



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP90 α Y
HSP90 β DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE ESFEROIDES DE CÁNCER
DE PRÓSTATA CON DIFERENTE SENSIBILIDAD A ANDRÓGENOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. FLORES HERNÁNDEZ ILSE MARIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OFICIO CPCB/1107/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de septiembre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **FLORES HERNÁNDEZ ILSE MARIANA** con número de cuenta **517007624**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP90 α Y HSP90 β DURANTE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE ESFEROIDES DE CÁNCER DE PRÓSTATA CON DIFERENTE SENSIBILIDAD A ANDRÓGENOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DRA. FLORIA JOSEFINA LIZARRAGA SÁNCHEZ
Secretario: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
Suplente: DRA. NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 20 de noviembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo y su formación académica que me brindaron durante esta etapa; así como a su cuerpo docente y administrativo por la orientación.

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

A la Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval y a la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas por sus siempre acertadas contribuciones al proyecto y a mi trabajo; así como por ser fuente de admiración tanto académica como personalmente.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Carlo César Cortés González por guiarme en este camino e inculcarme el amor a la ciencia.

Agradecimientos a título personal

A mis papás, por siempre apoyarme en todos mis planes y por alentarme y sentirme apapachada aún a la distancia cuando tenía un mal día, por consentirme cuando iba a casa e inyectarme de energía para poder aguantar todo. Porque no soy nada sin ellos.

A Ivan, por seguir caminando tomado de mi mano; por siempre mantenerme fuerte, por hacerme sentir cada día la mejor bióloga del mundo aun cuando ni yo lo creía así; y por escuchar mis quejas y hacerme ver las cosas bajo otra perspectiva y siempre hacerme ver el lado positivo.

A mi familia, los que son mi pilar en esta vida, y los que me han hecho ser lo que soy; a Mami y a mi Abuelo; a mis tíos, a mis primos y a Berny. Que espero que cada logro mío lo sientan como suyo.

A mis amigos de siempre y de años que siempre me escribían para saber de mi y para echarme porras en cada momento

A mis amigos del laboratorio: Lalo, Gabby, Fer, Emmanuel; por ser mi familia lejos de mi familia. Y a Lari que fue esencial para completar esta etapa, por acompañarme en el laboratorio más de 12hrs y hacer la maestría menos pesada; porque probablemente sola me hubiera vuelto loca.

A los chaperonólogos por siempre crear un buen ambiente dentro del laboratorio. Y al Doc Carlo por hacerme crecer con sus aportaciones tanto académica como personalmente y por darme la oportunidad de pertenecer a un grupo de investigación tan bonito.

A todos y cada uno, por formar parte de mi árbol; por siempre alimentar mis raíces de experiencias y cariño, de buenos momentos y de buenos recuerdos.

Porque ustedes hacen bella la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
Cáncer de Próstata	6
Tumorigénesis en cáncer de próstata	6
Implicación de Hsp90 en la estabilidad del Receptor de Andrógenos.....	12
Receptor de andrógenos y Hsp90 en cáncer.....	13
Proteínas de choque térmico de 90kDa (Hsp90).....	14
Inhibición farmacológica de Hsp90 como blanco terapéutico en CP.....	15
Proteínas de choque térmico de 90kDa: Hsp90 α y Hsp90 β	16
ANTECEDENTES.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
METODOLOGÍA	25
I. Cultivo celular.....	25
Establecimiento de cultivo primario derivado de tumor de paciente con CP.....	26
II. Formación de esferoides para líneas celulares de CP.....	26
Ensayos de viabilidad y de muerte celular en cultivos 3D.....	27
III. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	28
IV. Inmunodetección de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , y GAPDH mediante Western Blot	28
V. Recuperación e inclusión en parafina de esferoides de cáncer de próstata.....	29
VII. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG, en líneas celulares de CP.....	30
VIII. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG en la formación de esferoides de CP.....	31
RESULTADOS	32

