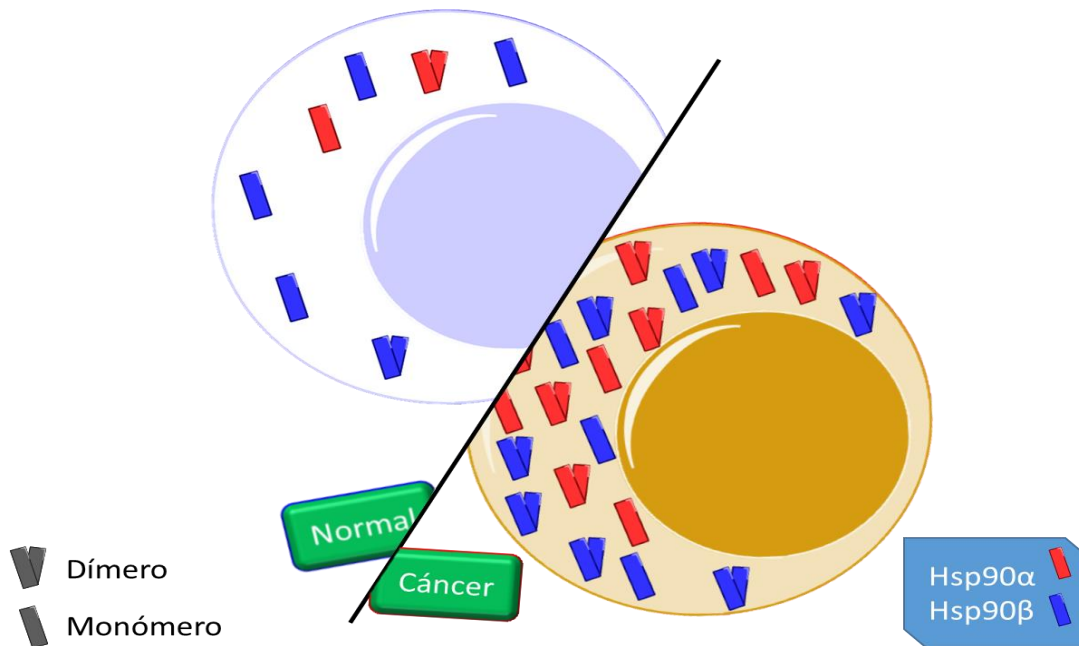


Figura 8. Representación propuesta de la abundancia subcelular y conformación monómero/dímero de las proteínas Hsp90 en una célula normal y una célula de cáncer.

En la terapéutica actual contra el cáncer se ha propuesto a Hsp90 como una diana terapéutica. Por ello, se han desarrollado diferentes compuestos que inhiben la función de Hsp90 denominados inhibidores de Hsp90 (Hsp90i). Los Hsp90i se dividen en dos grupos principalmente dependiendo de su dominio de unión a la proteína, los que se unen al dominio N-terminal o al dominio C-terminal^{4, 9, 94, 95}.

El primer Hsp90i fue la geldanamicina (GA) (*figura 9*), descubierto en los 70's y empleado como antibiótico, posteriormente se demostró su efecto sobre Hsp90 en la época de los 90's. El efecto de los Hsp90i lo llevan a cabo mediante la inhibición de la hidrólisis de ATP por competencia al sitio de unión de ATP de Hsp90,

teniendo como consecuencia la disociación del complejo chaperónico y la degradación de la proteína “cliente”.

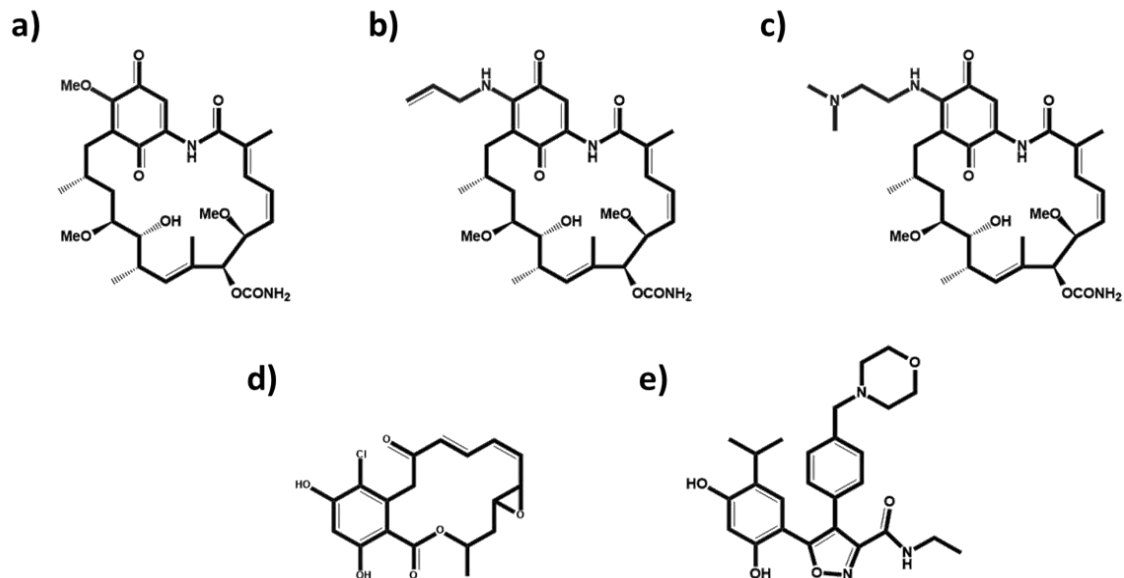


Figura 9. Estructura de los inhibidores de Hsp90. a) Geldanamicina primer inhibidor, b) 17-AAG y c) 17-DMAG derivados de geldanamicina, d) Radicol inhibidor de segunda generación, e) NVP-AUY922 inhibidor sintético.

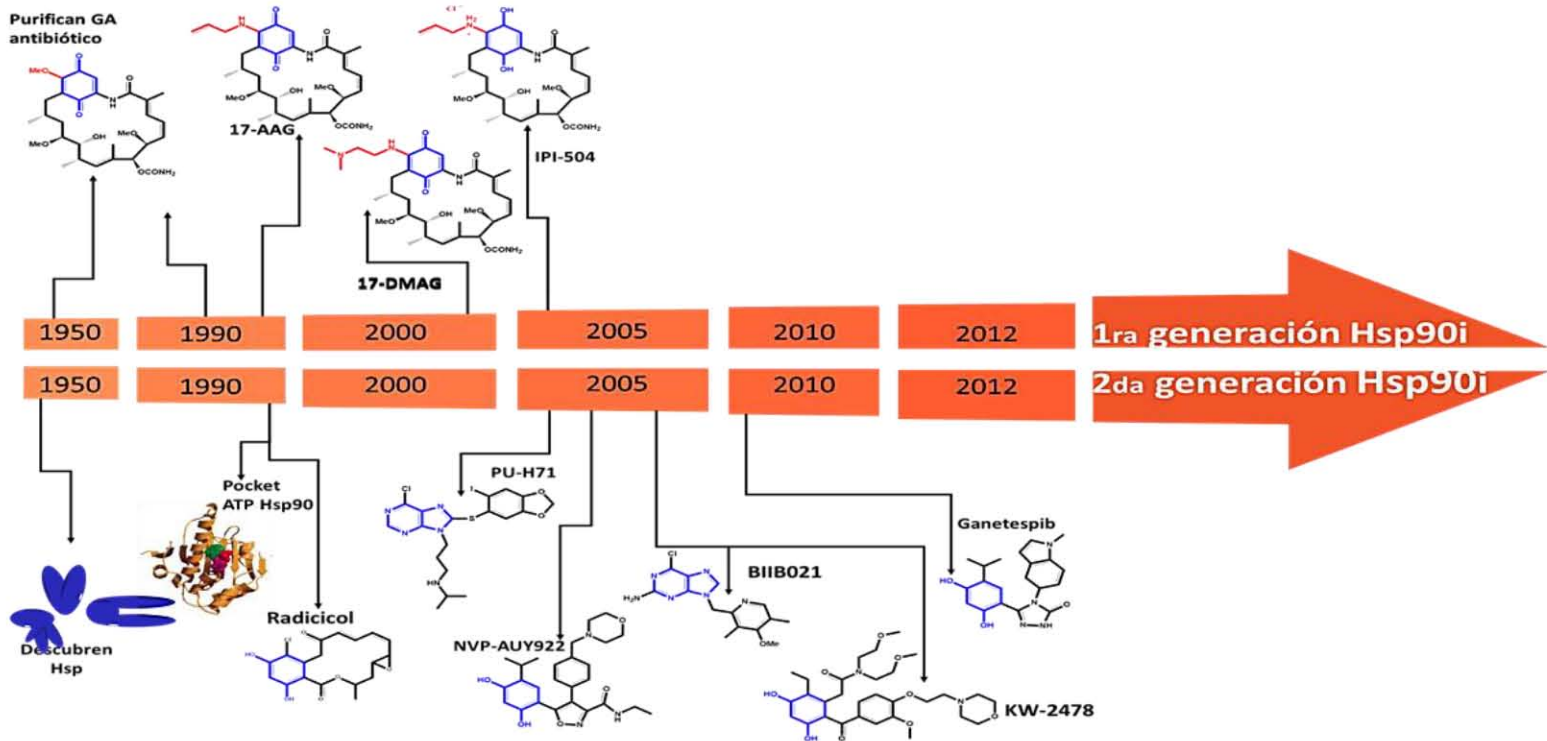
La GA debido a su éxito en la inhibición de Hsp90 prometía ser un Hsp90i interesante, pero debido a su pobre solubilidad y alta hepatotoxicidad *in vivo*, no logró ascender a fase clínica. A partir de las últimas décadas se han desarrollado derivados de GA con el fin de mejorar su afinidad a Hsp90 y disminuir su toxicidad en base a la homología con la molécula de ATP. 17-DMAG (figura 9), derivado sintético de la GA, es un Hsp90i que presenta propiedades hidrosolubles, con mayor afinidad por Hsp90 y menor toxicidad que GA^{4, 9, 95-97}.

Los Hsp90i no sólo han sido derivados de GA, si no también se han desarrollado a partir de otras moléculas como el radicol, así como de moléculas sintéticas. En las últimas décadas se ha evaluado a los Hsp90i en modelos *in vitro*, *in vivo*, para poder llegar a la clínica, evaluándose en distintos tipos de tumores (figura 10)⁹⁸⁻¹⁰⁰.



Efecto del 17-DMAG sobre la expresión y conformación de las proteínas Hsp90α y Hsp90β en líneas celulares de próstata normal y cáncer

Hsp90β en líneas celulares de próstata normal y cáncer



Tipo de cancer	Año	1990	2000	2005	2010	2012
Cáncer de ovario	GA				IB	DM, GN
Cáncer renal	GA		AG	AG		DM
Cáncer de próstata	GA			AG, AG, NV	NV, IB	DM, IP, GN
Cáncer de pulmón	GA		AG, DM		NV, IB, NV, DM	IP, GN, NV, GN, GN, PU
Cáncer de mama	GA			PU, AG, NV, NV	IB, NV, IB	AG, DM, AG, DM, NV, NV, IP, GN
Cáncer de piel	GA		AG, DM, DM	AG, AG, NV	AG, PU	DM, IP, AG, GN
Cáncer hematológico	GA		AG	IP	IB, DM, GN, KW, IB	AG, AG, GN, GN, AG, KW, KW, NV
Cáncer hígado			AG			
Cáncer de colon	GA		AG		NV, DM, GN	DM, GN, GN, NV
Cáncer de SNC	GA					AG
Cáncer linfático						
Cáncer pancreático			AG, DM		DM	GN, GN
Cáncer gástrico						GN, GN, AG, BI

in vitro in vivo in vivo & in vitro Fase I Fase II Fase III



Figura 10. Inhibidores de Hsp90 desarrollados y tipo de cáncer evaluado. Geldanamicina (GA), Tanespimicina (AG), Alvespimicina (DM), Restapimicina (IP), PU-H71 (PU), NVP-AUY922 (NV), KW-2478 (KW), Ganetespib (GN), BIIB021 (BI).

Los Hsp90i están diseñados para evitar que Hsp90 hidrolice ATP, por competencia por el sitio de unión de ATP. El efecto de Hsp90i en una célula normal y en una célula de cáncer es diferente, debido a la necesidad o adicción de las células de cáncer a Hsp90 (figura 11)^{4, 8, 9}.