I. Establecer un modelo de esferoides 3D a partir de líneas de cáncer de próstata (CP) con distinta sensibilidad a andrógenos.	32
II. Determinar la susceptibilidad del inhibidor, 17-DMAG en el cambio de perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en líneas celulares de cáncer de próstata.....	¡Error! Marcador no definido.
III. Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 en la formación de esferoides de CP con distinta sensibilidad a andrógenos.	37
IV. Determinar el papel de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la formación de esferoides de cáncer de próstata.	44
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	54
LITERATURA CITADA.....	55
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	63

Unidades de Medición

µg.- Microgramo(s)

kDa. - Kilodaltones

aa. - Aminoácidos

µm. – Micrómetros

nM. - Nanomolar

Proteínas

Hsp. – Proteína de Choque Térmico (del inglés Heat Shock Protein)

Hsp90. – Proteína de Choque Término de 90 kDa

Hsp90 α . - Proteína de Choque Término de 90 kDa, isoforma alfa

Hsp90 β . -Proteína de Choque Término de 90 kDa, isoforma beta

ATP. – Trifosfato de Adenosina

ADP. – Difosfato de Adenosina

AKT. – Proteína Cinasa B

RA. – Receptor de andrógenos

V-RA. – variante del Receptor de Andrógenos

Materiales y Métodos

SFB. - Suero Fetal Bovino

DMEM. - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

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

F12K. - Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium

L-15. - Leibovitz

17-DMAG. - 17- (2-dimetil-aminoetil)-amino-17-dimetoxi-geldanamicina (17-DMAG)

WB. - Western Blot

IHQ. - Inmunohistoquímica

Procesos

iHsp90. - Inhibidor de Hsp90

CP. – Cáncer de próstata

CPP. – Cultivo Primario derivado de Paciente con Cáncer de próstata.

R RESUMEN

Introducción. A pesar de los avances actuales y tratamientos contra el cáncer de próstata, la progresión clínica de un estadio clínico hormono-sensible (CPHS) a hormono-resistente (CPHR) ocurre en un 80% de los pacientes y este se ha visto asociado con una señalización sostenida del RA, dada por mutaciones en éste o por su activación por proteínas río arriba como el caso de AKT.

En la práctica clínica, se han desarrollado múltiples terapias dirigidas a distintas vías de señalización, donde los inhibidores de la proteína de choque térmico de 90 kDa han sido propuestos considerando que Hsp90 media la estabilidad y activación de diversas oncoproteínas incluidas AKT y el RA antes y durante la hormono-resistencia.

Dentro de la familia de Hsp90, dos de las isoformas citosólicas más abundantes Hsp90 α y Hsp90 β , aunque poseen el 86% de identidad, poseen algunas diferencias, entre ellas su conformación dimérica o monomérica, que han mostrado conferir diferente susceptibilidad a los inhibidores y diferente afinidad por determinadas proteínas cliente.

Anteriormente, nuestro grupo de investigación demostró que Hsp90 α y Hsp90 β pueden regular de manera diferencial la actividad de la proteína cinasa AKT. En este contexto, durante la progresión de CPHS a CPHR, las isoformas Hsp90 podrían jugar un papel diferencial en la vía de activación del RA y determinar su capacidad de formar esferoides.

Objetivo. Determinar la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en la formación de esferoides de cáncer de próstata con diferente sensibilidad a andrógenos.

Métodos. Se formaron esferoides con líneas celulares de cáncer de próstata: PC3 (resistente a andrógenos), LNCaP (sensible a andrógenos) y un cultivo primario derivado de paciente con cáncer de próstata. El proceso de formación se confirmó mediante microscopía de contraste de fase, y las zonas necróticas, se determinaron mediante el ensayo de viabilidad LIVE/DEAD. El efecto de la inhibición de Hsp90, se determinó mediante el tamaño y la citoarquitectura de esferoides empleando curvas de tiempo-respuesta con 17-DMAG (inhibidor de Hsp90), 250nM. El perfil de expresión Hsp90 α y Hsp90 β se evaluó mediante Western Blot e inmunohistoquímica.

Resultados. Ambas líneas celulares (PC3 y LNCaP) así como el cultivo primario derivado de paciente de Cáncer de próstata (CPP) poseen la capacidad de formar tumores. La inhibición de Hsp90 tuvo diferentes respuestas en las 3 estirpes celulares (PC3, LNCaP, CPP). A) La capacidad de formar esferoides disminuyó en la línea celular PC3, de la misma manera que la expresión de Hsp90 α . B) En la línea celular LNCaP, la expresión de Hsp90 α y la capacidad para formar esferoides se incrementaron, aunque se perdió la citoarquitectura distintiva. C) Finalmente, el tratamiento con inhibidor de Hsp90 resultó en un retraso en la formación de esferoides hasta las 48h. Por otro lado, Hsp90 β se mantuvo constante en las 3 líneas celulares.

Conclusión. Los niveles disminuidos de Hsp90 α causada por la inhibición de Hsp90 se asoció con una pérdida de formación de esferoides, mientras que un incremento en sus niveles

aumenta la capacidad de conformación de esferoides. Dicha sensibilidad a la inhibición se encontró relacionada con la agresividad, así como con la resistencia a andrógenos de la línea celular. Por otro lado, las 2 líneas, así como el cultivo primario, poseen la capacidad de mantener los niveles de expresión de Hsp90 β constantes.

Finalmente, la subpoblación de células muertas de los cultivos de LNCaP y CPP se vio afectada al perder la localización en el centro del esferoide y se pudo observar una reducción en la viabilidad de los esferoides tratados con iHsp90, 17-DMAG.

ABSTRACT

Introduction. Clinical progression in Prostate Cancer (PC) from a hormone-sensitive (HSPC) to hormone-resistant (HRPC) clinical stage is associated with adaptative changes in the androgen receptor (AR), leading to a sustained AR signaling.

In clinical practice, multiple therapies have been developed to target signaling pathways including AR, where heat shock protein 90kDa inhibitors have exhibited promising results. However, studies have suggested that some Hsp90 inhibitors could act selectively over Hsp90 alpha and Hsp90 beta isoforms and could affect differently the expression and activity of Hsp90 isoforms and their client proteins. Our research group, have demonstrated previously that Hsp90 α and Hsp90 β regulate the AKT protein in an opposite manner. In this context, during progression of HSPC to HRPC, Hsp90 isoforms could play a differential role over AKT protein and determine the adaptive changes of AR in tumorigenesis.

Objective. To determine the Hsp90 α and Hsp90 β isoforms expression in the formation and growth of prostate cancer spheroids with different androgen sensibility

Methods. 3D-spheroids were achieved with two prostate cancer cell lines: PC3 (androgen resistant), LNCaP (androgen sensitive), and a primary culture derivate from prostate cancer patient. The formation process was confirmed by phase-contrast microscopy, and live and dead cell zones were determined by Live/Dead viability assay. The susceptibility to Hsp90 inhibition was determine by size and cytoarchitecture of 3D-spheroids employing time-response curves with 17-DMAG (Hsp90 inhibitor), 250nM. Hsp90 α and Hsp90 β expression profile was evaluated by western blot and immunohistochemistry assays.

Results. Both cell lines (PC3 y LNCaP) and the primary culture (CPP) had the ability to form spheroids. Hsp90 inhibition had different responses in 3D-spheroids of prostate cancer cells. a) The ability to form spheroids were decreased in the PC3 cell line, in the same way as the expression of Hsp90 α b) In the LNCaP cell line, the expression of Hsp90 α and the capacity to form 3D-spheroids were increased, although the distinguishing cytoarchitecture was lost. c) Finally, the 17-DMAG treatment resulted in a spheroid formation delay, and a peak of Hsp90 α levels at 48h in CPP. On the other hand, the expression of Hsp90 β remained constant in all the three cell lines.

Conclusion. Hsp90 α down-expression caused by Hsp90 inhibition was associated with a loss of spheroid formation while its up-regulation rises the capacity of 3D-spheroid conformation although its cytoarchitecture was modified. That sensibility to Hsp90 inhibition was related with an aggressive phenotype along with the androgen resistant cells probably because its increase dependence to Hsp90.

Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CP) es el segundo tipo de cáncer mayormente diagnosticado en hombres a nivel mundial. Se estima que al menos cada año 1.1 millones de hombres presentan esta enfermedad y al menos 30,000 morirán por esta causa (GLOBOCAN, 2012).

Durante la carcinogénesis del CP, las células tumorales requieren de testosterona para su crecimiento y proliferación; dado lo anterior, la terapia de privación de andrógenos como terapia de primera línea ha sido utilizada por más de 60 años; en donde la respuesta de los pacientes a esta terapia determina la progresión de la enfermedad (Pienta, *et al.*, 2006).

Tumorigénesis en cáncer de próstata

La tumorigénesis es un proceso multi-pasos comprendido entre la etapa de iniciación y la etapa de promoción de un tumor; este proceso puede ser explicado como un fenómeno evolutivo dado por selección natural. En este proceso, las células comienzan a comportarse como individuos independientes y a competir por recursos, sobreviviendo aquella célula de cáncer que tenga la capacidad de iniciar un tumor, determinado por su potencial tumorigénico. Dicho potencial brinda ventajas adaptativas para promover el crecimiento tumoral, y es definido por diversos factores tanto del microambiente tumoral como de la célula de cáncer *per se* (Yakota, 2000, Bernard y Weinberg., 2002, Ashkenazi.*et al.*, 2008, Friedmann-Morvinski, *et al.*, 2014)

En cáncer de próstata (CP), el proceso de tumorigénesis puede ser iniciado por una hiperplasia prostática; proceso patológico que puede desencadenar en la progresión de la enfermedad y determinar su malignidad. En este caso la progresión tumoral inicia como un carcinoma *in situ* y cursa por una etapa de desdiferenciación de la célula de cáncer hasta la progresión de un tumor metastásico.

En etapas tempranas, el CP puede ser detectable mediante el antígeno prostático sérico o examen digital rectal, y confirmado por estudios de histopatología a partir de una biopsia del tumor (Ballisteri, *et al.*, 2014).

Como se muestra en la *Figura 1*, la progresión del CP cursa inicialmente por un cuadro clínico asintomático, continuando con un cuadro sintomático. Durante la etapa asintomática, la prostatectomía es el tratamiento de primera línea con intenciones curativas, pudiendo estar acompañado de radioterapia y terapia hormonal o anti-androgénica como abiraterona. Sin embargo, después de un periodo de 18 a 24 meses, el 80% de los pacientes progresa a una etapa metastásica de la enfermedad; donde el CP se denomina hormono-resistente (CPHR) (Moro, *et al.*, 2011). En esta etapa, el tratamiento de segunda línea es basado en quimioterapia con intenciones paliativas con el propósito de aumentar la sobrevida del paciente. (Jiménez, *et al.*, 2011). La progresión del CP es caracterizada por el desarrollo de resistencia a tratamientos hormonales y quimioterapia, conferida por una serie de alteraciones genéticas acumuladas de la célula, implicadas en la resistencia a andrógenos y en la tumorigénesis (Stavridi, *et al.*, 2010).