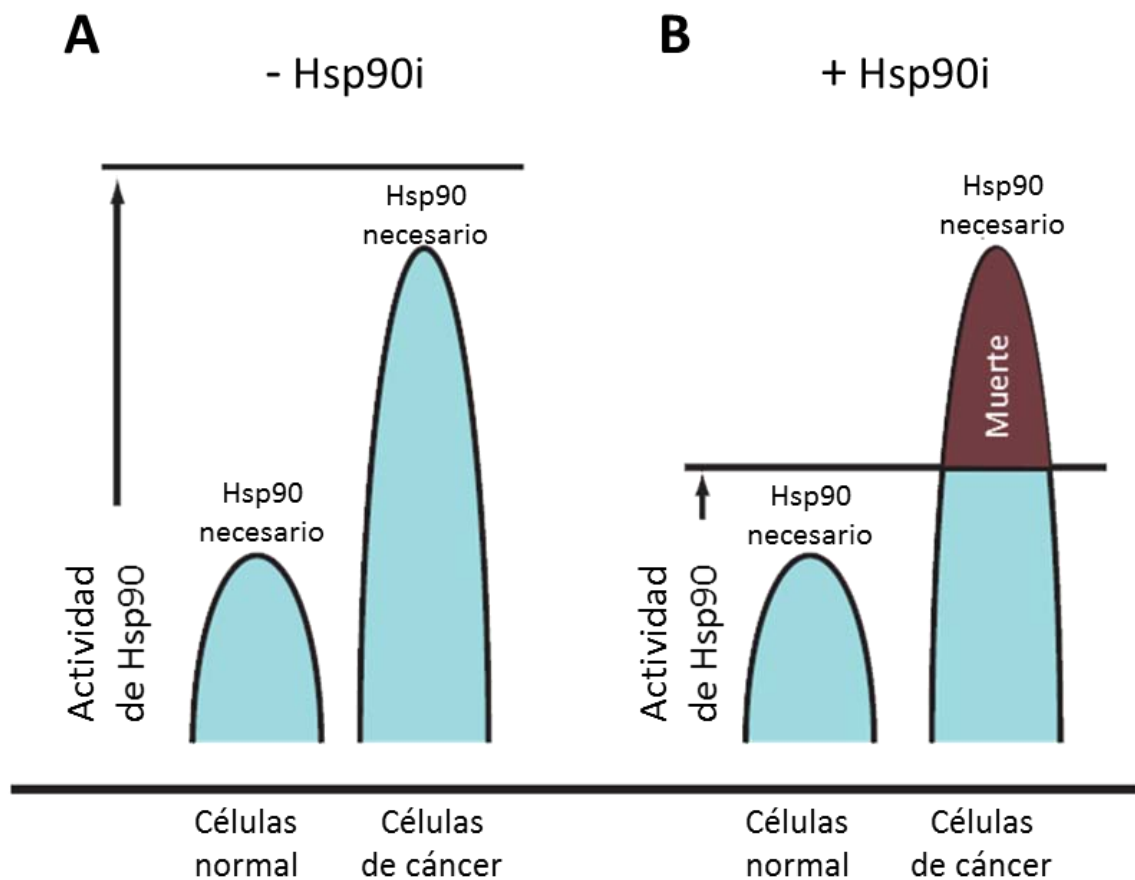


Figura 11. Comparación del efecto de Hsp90i sobre la necesidad o adicción hacia Hsp90 en una célula normal y una célula tumoral. Tomada de Yoshikiko Miyata, et al. 2013.

Sin embargo, los Hsp90i que se han desarrollado en la actualidad y que han logrado llegar a la práctica clínica no son selectivos para una isoforma en particular. Entre los miembros de la subfamilia de Hsp90, sólo se han desarrollado inhibidores



Efecto del 17-DMAG sobre la expresión y conformación de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata normal y cáncer



de Hsp90 de la isoforma Trap1, proteína de choque térmico con ubicación subcelular mitocondrial. Es por ello que nosotros queremos mostrar la importancia del desarrollo así como del uso de inhibidores específico de isoforma (Hsp90 α , Hsp90 β) para tener una terapia con mejores resultados. ^{4, 9, 44, 94, 95, 101}.



VI. Planteamiento del problema

El inhibidor 17-DMAG se ha propuesto para el tratamiento del cáncer por su capacidad de inhibir la actividad de la proteína Hsp90. Sin embargo, la abundancia, conformación y localización subcelular de las distintas isoformas de Hsp90 varía entre los tipos de cáncer, asociado a la dependencia de las proteínas “cliente” las cuales están desreguladas en cada tipo de cáncer.

Por lo anterior, en el presente proyecto se propone evaluar si el efecto anti-tumoral del 17-DMAG depende de la abundancia, conformación y/o localización subcelular pre-existente entre Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y de cáncer.



VII. Hipótesis de trabajo

El efecto anti-tumoral del 17-DMAG será dependiente del perfil de expresión y de conformación pre-existente entre Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y de cáncer; donde, la línea celular que mantenga una sobre-regulación y conformación dimérica de la isoforma Hsp90 α brindará mayor resistencia al tratamiento con 17-DMAG.



VIII. Objetivos

Objetivo general:

- ❖ Evaluar el efecto del inhibidor de Hsp90 (17-DMAG) sobre el perfil de expresión, conformación y localización de Hsp90 α y Hsp90 β , en líneas celulares PrEC (normal) y PC3 (cáncer) por ensayos de inmunoblot y de inmunofluorescencia, durante la migración celular.

Objetivos específicos:

- ❖ Obtener el perfil de expresión de Hsp90 en diferentes líneas celulares de tejido normal y tumoral.
- ❖ Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata normal y tumoral.
- ❖ Obtener el patrón de expresión y de conformación (monómero/dímero) de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y tumoral.
- ❖ Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión y de conformación (monómero/dímero) de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y tumoral.
- ❖ Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 en el perfil de expresión de Hsp27 y Hsp70 en líneas celulares de próstata.
- ❖ Determinar la localización núcleo-citoplasma de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y tumoral en presencia y ausencia del inhibidor 17-DMAG.



- ❖ Determinar si existe asociación entre el efecto anti-migratorio del inhibidor 17-DMAG con la expresión, conformación y/o localización de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata normal y tumoral.

IX. Materiales y métodos

Se evaluó el efecto del inhibidor de Hsp90 (17-DMAG) sobre el perfil de expresión, conformación (monómero/dímero) y localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β , en líneas celulares PrEC (normal) y PC3 (cáncer) por ensayos de inmunoblot y de inmunofluorescencia, durante la migración celular (*figura 12*).

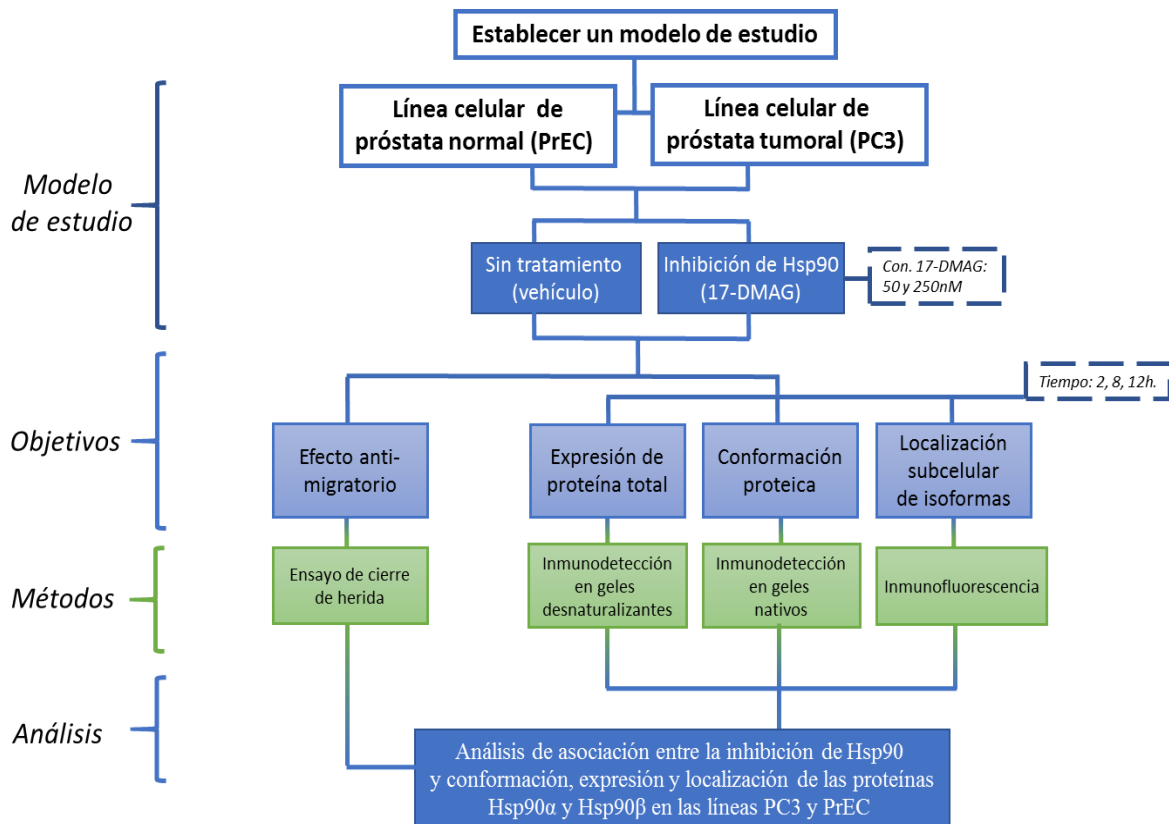


Figura 12. Estrategia experimental. El modelo de estudio empleado fueron líneas celulares de tejido normal (PrEC) y tumoral (PC3) de próstata.

1. Reactivos y líneas celulares

Las células utilizadas fueron PrEC, PC3, HaCaT, C33A, HeLa, CasKi, Hek-293, 786-O y ACHN. Las células PrEC y C33A se mantuvieron en medio de cultivo D-MEM/F12 (Marca Gibco, New York, USA), PC3 y 786-O se mantuvieron en medio



RPMI (Marca Gibco, USA), HaCaT, HeLa, CasKi y ACHN se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Marca Gibco, USA), Hek-293 se mantuvo en medio EMEM (Marca Gibco, USA), antibiótico-antimicótico 1X (Invitrogen), con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Marca Corning, Cat 35-010 CV). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂, y el inhibidor 17-DMAG fue empleado en los ensayos de inhibición (Marca Calbiochem, Cat.100069).

Anticuerpos utilizados: anticuerpo primario anti- β -actina (Cat. SC8432, Santa Cruz) (1:2500), anti-Hsp90T (Cat. NBP2-12878, Novus Biologicals) (1:5000), anti-Hsp90 α (Cat. AB82588, Abcam) (1:2000), anti-Hsp90 β (Cat. AB32568, Abcam) (1:2000), anti-Hsp70 (Cat. AB9920, Millipore) (1:2500), anti-Hsp27 (Cat. MAD88051, Millipore) (1:1000). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP: anti-mouse (Cat. F2612, Santa Cruz) (1:10000), anti-rabbit (Cat. AP132p, Millipore) (1:20000), anti-goat (Cat. V805A, Promega) (1:10000). Estos anticuerpos empleados en el inmunoblot fueron diluidos en buffer de anticuerpo.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon anticuerpos primarios anti-Hsp90 α (Cat. AB82588, Abcam) (1:200) y anti-Hsp90 β (Cat. AB32568, Abcam) (1:200). Los anticuerpos secundarios anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Cat. A11008, Invitrogen) (1:200) y anti-goat Alexa Fluor 568 (Cat. A11079, Invitrogen) (1:200) diluidos en PBS.

2. Ensayo de migración (*Wound healing assay*)

La migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida en placas de multi-pozos de 24 pozos, manteniendo una confluencia celular del 90%, y retirándoles el suero 24 horas antes del ensayo. Se agregó medio de cultivo con



SFB al 10%, posteriormente se realizó una herida sobre la monocapa celular empleando una punta de micropipeta de 20μl. Empleando un microscopio invertido (Marca Leica) se obtuvieron microfotografías de la herida a tiempos de 0 y 18 horas, con y sin tratamiento del inhibidor de 17-DMAG a una concentración de 250nM.

3. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG

Los ensayos de inhibición se realizaron con células con una confluencia del 90%, a concentración de 50 y 250nM del inhibidor 17-DMAG, y tiempos de 2, 4, 8 y 12 horas, preparándolo en medio cultivo DIMEM/F12 y RPMI con 10% de SFB, protegiendo el inhibidor de la luz. Doce horas previas a la inhibición se les retiró el suero.

4. Extracción de proteínas totales

Las extracciones de proteína total de líneas celulares, se realizaron mediante lisis celular, para ello se empleó RIPA Lysis Buffer (Cat. 20-188), y se centrifugó 14,000 rpm/20minutos a 4°C, para separar las proteínas obtenidas. Para cuantificar las proteínas obtenidas se utilizó el método de Lowry, con ayuda del Kit DC Protein Assay (Cat. 500-0116), bajo las condiciones del manual de cada kit. Los extractos proteicos se almacenaron a -20°C.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizaron dos tipos de electroforesis: 1) SDS-PAGE con geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%, se corrió a 60 volts por 30 minutos para que las proteínas se concentraran, posteriormente, 120 volts por 90 minutos para separar las proteínas; 2) Native-PAGE con geles no desnaturizantes de



poliacrilamida al 8%, se corrió a 60 volts por 30 minutos, posteriormente, 100 volts por 150 minutos, en baño de hielo.

6. Electrotransferencia de geles PAGE a membranas PVDF

La transferencia de los geles se realizó en un Transblot (Marca BioRad, método semi-seco), empleando membrana PVDF (PerkinElmer, Cat. NEF1002), a 10 volts durante 100 minutos para geles desnaturizantes y para geles nativos a 10 volts por 150.

7. Inmunoblot

El bloqueo de las membranas se realizó con Blot-QuickBlocker Reagent (Cat. WB57) al 5% con TBS-Tween bloqueando 1 hora a temperatura ambiente. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó toda la noche a 4°C, mientras que los secundarios solamente 1 hora, ambos en buffer de anticuerpo 0.1% con Blot-QuickBlocker Reagent. Después de la incubación se llevaron a cabo 6 lavados con TBS-T. La inmunodetección de las proteínas se realizó con el Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Cat. WBKLS0500), se expuso una película radiográfica sobre la quimioluminiscencia de las proteínas de interés. Las películas radiográficas se revelaron y se fijaron.

8. Ensayos de Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron en cubreobjetos. Se sembraron 70 mil células, que posteriormente se fijaron con metanol y acetona. Después se bloqueó con Albumina al 10%, se incubaron los anticuerpos primarios diluidos en PBS, toda la noche a 4°C y los secundarios acoplados a un fluorocromo



1 hora a temperatura ambiente, cubiertos de la luz. Se montan las laminillas y se les adiciona DAPI para la tinción de núcleos (Cat. D9542). Las imágenes se obtuvieron por microscopia de fluorescencia (Axiolmager, Zen Software, Carl Zeiss).

9. Análisis estadístico

Los datos fueron visualizados y los análisis estadísticos se realizaron utilizando SigmaPlot (versión 10.0; SigmaPlot Software). Los datos son representativos de 3 repeticiones. Los valores de p para las comparaciones de los grupos con su control se calcularon mediante t-Student para muestras independientes.

X. Resultados

1. Perfil de expresión de Hsp90 α y de Hsp90 β en líneas celulares de tejido normal y de cáncer

En este estudio se determinó el perfil de expresión de las proteínas Hsp, para ello se emplearon diferentes líneas celulares de tejido no tumoral y de cáncer. Las líneas celulares empleadas se dividieron en 3 grupos: 1) próstata que incluye PrEC (no tumoral) y PC3 (cáncer); 2) cérvix HaCaT (no tumoral), HeLa, Caski y C33A (cáncer); 3) renal HEK-293 (no tumoral), 786-O y ACHN (cáncer).

El perfil obtenido para cada grupo es diferente, en el grupo renal se observa que hay una disminución de la expresión de las proteínas Hsp90 total, Hsp90 β , Hsp90 α y Hsp70 en líneas celulares malignas comparadas con células no tumorales, (figura 13a). En el grupo de cérvix no hay un patrón entre las líneas celulares, se observa variación en la expresión de las proteínas Hsp, (figura 13a). En el perfil del grupo de próstata se observa que hay diferencias entre células no tumorales (PrEC) y tumorales (PC3) en cuanto a la expresión de sus proteínas Hsp; por ejemplo, en la proteínas Hsp90 β y Hsp90 α observamos un aumento en la expresión en la línea celular PC3, lo que no ocurre con la expresión de las proteínas Hsp90 total y Hsp70, donde no se observa un cambio entre ambas líneas celulares, (figura 13a). En las densitometrías de la isoforma Hsp90 β se observan cambios significativos en la línea celular 786-O ($p < 0.05$) disminuyendo en un 90% la expresión, comparada con la línea no tumoral HaCaT. La expresión de la isoforma Hsp90 α aumenta 15 veces con una $p < 0.05$ en la línea celular PC3 comparado con

PrEC; y en la línea celular C33a incrementa de 1.5 a 2 veces la comparado con HaCaT, como se observa en la figura 13c.

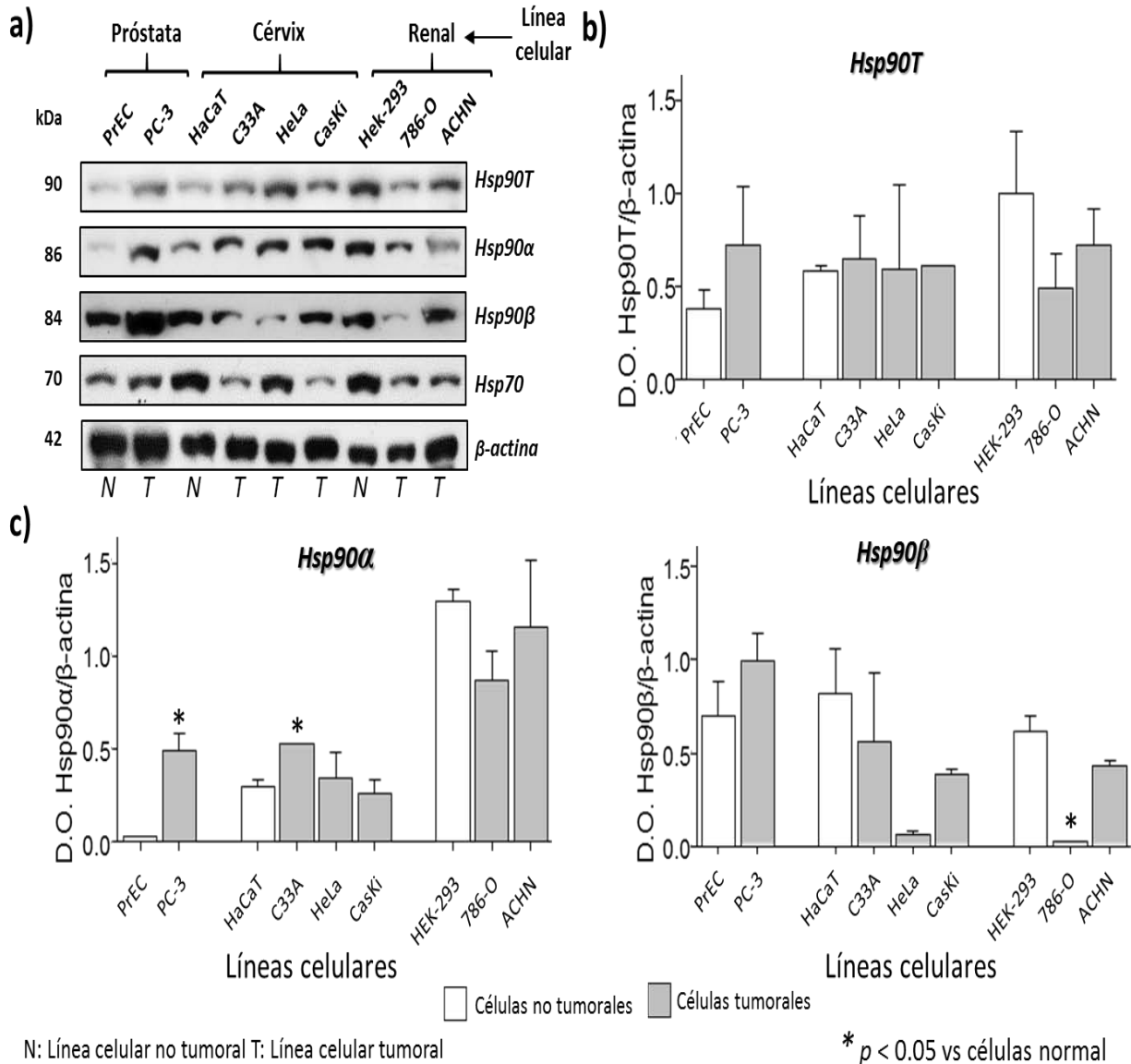


Figura 13. Perfil de expresión de la proteína Hsp90 en diferentes líneas celulares. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de PVDF, **a)** Inmunoblot de las proteínas Hsp90 total, Hsp90 α , Hsp90 β y Hsp70 en los 3 grupos de líneas celulares, empleando β -actina como control de carga. **b)** y **c)** densitometrías de las proteínas Hsp90T y de sus isoformas Hsp90 α y Hsp90 β . * $p \leq 0.05$ (t-student) comparados con su línea celular no tumoral.

2. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata

Se evaluó la capacidad de migración que poseen las células PrEC y PC3, mediante un ensayo de cierre de herida. El ensayo se realizó en 2 grupos en ambas líneas celulares: en células tratadas con el inhibidor de Hsp90 (17-DMAG) y en células control sin inhibidor, incubadas durante 18 horas. En la figura 14a se observa que la línea celular PrEC-control tarda más en cerrar la herida, comparada con la línea celular PC3-control, en donde la herida prácticamente se encuentra cerrada a las 18 horas (figura 14b).

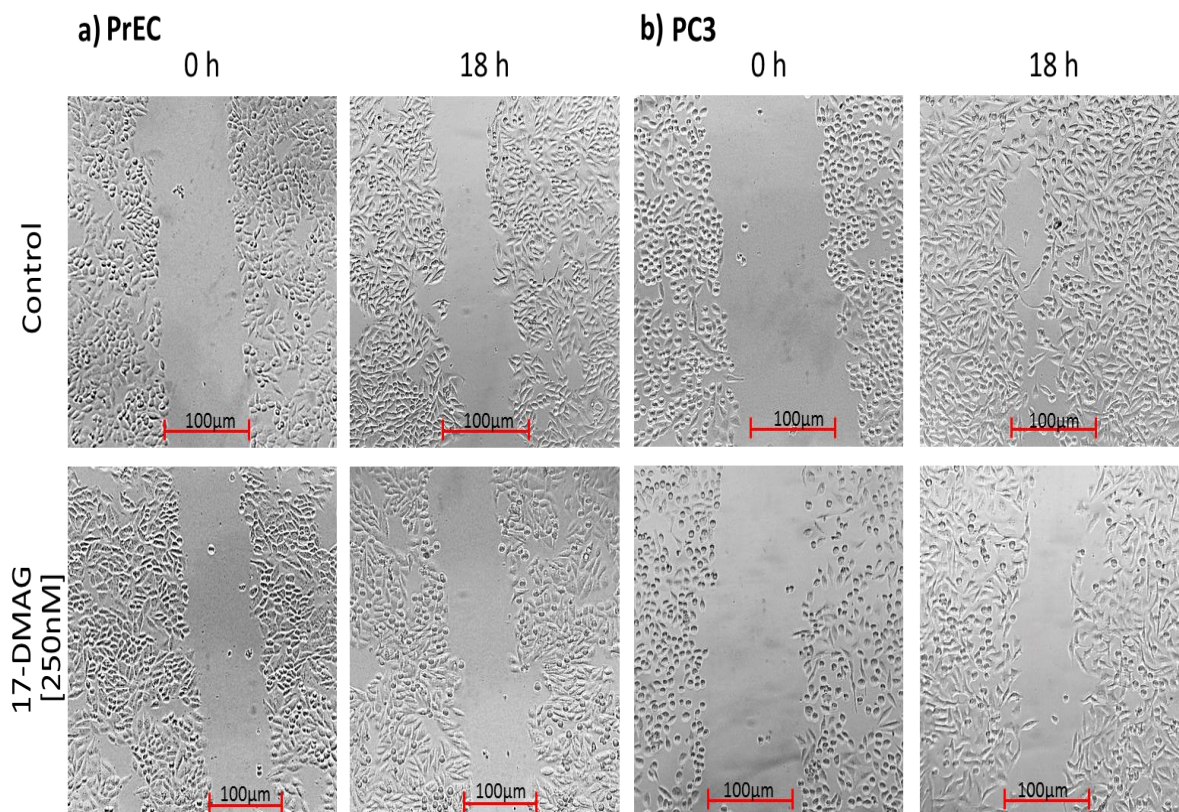


Figura 14. Efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata. Ensayo de cierre de herida, a) células PrEC (normal) y b) células PC3 (tumORALES), se observó el cierre de herida después de 18h con y sin tratamiento (Hsp90i) en ambas líneas celulares.



El patrón observado cambia cuando se da el tratamiento con Hsp90i [250nM], la herida tarda más en cerrar, esto es más evidente en la línea celular PC3 que en PrEC, siendo más sensible la línea celular PC3 que la línea PrEC al inhibidor (figura 14).

3. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

Se determinó el efecto que tenía el inhibidor de Hsp90 sobre la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , esto se realizó mediante inmunoblot, utilizando dos concentraciones, 50nM y 250nM, evaluando diferentes tiempos de inhibición (figura 15).

Las densitometrías de los inmunoblots indican que no hay cambios significativos ($p>0.05$) en la expresión a 2 las horas de tratamiento, en las isoformas en ambas líneas celulares con el tratamiento a 50 nM (figura 15a), a 250nM se observa un aumento en la expresión de 2 veces en la línea celular PC3-Hsp90 α comparado con su control ($p<0.05$). A tiempos de 4 horas se observa una disminución significativa de 0.7 ($p<0.05$) en la línea celular PC3-Hsp90 β en la expresión en ambas concentraciones (figura 15b). A 250nM hay cambios significativos ($p<0.05$) con un aumento en la expresión de la proteína Hsp90 α en ambas líneas celulares (figura 15b). Por otra parte, la inhibición a 8 horas no presenta cambios significativos ($p>0.05$) en la expresión de ambas isoformas, sólo en Hsp90 α en la línea celular PrEC donde hay un aumento de 5 veces con respecto al control en la expresión, con una $p>0.05$, empleando la dosis de 250nM (figura

15c). También se encontraron diferencias significativas entre 50 y 250nM del inhibidor en la línea PC3-Hsp90α a 4 horas de tratamiento (figura 15b).