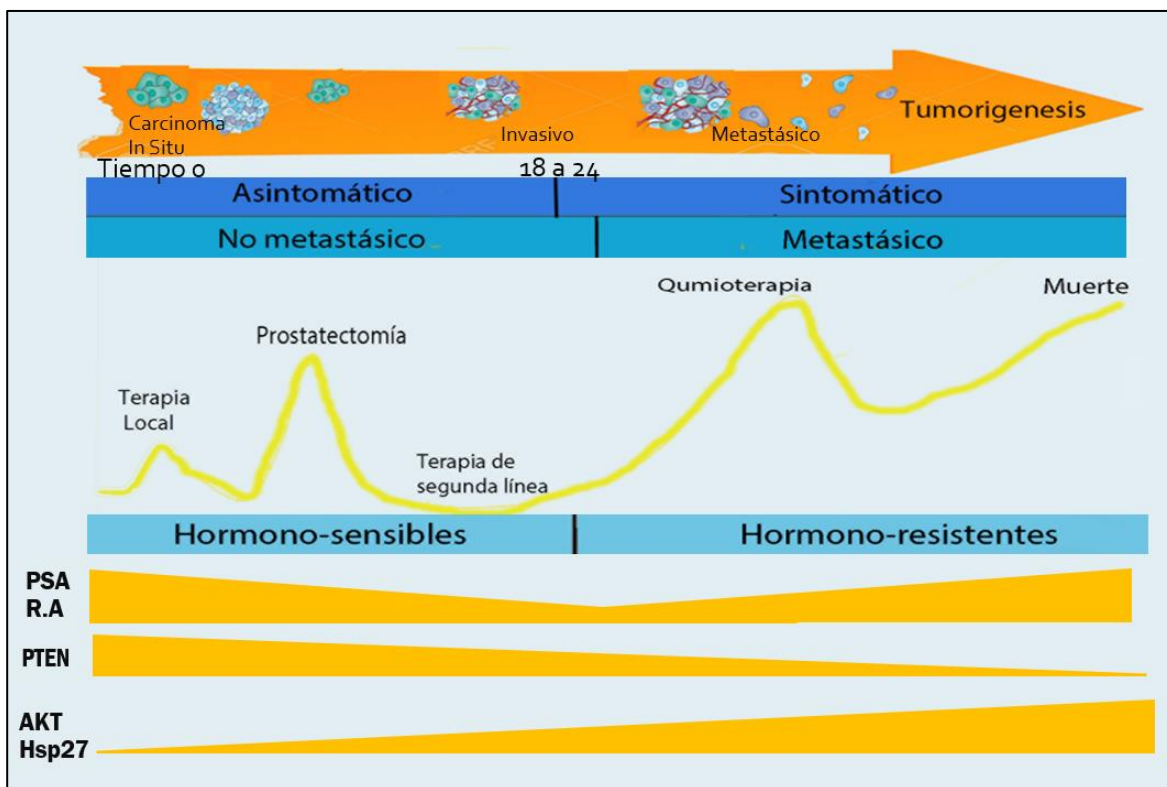


Figura 1. Progresión “típica” de la enfermedad en cáncer de próstata. En la parte central, se muestran en una línea amarilla los tratamientos de primera y segunda elección dependiendo si el paciente ha desarrollado resistencia a la privación de andrógenos. En barras amarillas se representa el cambio de las principales moléculas involucradas en la progresión: PSA (Antígeno prostático sérico), RA (Receptor de andrógenos), PTEN, AKT y Hsp27. (Modificado de Bryant, et al., 2017)

En los últimos años, el CPHR se ha abordado a nivel molecular con la finalidad de estudiar los mecanismos de resistencia y de bloquear vías de señalización que permiten la progresión del tumor hormono-sensible a hormono-resistente y que dictaminan la etapa clínica metastásica. Los mecanismos de resistencia en el CPHR tienen como resultado final la independencia total de andrógenos, y se han descrito 4 vías principalmente, representadas en la Figura 2 (Pienta K.J., 2006):

- 1) **Amplificación del Receptor de Andrógenos (RA).** Amplificación del gen o una sobreexpresión de la proteína es uno de los mecanismos para la activación de esta vía aún a bajas concentraciones de andrógenos, por ejemplo, en el caso de pacientes castrados; la amplificación del RA ilustra la presión selectiva por mantener la vía activa.
- 2) **Receptor de Andrógenos promiscuo.** Aunque el RA es activado específicamente por la testosterona y la Dihidrotestosterona (DHT), se han descrito diversas mutaciones que puede conducir a la activación del receptor por moléculas no androgénicas presentes normalmente en circulación, así como cambiar la interacción entre componentes del complejo transcripcional y estimular el crecimiento celular (Taplin, et al., 2004).
- 3) **Vía no dependiente de andrógenos.** Se ha descrito que moléculas no esteroideas, como factores de crecimiento desregulados (EGF, IGF-1, KGF) y citosinas(IL-6) pueden fosforilar directamente al receptor de andrógenos y activar al RA. Aunque el crecimiento y proliferación de las células tumorales ya no son controlados por andrógenos, la maquinaria del receptor de andrógenos permanece activa. La activación de esta vía remarca la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo de CPHR.
- 4) **Vía independiente de ligando.** Finalmente, la vía del receptor de andrógenos puede ser completamente sobrepasada, y las células de próstata pueden desarrollar la habilidad de sobrevivir independientemente de ligando.

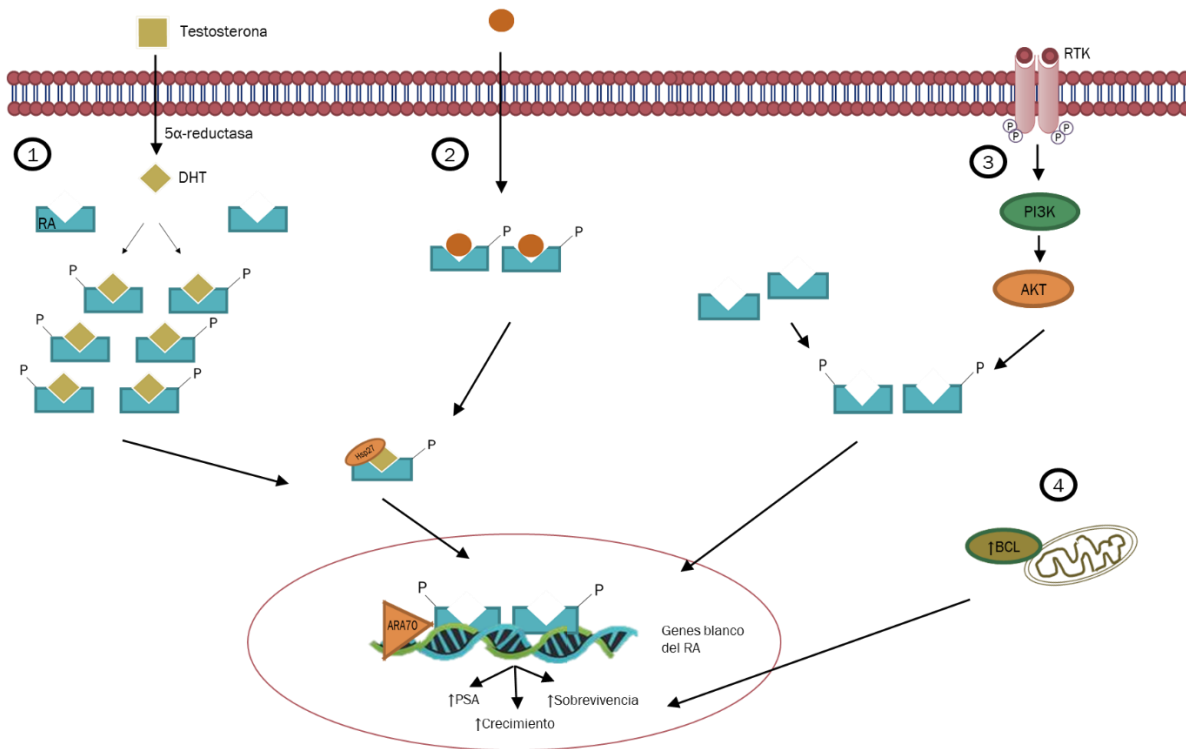


Figura 2. Mecanismos moleculares de resistencia a andrógenos en CPHR. (1) Amplificación del Receptor de Andrógenos (RA), (2) RA promiscuo, (3) Vía no dependiente de andrógenos (4) Vía independiente de ligando. Modificado de Pienta, *et al.*, 2006.

Dado los mecanismos de resistencia antes descritos, las investigaciones actuales dirigen su investigación a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que logren inhibir diversas vías de señalización y proteínas clave para disminuir los niveles del RA.