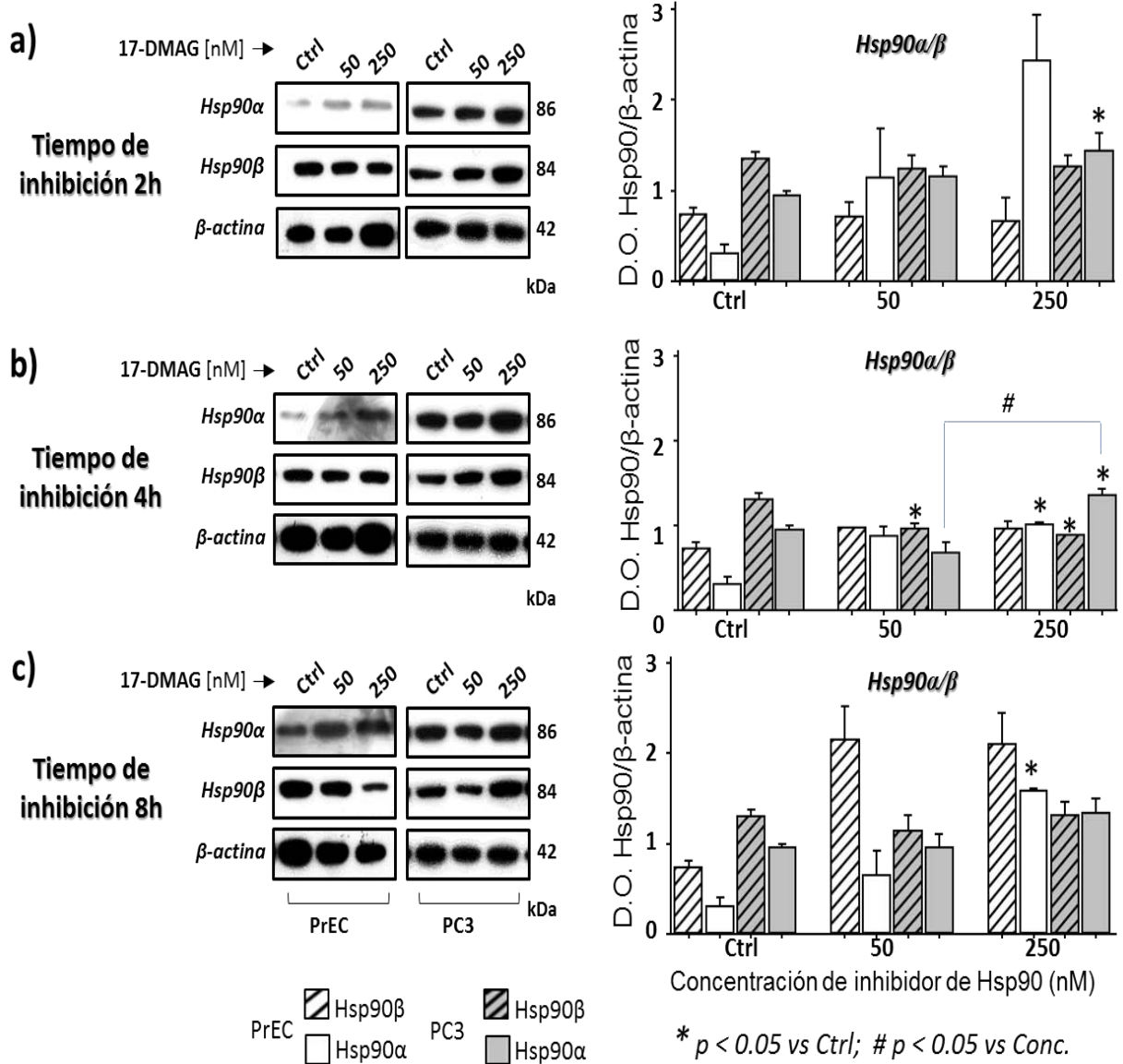


Figura 15. Efecto del Hsp90i sobre el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90 en líneas celulares PrEC y PC3. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de PVDF, **a)**, **b)** y **c)** inmunoblot de las isoformas Hsp90α y Hsp90β, a dos concentraciones del Hsp90i 50nM y 250nM, evaluando a diferentes tiempos (0, 2, 4, 8 horas), izquierda; densitometrías de los inmunoblots empleando como control de carga β-actina, derecha. * $p \leq 0.05$ (t-student) comparados con su respectiva línea celular sin tratamiento, # $p \leq 0.05$ (t-student) comparado entre 50nM y 250nM.

4. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

La inhibición de Hsp90 a tiempos menores de 8 horas no afecta significativamente la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β , por lo que se realizaron ensayos de inhibición a tiempos largos. El efecto del inhibidor 17-DMAG a concentraciones de 50 y 250 nM con 12h de tratamiento provocó un aumento de 3 a 4 veces en la expresión de Hsp90T en la línea celular PrEC, mientras que en la línea celular PC3 disminuyó de 0.7 veces con respecto a su control (figura 16a).

En la línea celular PrEC, el tratamiento con el inhibidor 17-DMAG aumentó de 3 a 4 veces la expresión de Hsp90T con 50nM a 8 horas, y con 250nM a las 2 y 12 horas. El tratamiento del inhibidor 17-DMAG en la línea celular PC3 no presentó cambios significativos a una concentración de 50nM, mientras que a una concentración de 250nM del inhibidor disminuyó de 0.7 veces la expresión de Hsp90T a las 2, 8 y 12 horas (figura 16b y 16c).

La inhibición de Hsp90 con 50 nM del inhibidor 17-DMAG aumento 1.5 veces la expresión de Hsp90 β en la línea celular PC3; mientras que en la línea celular PrEC indujo la expresión de Hsp90 α incrementando de 2 veces a tiempos de 8 y 12 horas, respectivamente con respecto a su control (figura 16b y 16c).

La inhibición de Hsp90 con 17-DMAG a 250nM presentó cambios en la expresión de la isoforma Hsp90 α , aumento la expresión en la línea celular PrEC desde las 2 horas de la inhibición incrementando de 2.5 a 3 veces, mientras que en línea celular PC3 disminuyo la expresión a 8 horas y aumento a las 12 horas.

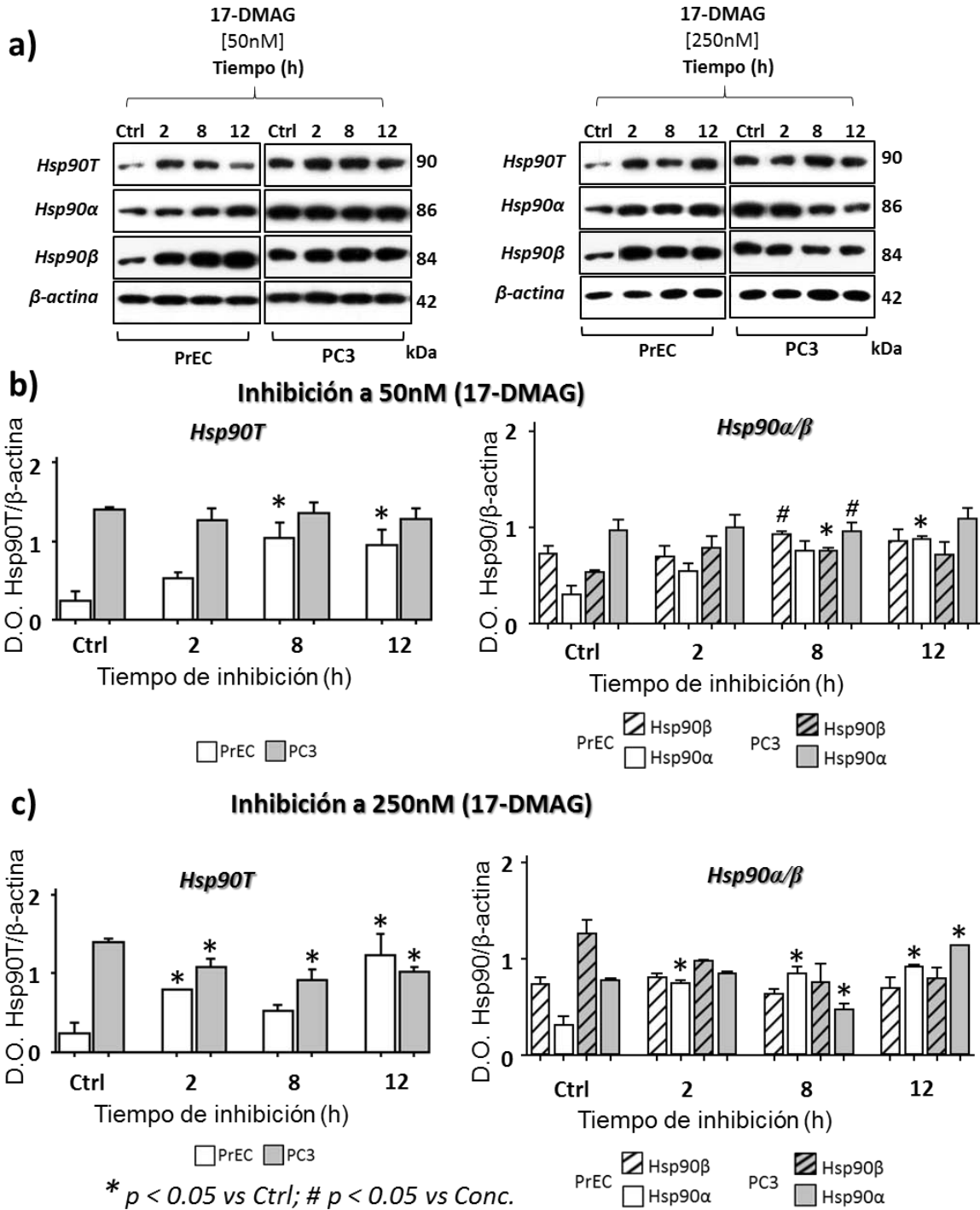


Figura 16. Perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90α y Hsp90β con el tratamiento (Hsp90i) en líneas celulares PrEC y PC3. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de PVDF, **a)** inmunoblot; densitometrías de las proteínas Hsp90 total, Hsp90α y Hsp90β, **b)** a 50nM y **c)** a 250nM de Hsp90i a diferentes tiempos (2, 8 y 12 horas). * $p \leq 0.05$ (t-student) comparados con su línea celular sin tratamiento, # $p \leq 0.05$ (t-student) comparado entre 50nM y 250nM.



Las concentraciones de 50 y 250nM del inhibidor 17-DMAG empleadas presentaron diferencias significativas entre sí, observado cambios en la expresión de Hsp90 β en la línea celular PrEC y Hsp90 α en la línea celular PC3, a 8 horas del tratamiento.

5. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp70 y Hsp27 en líneas celulares de próstata

La inhibición de Hsp90 con el 17-DMAG afectó la expresión de otras Hsp, incluyendo a las co-chaperonas Hsp70 y Hsp27 (figura 17a). A una concentración de 50nM (17-DMAG) no hubo cambios significativos ($p>0.05$) en la expresión de ambas proteínas (figura 17b).

Mientras que una inhibición con 250nM presentó cambios significativos ($p<0.05$), aumentando 10 veces la expresión de Hsp27 en la línea celular PrEC a partir de las 8 horas y manteniéndose a 12 horas. Así mismo, en la línea celular PrEC, la expresión de Hsp70 aumentó 2 veces ($p<0.05$) a partir de las 2 horas (figura 17c).

La expresión de Hsp27 y Hsp70 en la línea celular PC3 no presento cambios significativos ($p>0.05$) con el tratamiento (17b y 17c). En el análisis densitométrico se observan cambios significativos en la línea celular PrEC en la expresión de Hsp70 y Hsp27, aumentando más la expresión con una concentración del inhibidor a 250nM que con 50nM, siendo este efecto dosis dependiente.

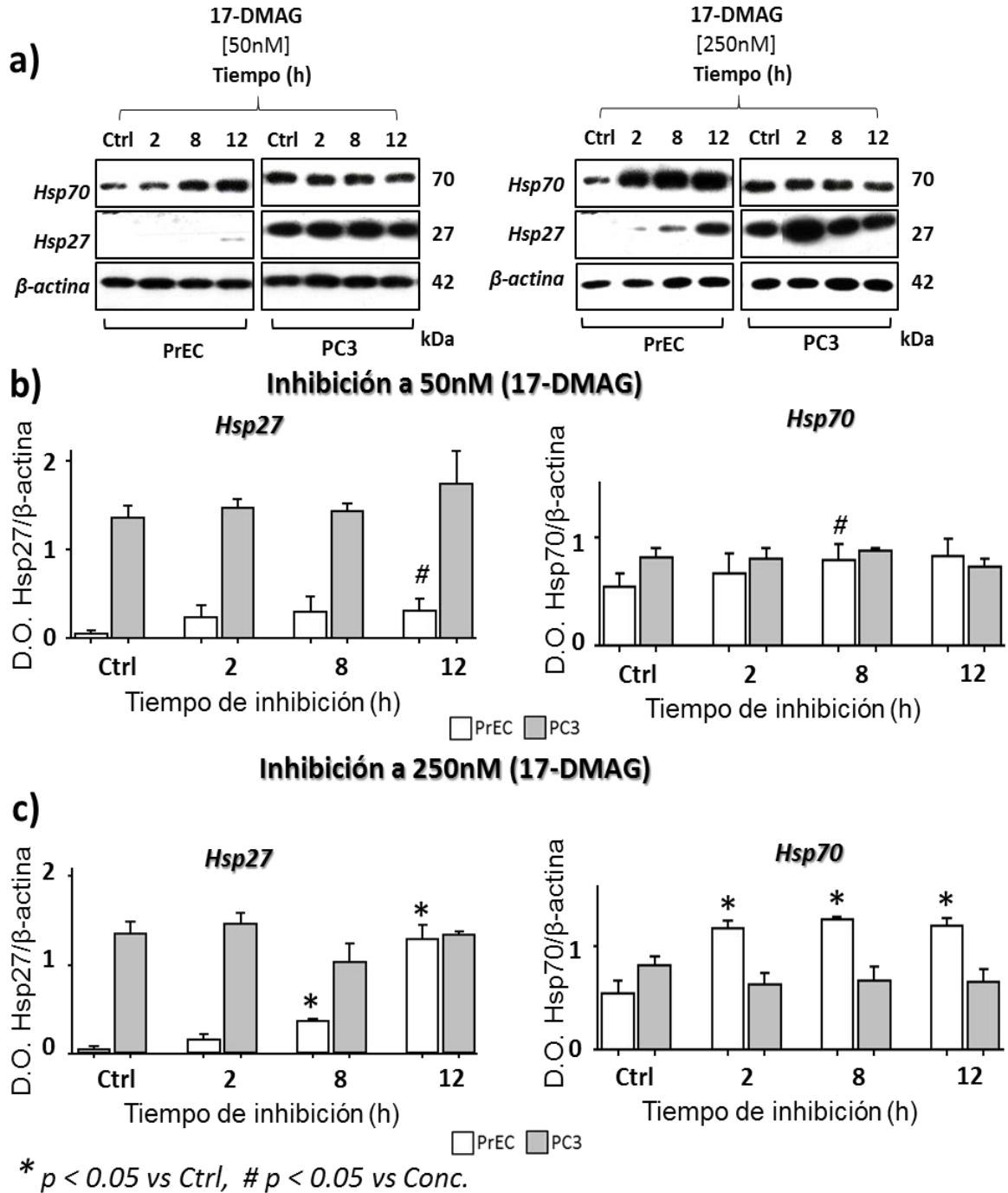


Figura 17. Perfil de expresión con el tratamiento del inhibidor (Hsp90i) en líneas celulares PrEC y PC3. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a membrana de PVDF, a) inmunoblot; densitometrías de las proteínas Hsp27 y Hsp70, b) a 50nM y c) a 250nM de Hsp90i a diferentes tiempos (2, 8 y 12 horas). * $p < 0.05$ (t-student) comparados con su línea celular sin tratamiento, # $p \leq 0.05$ (t-student) comparado entre 50nM y 250nM.

6. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de conformación monómero/dímero entre Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

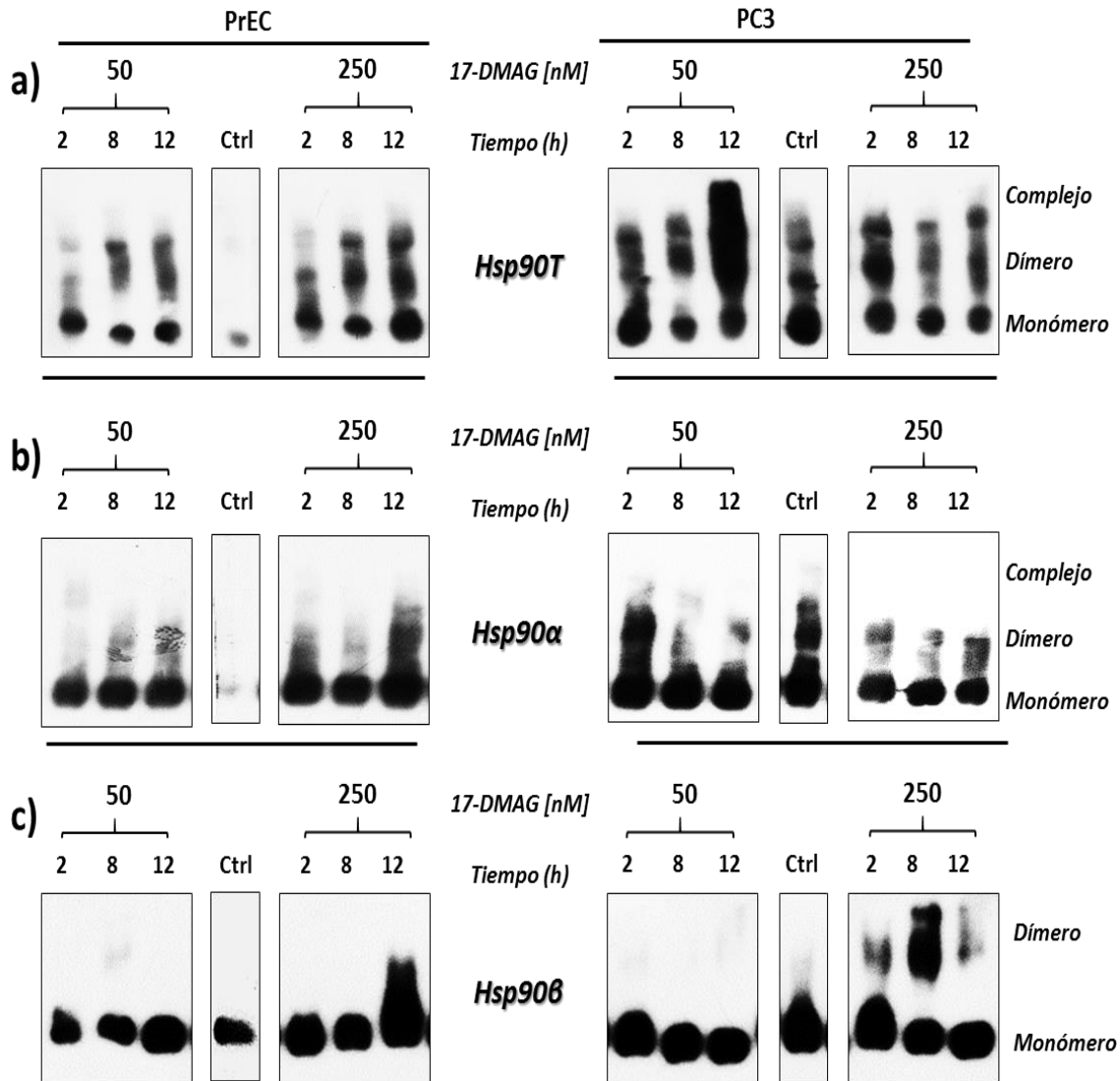


Figura 18. Perfil de conformación monómero/dímero de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β . Las proteínas fueron separadas mediante Native-PAGE y transferidas a membrana de PVDF, a), b) y c) inmunoblot de las proteínas Hsp90 total, Hsp90 α y Hsp90 β , tratada con 50nM y 250nM del Hsp90i y su efecto sobre su conformación monómero/dímero a diferentes tiempos (2, 8 y 12 horas).

Como muestran los resultados anteriores, la expresión de Hsp90 total no se ve afectada por Hsp90i. En la figura 18a se observa el efecto del inhibidor sobre la



conformación de Hsp90 total, ya que favorece el aumento de dímeros en la línea celular PrEC con el tratamiento. En la línea celular PC3 pareciera no afectar tanto la proporción monómero/dímero. El tratamiento a 12 horas con el inhibidor 17-DMAG a una concentración de 250nM exhibió cambios en la conformación de la isoforma Hsp90 α , en la línea celular PrEC aumentan los dímeros, mientras que en la línea celular PC3 disminuyen los dímeros (figura 18b). La inhibición de Hsp90 con una concentración de 250nM del inhibidor 17-DMAG indujo la formación de dímeros de Hsp90 β en ambas líneas celulares a 12 horas del tratamiento (figura 18c).

7. Efecto de Hsp90i sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

Para determinar la localización subcelular de las isoformas de Hsp90 se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para cada isoforma de Hsp90. En la figura 19a se observa que en la línea celular PrEC sin inhibidor 17-DMAG Hsp90 α y Hsp90 β no son abundantes y hay una localización difusa en toda la célula, aunque Hsp90 β se encuentra más en citoplasma. El tratamiento con 17-DMAG promueve un aumento de Hsp90 α y Hsp90 β en citoplasma y nuclear, además de una acumulación peri-nuclear (figura 19a).

La localización de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en la línea celular PC3 es citoplasmática y señal difusa en núcleo, solo Hsp90 α con focos (acumulación de proteína) (figura 19b). El tratamiento con 250nM del inhibidor 17-DMAG aumenta la localización de Hsp90 α y Hsp90 β en citoplasma, asimismo de acumulación peri-nuclear y moteado nuclear de Hsp90 α y la presencia de Hsp90 β en núcleo.

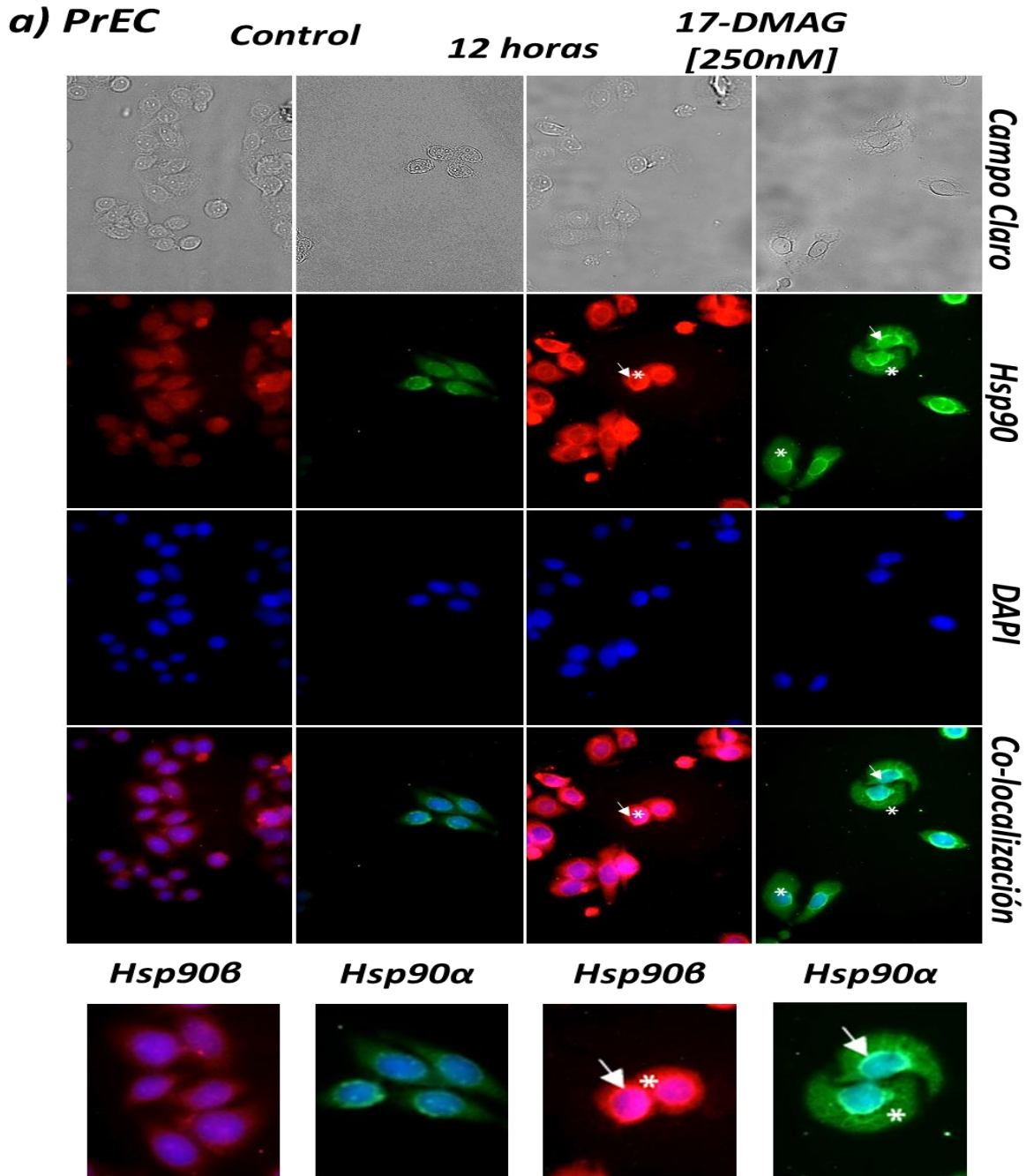


Figura 19. Efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β . Las células sembradas, control y tratadas con 17-DMAG [250nM] a 12h, fijadas en cubreobjetos, y se realizó la inmunofluorescencia, **a)** células PrEC, se determinó la localización de Hsp90 α (verde, AlexaFluor488) y Hsp90 β (rojo, AlexaFluor468), DAPI (azul). Hay una localización citoplasmica de ambas isoformas y una pequeña señal difusa en núcleo, la inhibición promueve un aumento en la localización citoplasmica y nuclear así como acumulación perinuclear de ambas isoformas. Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia (AxioImager, Zen Software, Carl Zeiss). * aumento de la localización, la flecha indica focos (acumulación) de la proteína.

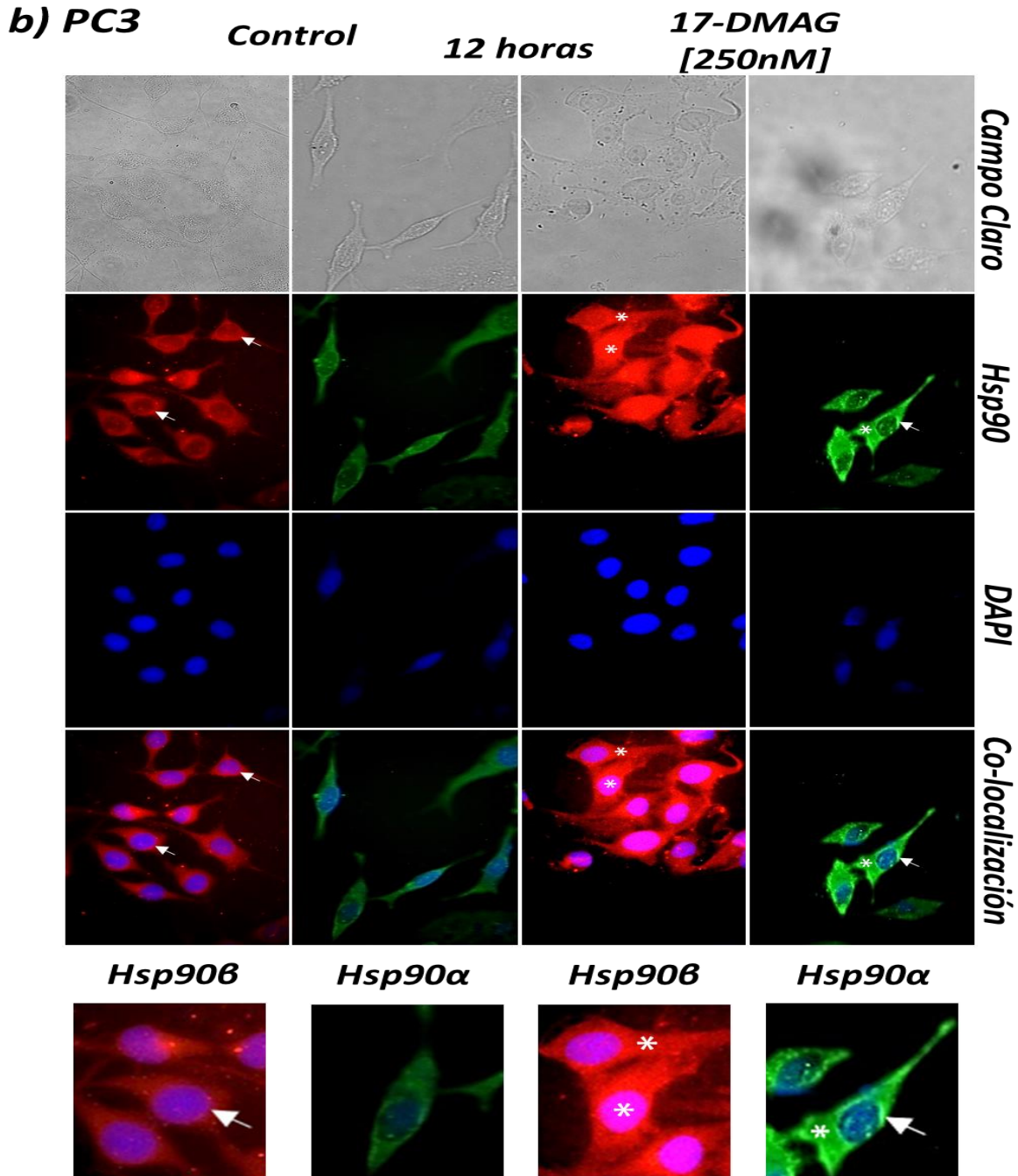


Figura 20. Efecto del inhibidor de Hsp90 sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β . Las células sembradas, control y tratadas con 17-DMAG [250nM] a 12h, fijadas en cubreobjetos, y se realizó la inmunofluorescencia, **b)** células PC3, se determinó la localización de Hsp90 α (verde, AlexaFluor488) y Hsp90 β (rojo, AlexaFluor468), DAPI (azul). Hay una localización citoplasmica de ambas isoformas y una pequeña señal difusa en núcleo, la inhibición promueve un aumento en la localización citoplasmica en ambas isoformas, además de una acumulación perinuclear y un moteado nuclear de Hsp90 α , mientras que Hsp90 β aumenta en núcleo. Imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia (Axiolmager, Zen Software, Carl Zeiss). * aumento de la localización, la flecha indica focos (acumulación) de la proteína.



XI. Discusión

En el presente proyecto se estableció un modelo anti-migratorio con el inhibidor 17-DMAG que nos permitió evaluar la implicación del perfil de expresión, conformación y localización de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata no tumoral y tumoral.

1. Perfil de expresión de Hsp90 α y de Hsp90 β en líneas celulares de tejido normal y de cáncer

El perfil de expresión de Hsp90 en diferentes líneas celulares de tejido normal y de cáncer no presentó un patrón único en la proteína Hsp90 total ni en sus principales isoformas, Hsp90 α y Hsp90 β . Sin embargo, en la línea celular tumoral 786-O se encontró que hay diferencia significativa en la expresión de Hsp90 β ($p < 0.05$) con respecto a la línea celular no tumoral renal HEK-293T. En la isoforma Hsp90 α se encontraron cambios significativos en las líneas celulares tumorales PC3 y C33A en comparación con su respectiva línea no tumoral.

Esto sugiere que la expresión de Hsp90 total y de sus isoformas Hsp90 α y Hsp90 β es diferentes entre las diferentes líneas celulares tumorales estudiadas. Existen reportes de la sobre-expresión de Hsp90 α donde se asocia con un pobre pronóstico en cáncer de mama (Jameel et al. 1992), carcinoma pancreático (Gress et al. 1994) y leucemias (Yufu et al. 1992). También hay estudios en cáncer de pulmón en donde se propone a Hsp90 α plasmática para predecir la respuesta a quimioterapia (Shi et al. 2014). La sobre-regulación de Hsp90 β se ha asociado con el grado patológico y estado clínico en pacientes con cáncer de pulmón (Biaoxue et



al. 2014), que podría ser utilizado en el futuro como un marcador diagnóstico y pronóstico¹⁰²⁻¹⁰⁶.

2. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la migración celular en líneas celulares de próstata

La línea celular PC3 presentó mayor capacidad que PrEC, al dar el tratamiento con el Hsp90i disminuye la migración celular principalmente en PC3.

Se ha reportado que Hsp90 extracelular aumenta la motilidad en células de cáncer de próstata (Hance et al. 2012), además de que induce la transición epitelio mesénquima (TEM). Hsp90 α es una de las isoformas que más se ha reportado con presencia extracelular atribuyéndosele un papel importante para la migración celular. En nuestro trabajo la abundancia de Hsp90 α en la línea celular PC3 plantea una posible función extracelular que promueva la migración celular, donde dicho efecto se abata con el tratamiento del Hsp90i^{47, 107-109}.

3. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

El tratamiento de 4 horas con 250nM del inhibidor 17-DMAG provocó cambios en el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata no tumoral y tumoral, PrEC y PC3, respectivamente.

Eskew, et al. reportaron en 2011 que no existen cambios en la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β cuando las líneas celulares PC3 y LnCap son tratadas con 10 μ M del inhibidor de Hsp90, 17-AAG, tiempo dependiente. Si comparamos las condiciones empleadas por Eskew y las empleadas en el presente



proyecto podemos destacar que el tratamiento de 4 y 8 horas con 250nM del 17-DMAG modifica la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β ; mientras que, a 24 horas con una concentración de 10 μ M del inhibidor 17-AAG, la célula no presenta cambios en la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , esta diferencia en la respuesta puede atribuirse a la diferencia entre los inhibidores empleados así como de la afinidad que cada uno por Hsp90¹¹⁰.

4. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90T, Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

El tratamiento con el inhibidor 17-DMAG a 250nM redujo la expresión de Hsp90 total en la línea celular PC3, mientras que en PrEC aumento la expresión de Hsp90 total a partir de las 2 horas del tratamiento. En 2005, Smith, et al. reportaron que el tratamiento del inhibidor 17-DMAG a 8 horas y concentración de 0.5 μ M disminuye la expresión de Hsp90T en líneas celulares MEXF 276L. El efecto de la inhibición de Hsp90 se observa en el ensayo de cierre de herida, en el cual la inhibición de Hsp90 disminuye la migración en comparación con su control. Este efecto es debido a que Hsp90 regula proteínas importantes que median la migración celular^{111, 112}.

La expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β es afectada a una concentración de 250nM de Hsp90i, presentando cambios significativos en la expresión de Hsp90 α en PrEC y PC3, a tiempos de 8 y 12 horas. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β es dependiente de tiempo y de concentración, así como del tipo de Hsp90i empleado. Esto es respaldado por



estudios de otros autores donde reportan diferencias en la afinidad de algunos Hsp90i por las isoformas de Hsp90^{7, 8, 110, 113}. La inhibición con 17-DMAG invirtió el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares PrEC y PC3, este efecto sugiere que la isoforma que se encontraba en menor proporción se indujo su expresión con el tratamiento para compensar las funciones que realizaba la isoforma con mayor expresión previo al tratamiento.

5. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp70 y Hsp27 en líneas celulares de próstata

La inhibición de Hsp90 con 250nM del inhibidor 17-DMAG indujo un aumento en la expresión de Hsp70 y Hsp27 en la línea celular PrEC. Por otra parte la inhibición con 50 y 250nM del inhibidor en la línea celular PC3 no presento cambios en la expresión de la proteína Hsp70 y Hsp27. Esto sugiere que a tiempos más largos de inhibición se presentarían un aumento en la expresión de Hsp70 y Hsp27.

Se ha reportado que el uso del inhibidor 17-DMAG aumenta la expresión del Hsf-1 lo que se traduce en aumento de diferentes proteínas dentro de las cuales se encuentran Hsp70 y Hsp27^{113, 114}.

6. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de conformación monómero/dímero entre Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

Los ensayos de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG mostraron que los niveles de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β es afectado de una manera tiempo-dependiente. Este efecto se asoció con una inversión en el estado



conformacional monómero/dímero de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β . La inversión del perfil de conformación de Hsp90 α y Hsp90 β obtenido difiere con lo reportado por otros autores, en donde no reportan cambios en la conformación posterior al tratamiento con el inhibidor de 17-DMAG Hsp90¹¹⁰.

7. Efecto de Hsp90i sobre la localización subcelular de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de próstata

La localización de Hsp90 α y Hsp90 β es afectada por el tratamiento con el inhibidor en PrEC y PC3. En la línea celular PrEC se observa una acumulación peri-nuclear en ambas isoformas con el tratamiento, mientras que en la línea celular PC3 la acumulación nuclear únicamente ocurre con la isoforma Hsp90 β , donde Hsp90 α aumenta su localización peri-nuclear y moteado nuclear. En ambas líneas celulares el inhibidor aumenta la localización citoplasmica de ambas isoformas.

La localización subcelular de Hsp90 α y de Hsp90 β es afectada en distintas líneas de cáncer. Una localización peri-nuclear y nuclear de Hsp90 sugiere una acumulación de HSF-1 para translocarse a núcleo, para una posterior transcripción de HSF-1, Hsp70, Hsp27 y Hsp90 y otras proteínas; también sugiere una acumulación de proteínas “cliente” de Hsp90 en retículo endoplásmico que no fueron plegadas adecuadamente y que serán degradadas vía proteosomal. También hay reportes de que inhibidores de Hsp90 inducen la formación de vacuolas que contienen proteínas mal plegadas. Una acumulación peri-nuclear y nuclear nos propone una posible actividad nuclear como por ejemplo transcripción de alguna proteína “cliente”, en el caso del cáncer de próstata podría tratarse de una translocación del receptor de andrógenos al núcleo¹¹⁵⁻¹¹⁸.



XII. Conclusiones

- 1) La inhibición de Hsp90 con 250nM del inhibidor 17-DMAG: a) disminuye la migración celular, e b) Invierte el perfil de expresión entre las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata no tumoral y tumoral, PrEC y PC3, respectivamente.

Lo anterior sugiere que existe un efecto compensatorio de la célula debido a la inhibición de Hsp90. En la línea celular no tumoral, PrEC, la inhibición provocó un aumento en Hsp90 α y una disminución de la expresión de Hsp90 β (Hsp90 α > Hsp90 β); mientras que en la línea celular tumoral, PC3, se observó el efecto contrario resultando en una proporción Hsp90 α > Hsp90 β .

- 2) La inhibición de Hsp90 con 250nM del inhibidor 17-DMAG: a) afecta el perfil de localización subcelular, y b) invierte el perfil de la conformación estructural monómero/dímero entre Hsp90 α y Hsp90 β en las líneas celulares de próstata no tumoral y tumoral, PrEC y PC3, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente la inversión del perfil conformacional entre Hsp90 α y Hsp90 β propone que la adicción a Hsp90 por la célula tumoral induce que la conformación menos activa de la isoforma Hsp90 β (monómero>dímero) cambie a una conformación activa o dimérica.

Como ya se ha reportado para otros inhibidores de Hsp90, es probable que la afinidad del inhibidor 17-DMAG sea dependiente de la abundancia entre las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β ; así como de la conformación monómero/dímero de la chaperona.



Los resultados del estudio proponen que la efectividad del tratamiento antitumoral conferida por los inhibidores de Hsp90 dependan de 3 factores: a) abundancia en la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β , b) estado conformacional de las isoformas, y c) localización subcelular de las chaperonas.

La diferencia de expresión entre Hsp90 α y Hsp90 β se ha asociado con una respuesta diferente de cada tipo de cáncer al tratamiento con los Hsp90i. Es por ello que el tratamiento antitumoral con Hsp90i en algunos cánceres exista una respuesta efectiva y en otros provoque o induzca una resistencia al tratamiento^{8, 13, 41}.



XIII. Perspectivas

Evaluar a tiempos y concentraciones mayores, y observar si el efecto observado en los perfiles de expresión, conformación y localización se mantiene o presentan cambios. Evaluar la localización de las isoformas de Hsp90 por Inmunofluorescencia en un ensayo de cierre de herida y observar si hay cambios, comparado con lo obtenido.

Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el estado conformacional de Hsp90 α y Hsp90 β , en los compartimientos celulares.

Evaluar a Hsp90 α y Hsp90 β extracelular y ver si juega un papel importante así mismo el efecto que tiene el inhibidor sobre la secreción de Hsp90.

Observar en otros tipos de cáncer el perfil de expresión, conformación y de localización subcelular de estas proteínas, tanto *in vitro* como *in vivo*, y observar el efecto con el tratamiento de 17-DMAG.

Comparar el efecto de diferentes Hsp90i en el perfil de expresión, conformación y localización subcelular.



XIV. Referencias

1. Welch J, Feramico R, Purification of the Major Mammalian Heat Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 257; 1982: 14949-14959.
2. Stebbins E, Russo A, Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89; 1997: 239–250.
3. Oossten H, Miromoto I, Transcellular chaperone signaling: an organismal strategy for integrated cell stress responses. *The Journal of Experimental Biology* 217; 2014: 129-136.
4. Miyata Y, Nakamoto H, The therapeutic target Hsp90 and cáncer hallmarks. *Current Pharmaceutical Design* 19; 2013: 347-365.
5. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cáncer: The Next Generation. *Cell* 144; 2011: 646-674.
6. Riggs D, Cox M, Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39; 2004: 279–295.
7. Patel D, Yan p, Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of Her2. *Nat Chem Biol* 9; 2013: 677-684.
8. Kamal A, Thao L, A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425; 2003: 407-410.
9. Jegou G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cáncer. *Cáncer Letters* 332; 2013: 275–285.



10. Zuo D, Subjeck J. Unfolding the Role of Large Heat Shock Proteins: New Insights and Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology* 7; 2016: 1-15.
11. Hahn G Li. Coexpression of Thermotolerance and Heat Shock Proteins in Mammalian Cells. *Radiation Research* 93; 1982: 452-457.
12. Richter K, Haslbeck M. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell* 40; 2010: 253-266.
13. Calderwood K, Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cáncer: It's a Protection Racket. *Trends in biochemical sciences* 41; 2016: 311-323.
14. Tsai M, Wang C, Chen J. Tumour suppressor HLJ1 a potential diagnostic, preventive and therapeutic target in non-small cell lung cáncer. *World J Clin Oncol* 5; 2014: 865-873.
15. Cagliari C, Tiroli O, Identification and in silico expression pattern analysis of Eucalyptus expressed sequencing tags (ESTs) encoding molecular chaperones. *Genetics and Molecular Biology* 28; 2005: 520-528.
16. Toivola D, Strnad P, Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends in Cell Biology* 20; 2010: 79-91.
17. Manjili M, Wang X. HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Journal of Immunology* 171; 2003: 4054-4061.
18. Nillegoda N, Kirstein J. Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. *Nature* 524; 2015: 247-251.



19. Kästle M, Grune T, Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 109; 2012: 113-160.
20. Lorenz O, Freiburger L. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein. *Molecular Cell* 53; 2014: 941-953.
21. Picard D, Khursheed B. Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348; 1990: 166-1668.
22. Neckers L, Workman P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?. *Clinical Cancer Research* 18; 2012: 64-76.
23. Bozaykut P, Ozer N, Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 77; 2014: 195–209.
24. Kityk R, Vogel R. Pathways of allosteric regulation in Hsp70 chaperones. *Nature Communications* 6; 2015.
25. Kityk R, Kopp J. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Molecular Cell* 48; 2012: 863-874.
26. Calabria G, Dolvoga O. Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *Journal of Evolutionary Biology* 25; 2012: 691-700.
27. Haldar S, Guptar A. Chaperonin-assisted protein folding: relative population of asymmetric and symmetric GroEL:GroES complexes. *Journal of Molecular Biology* 427; 2015: 2244-2255.
28. Ciocca F, Cappello F. Immense Cellular Implications Associated to Small Heat Shock Protein Expression: Impacts on Human Pathologies. *Frontiers in Clinical Drug Research Anti-cancer Agents* 2; 2015: 3-47.



29. Cortes G, Ramírez G, Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Revista de Investigación Clínica* 60; 2008: 311-320.
30. Johnson L, Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823; 2012: 607-613.
31. Csermely P, Schnaider T. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacology & Therapeutics* 79; 1998: 129-168.
32. Sato N, Torigoe T, The molecular chaperones in cell cycle control, *Annals of the New York Academic of Science* 851; 1998: 61-66.
33. Zhu H, Fang X. Membrane-bound heat shock proteins facilitate the uptake of dying cells and cross-presentation of cellular antigen. *Apoptosis*; 2015.
34. Schweinfest C, Graber M. Cloning and sequence analysis of Hsp89aDN, a new member of the Hsp90 gene family. *Biochimica et Biophysica acta* 1398; 1998: 18-24.
35. Zurawska A, Urbanki J. Hsp90n — An accidental product of a fortuitous chromosomal translocation rather than a regular Hsp90 family member of human proteome. *Biochimica et Biophysica acta* 1784; 2008: 1844-1846.
36. Grammatikakis N, Vultur A. The role of Hsp90N, a new member of the Hsp90 family, in signal transduction and neoplastic transformation. *The Journal of Biology Chemistry* 277; 2002: 8312-8320.
37. Milicevic Z, Bogojevic D. Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cáncer cells and its association with tumour progression. *International journal of Oncology* 32; 2008: 1169-1178.



38. Powers M, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *PEBS letters* 581; 2007: 3758-3769.
39. Lee C, Lin T. The Hexameric Structures of Human Heat Shock Protein 90. *PloS One* 6; 2011.
40. Chen B, Piel W. The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86; 2005: 627-637.
41. Sreedhar A, Kalmar E. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters* 562; 2004: 11-15.
42. Felts S, Owen B. The hsp90-related Protein TRAP1 Is a Mitochondrial Protein with Distinct Functional Properties. *The Journal of Biological Chemistry* 275; 2000: 3305-3312.
43. Jegu G, Hazoume R. Targeting HSP90 for cáncer therapy. *Cáncer letters* 332; 2013: 275-285.
44. Trepel J, Mollapour M, Targeting the dynamic Hsp90 complex in cáncer. *Nature Reviews* 10; 2010: 537-549.
45. Suzuki S, Kulkarni S. Extracellular heat shock protein HSP90 β secreted by MG63 osteosarcoma cells inhibits activation of latent TGF- β 1. *Biochemical and biophysical research communications* 398; 2010: 525-531.
46. Wong S, Jay G. Emerging roles of extracellular Hsp90 in cáncer. *Advances in cáncer research* 129; 2016: 141-163.
47. Hance W, Nolan D. The Double-Edged Sword: Conserved Functions of Extracellular Hsp90 in Wound Healing and Cáncer. *Cáncers* 6; 2014: 1065-1097.



48. McCreedy J, Wong S. An Impermeant Ganetespib Analog Inhibits Extracellular Hsp90-Mediated Cancer Cell Migration that Involves Lysyl Oxidase 2-like Protein. *Cancers* 6; 2014: 1031-1046.
49. Krone H, Sass B. HSP 90 alpha and HSP 90 beta genes are present in the zebrafish and are differentially regulated in developing embryos. *Biochemical and Biophysical research communications* 204; 1994: 746-752.
50. Nemoto T, Sato N. Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *The Biochemical Journal* 330; 1998: 989-995.
51. Jing L, Joanna S. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica acta* 1823; 2012: 624-635.
52. Scheufler C, Brinker A. Structure of TPR Domain–Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70–Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell* 101; 2000: 199-210.
53. Pearl L, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90. *Current opinion in Structural Biology* 10; 2000: 46-51.
54. Zhao R, Davey M, Navigating the chaperone network: an integrative Map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell* 120; 2005: 714-727.
55. Young C, Moarefi I. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154; 2001: 267-273.
56. Zhang L, Nephew K. Regulation of Death-associated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 282; 2007: 11795-11804.



57. Jiang B, Xiao W. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell stress and chaperones* 10; 2010: 252-262.
58. Sangster T, Queitsch S. Hsp90 and Chromatin: Where Is the Link?. *Cell cycle* 2; 2003: 166-168.
59. Li J, Richter K. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nature structural & molecular biology* 18; 2011:61-66.
60. Kubota H, Yamamoto S. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. *Cell stress and chaperones* 15; 2010: 1003-1011.
61. Richter K, Muschler P. Sti1 Is a Non-competitive Inhibitor of the Hsp90 ATPase. *The journal biological chemistry* 278; 2003: 10328-10333.
62. Prodromou C, Siligardi G. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *The EMBO journal* 18; 1999: 754-762.
63. Wandinger S, Suhre M. The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *The EMBO journal* 25; 2006: 375-376.
64. Catlett M, Kaplan K. Sgt1p Is a Unique Co-chaperone That Acts as a Client Adaptor to Link Hsp90 to Skp1p. *The journal biological chemistry* 281; 2006: 33739-33748.
65. Retzlaff M, Hagn F. Asymmetric Activation of the Hsp90 Dimer by Its Cochaperone Aha1. *Molecular cell* 37; 2010: 344-354.



66. Meyer P. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *The EMBO journal* 23; 2004: 1402-1410.
67. McLaughlin S, Sobott F. The Co-chaperone p23 Arrests the Hsp90 ATPase Cycle to Trap Client Proteins. *J Mol Biol* 356; 2006: 746-758.
68. Roe M, Ali M. The Mechanism of Hsp90 Regulation by the Protein Kinase-Specific Cochaperone p50cdc37. *Cell* 116; 2004: 87-98.
69. Pearl L, Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual Review of Biochemistry* 75; 2006: 271-294.
70. Hsp90Int.db: the comprehensive interactome built with data from public protein-protein interaction databases and the literature (Echeverría et al., 2011; see also its associated database at <http://www.picard.ch/Hsp90Int>).
71. Arlander A, Felts S. Chaperoning Checkpoint Kinase 1 (Chk1), an Hsp90 Client, with Purified Chaperones. *The journal biological chemistry* 281; 2006: 2989-2998.
72. Morishima Y, Murphy P. Stepwise Assembly of a Glucocorticoid Receptorzhsp90 Heterocomplex Resolves Two Sequential ATP-dependent Events Involving First hsp70 and Then hsp90 in Opening of the Steroid Binding Pocket. *The journal biological chemistry* 275; 2000; 18054-18060.
73. Kosano H, Stensgard B. The Assembly of Progesterone Receptor-hsp90 Complexes Using Purified Proteins. *The journal biological chemistry* 273; 1998: 32973-32979.
74. Caplan A, Mandal A. Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends in cell biology* 17; 2006: 87-92.



75. Gou Y, Guettouche T. Evidence for a Mechanism of Repression of Heat Shock Factor 1 Transcriptional Activity by a Multichaperone Complex. *The journal biological chemistry* 276; 2001: 45791-45799.
76. Nadeum K, Das A. Hsp90 Chaperonins Possess ATPase Activity and Bind Heat Shock Transcription Factors and Peptidyl Prolyl Isomerases. *The journal of biological chemistry* 268; 1993: 1479- 1478.
77. Zou J, Gou Y. Repression of heat shock transcription factor Hsf-1 activation by Hsp90 (Hsp90 complex) that forms a stress-sensitive complex with Hsf-1. *Cell* 94; 1998: 471-480.
78. Barrera C, Perez V. Intra-renal transfection of heat shock protein 90 alpha. *Nephrology dialysis, transplantation European renal association* 29; 2014: 301-312.
79. Dutta D, Chatopadhyay S. Active Participation of Cellular Chaperone Hsp90 in Regulating the Function of Rotavirus Nonstructural Protein 3 (NSP3). *The journal of biological chemistry* 286; 20011: 20065-20077.
80. Whitesell L, Lindquist L. HSP90 and the chaperoning of cáncer. *Nature reviews cáncer* 5; 2005: 761-772.
81. Powers V, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrine-related cáncer* 13; 2006: S125-135.
82. Calderwood K, Khaleque A. Heat shock proteins in cáncer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in biochemical sciences* 31; 2006: 164-172.
83. Dominietto M, Tsinoremas N, Capobianco E. Integrative analysis of cáncer imaging readouts by networks. *Molecular Oncology* 9; 2015: 1-16.



84. Westerheide D, Morimoto I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *The journal biological chemistry* 280; 2005: 33097-33100.
85. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cáncer. *Cell* 100; 2000: 57-70.
86. Informe mundial sobre el cáncer 2014, International Agency for Research on Cáncer, IARC. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
87. WHO International Agency of Research on Cáncer [Base de datos en línea]. Francia; c2012- Julio 2015. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cáncer.aspx
88. WHO International Agency of Research on Cáncer [Base de datos en línea]. Francia; c2012- Julio 2015. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
89. WHO International Agency of Research on Cáncer [Base de datos en línea]. Francia; c2012- Julio 2015. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=484.
90. Jiménez-Ríos MA, Solares-Sánchez M, Martínez-Cervera P, Aguilar-Ponce JL, Martínez-Cedillo J, Hinojosa-Gómez J, Rivera-Rubí L y Zamora-Moreno J. *Cáncerología* 6; 2011: 13 – 18.
91. Wang Y, Trepel J. STA-9090, a small-molecule Hsp90 inhibitor for the potential treatment of cáncer. *Current opinion in investigational drugs* 11; 2010: 1466-1476.



92. Peng R, Li Z. The HSP90 inhibitor 17-PAG effectively inhibits the proliferation and migration of androgen-independent prostate cancer cells. *American journal of cancer research* 5; 2015: 3198-3209.
93. Xu W, Targeting the Molecular Chaperone Heat Shock Protein 90 Provides a Multifaceted Effect on Diverse Cell Signaling Pathways of Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 14; 2007:1625-1629.
94. Millson H, Truman W. Expressed as the sole Hsp90 of yeast, the α and β isoforms of human Hsp90 differ with regard to their capacities for activation of certain client proteins, whereas only Hsp90 β generates sensitivity to the Hsp90 inhibitor radicicol. *The FEBS Journal* 274; 2007: 4453-4463.
95. Zubriene A, Gutkowska M. Thermodynamics of radicicol binding to human Hsp90 alpha and beta isoforms. *Biophysical Chemistry* 152; 2010: 153–163.
96. DeBoer C, Meulman A. Geldanamycin, a new antibiotic. *The journal of antibiotic* 23; 1970: 442-447.
97. Supko G, Hickman L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 36; 1995: 305-315.
98. Patki M, Pawar S. HSP90: chaperone-me-not. *Pathology oncology research* 19; 2013: 631-640.
99. Ho N, Li A. Heat shock protein 90 and role of its chemical inhibitors in treatment of hematologic malignancies. *Pharmaceuticals* 5; 2012: 779-801.
100. Jhaveri K, Chandarlapaty S. A phase II open-label study of ganetespib, a novel. *Clinical breast cancer* 14; 2014: 154-160.



101. Seo Y. Organelle-specific Hsp90 inhibitors. Archives of pharmacal research 38; 2015: 1582-1590.
102. Jameel A, Skilton R. Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cáncer. International Journal of cáncer 50; 1992: 409-415.
103. Gress M, Friederike M. Differential Expression of Heat Shock Proteins in Pancreatic Carcinoma. Cáncer research 54; 1994: 547-551.
104. Yufu Y, Nishimura J. High constitutive expression of heat shock protein 90 α in human acute leukemia cells. Leukemia Research 16; 1992: 597-605.
105. Shi Y, Liu X. Plasma Levels of Heat Shock Protein 90 Alpha Associated with Lung Cáncer Development and Treatment Responses. Clinical cáncer research 20; 2014: 6016-6022.
106. Biaoxue R, Chongchong Z. Identification and verification of Hsp90-beta as a potential serum biomarker for lung cáncer. Am J Cáncer Res 4; 2014: 874-885.
107. Hance M, Dole K. Secreted Hsp90 Is a Novel Regulator of the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Prostate Cáncer. J Biol Chem 287; 2012: 37732–37744.
108. Jayaprakash P, Dong H. Hsp90 α and Hsp90 β together operate a hypoxia and nutrient paucity stress-response mechanism during wound healing. Journal of cell science 128; 2015: 1475-1480.
109. Li W, Sahu D. Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cáncer. Biochimica et biophysica acta 1823; 2012: 730-741.

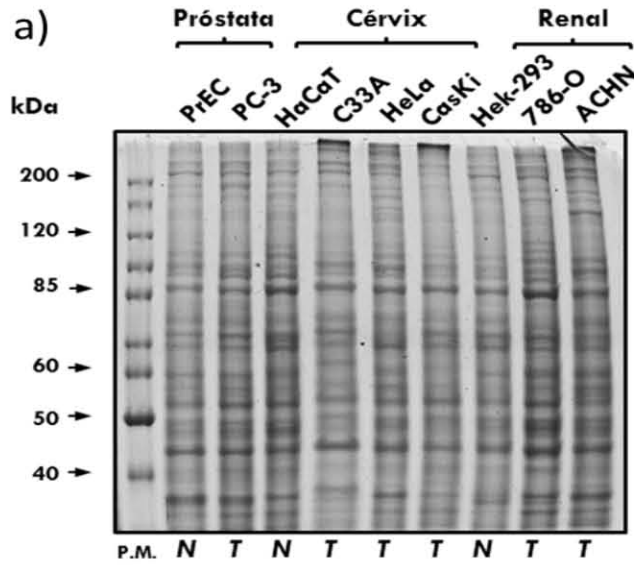


110. Eskew D, Sadikot T. Development and characterization of a novel C-terminal inhibitor of Hsp90 in androgen dependent and independent prostate cáncer cells. *BMC cáncer* 11; 2011.
111. Smith V, Sausville A. Comparison of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17DMAG) and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) in vitro: effects on Hsp90 and client proteins in melanoma models. *Cáncer chemotherapy and pharmacology* 56; 2005: 126-137.
112. Tian Z, Liu Y. Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* 12; 2004: 5317-5329.
113. McCollum K, Teneyck J. Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxy geldanamycin through a glutathione-mediated mechanism. *Cáncer research* 66; 2006: 10967-10975.
114. Wang X, Chen M. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cáncer therapy. *International journal of oncology* 45; 2014: 18-30.
115. Stacchiotti A, Rezzani R. Cell-specific expression of heat shock transcription factors 1 and 2 in unstressed rat spinal cord. *Neuroscience Letters* 268; 1999: 73-76.
116. Mimnaugh G, Xu W. Endoplasmic Reticulum Vacuolization and Valosin-Containing Protein Relocalization Result from Simultaneous Hsp90 Inhibition by Geldanamycin and Proteasome Inhibition by Velcade. *Molecular cáncer research* 4; 2006: 667-681.

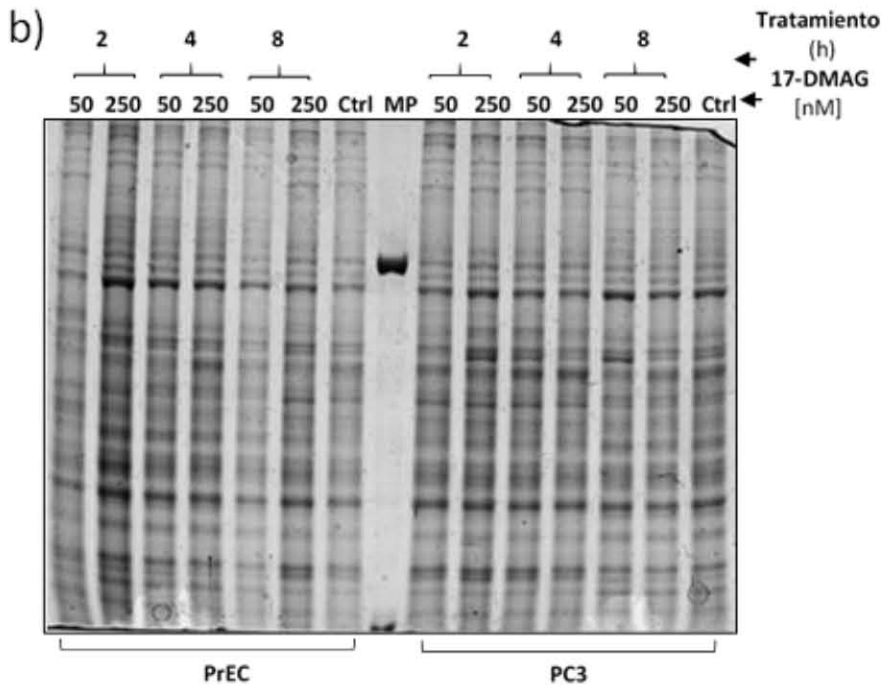


117. Mimnaugh G, Xu W. Simultaneous inhibition of hsp90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* 3; 2004: 551-556.
118. Calderwood K, Neckers L. Hsp90 in cáncer: transcripcional roles in the nucleus. *Advances in cáncer research* 129; 2016: 89-106.

XV. Anexos



N: Línea celular no tumoral, T: Línea celular tumoral



Gel al 10%

PrEC (Normal Human Prostate Epithelial Cells)
PC-3 (Human Prostate Cancer Cells)

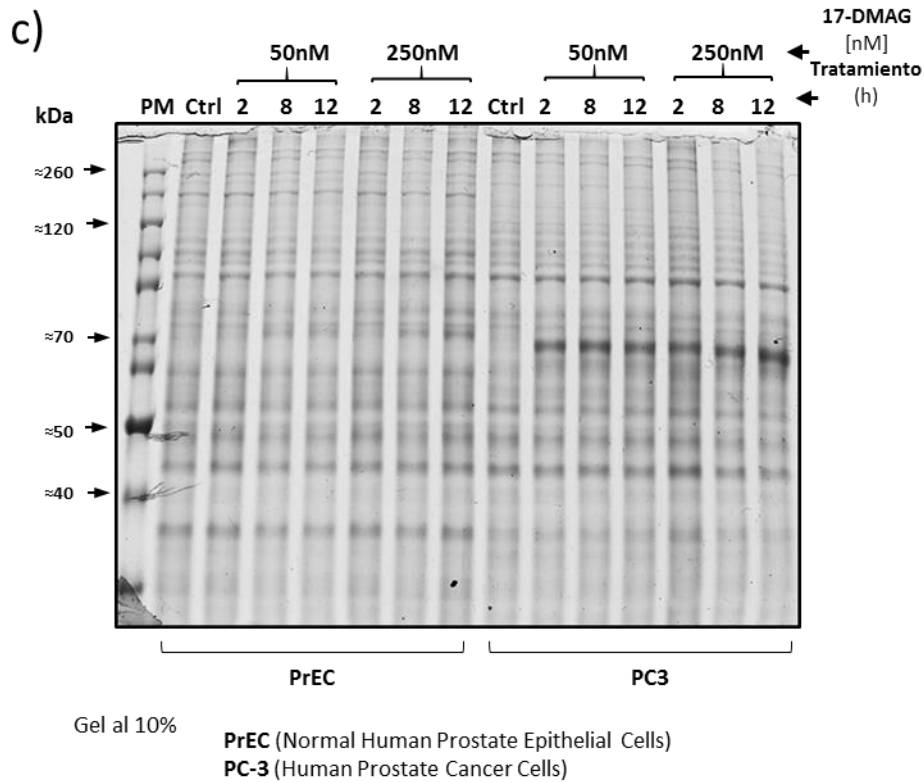


Figura 21. Gel de integridad de los extractos proteicos. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y tinción del gel con azul de coomassie, a) gel de integridad de líneas celulares tumorales y no tumorales b) y c) gel de integridad de líneas celulares PrEC y PC3 tratadas con el inhibidor 17-DMAG a diferentes tiempos.

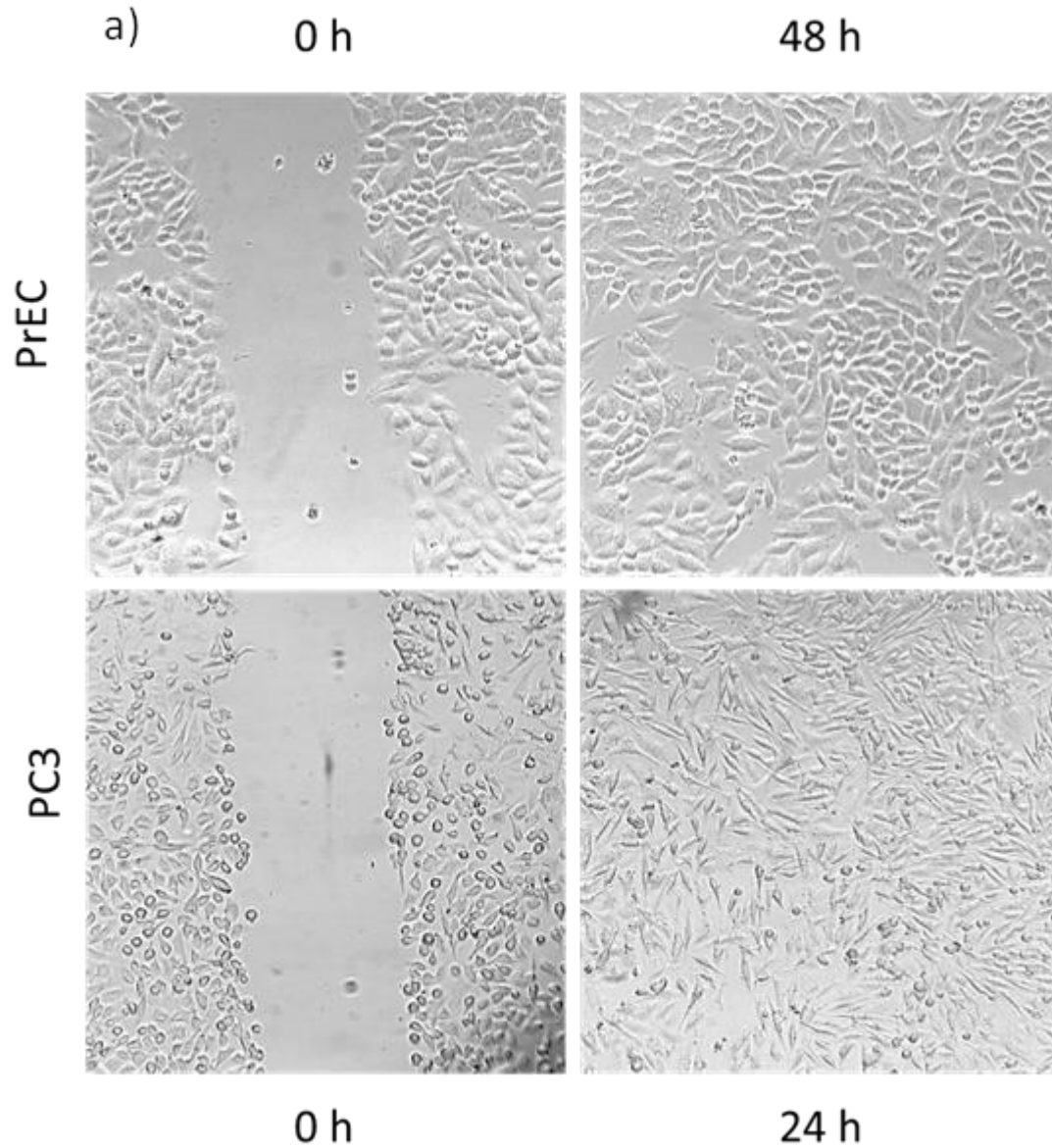


Figura 2. Control de migración celular en líneas celulares de próstata. Ensayo de cierre de herida, **a)** células PrEC (normal) y **b)** células PC3 (tumoraes), se observó el cierre de herida a las 48h y a las 24h respectivamente.