A nivel molecular se han propuesto inhibidores de la biosíntesis de andrógenos (abiraterona o ketoconazol), así como moléculas anti androgénicas (enzalutamida) así como inhibidores de la 5α-reductasa, para evitar la activación del receptor de andrógenos (Trump, *et al.*, 1989). Por otro lado, los antagonistas del receptor de andrógenos como MDV-3100 o BMS641988 (Mukherji, *et al.*, 2008), también han mostrado buenos resultados en pacientes con CPHS, pero una vez que la vía del RA se vuelve totalmente independiente de ligando el

único tratamiento actual para tratar de aumentar la sobrevida es la radioterapia (Chen, et al., 2008).

Algunos otros tratamientos se han desarrollado para inhibir otras vías independientes del RA, como es la de algunas tirosinas cinasas como SRC con resultados poco alentadores (Twardowska, et al., 2013). En este aspecto, los inhibidores de las proteínas de choque térmico de 90kDa (Hsp90) han sido recientemente propuestos como blanco terapéutico, no solo por mediar la estabilidad y activación del RA sino también por tener como proteínas “cliente” a diferentes moléculas de vías importantes en la progresión del cáncer de próstata como es el caso de SRC y AKT; antes y durante la hormono-resistencia (Miyata, et al., 2013, Azad, et al., 2014) (Figura 3)

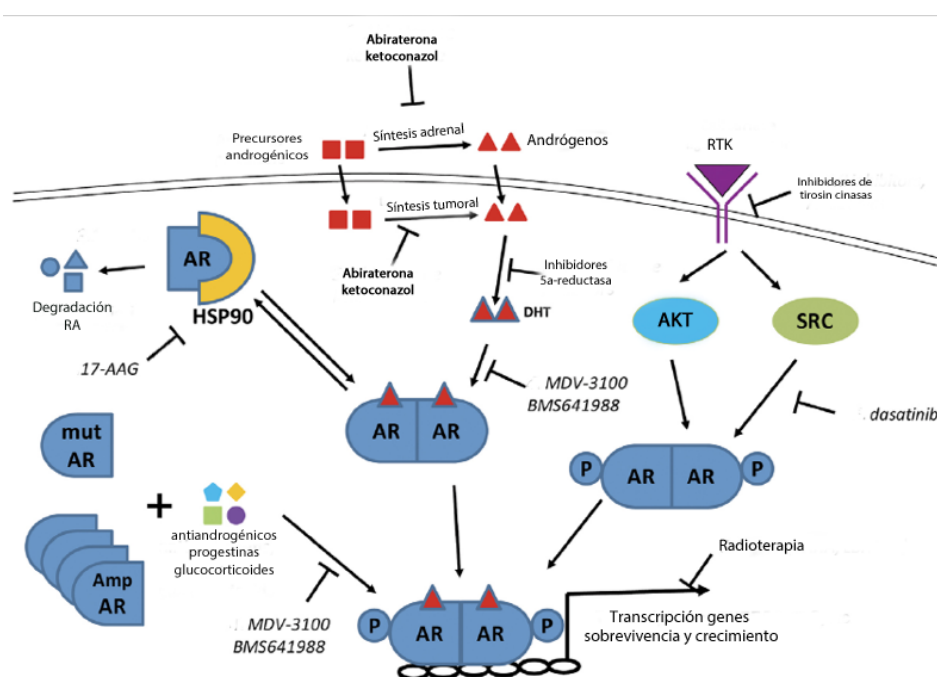


Figura 3. Blancos terapéuticos actuales de la vía del RA. Se muestran, las principales vías de activación del receptor de andrógenos, así como los fármacos actuales dirigidos a estas vías; incluyendo la inhibición de Hsp90 (Modificado de Chen, et al., 2008)

Implicación de Hsp90 en la estabilidad del Receptor de Andrógenos.

Dentro de las proteínas clientes de Hsp90, existen un gran número de factores de transcripción y cinasas involucradas en la transducción de señales, así como numerosos receptores hormonales esteroideos dentro de los que se encuentra el receptor de andrógenos (Lu, *et al.*, 2012).

Diversos estudios han demostrado que para que la unión eficiente del receptor de andrógenos con su ligando, éste debe estar en complejo con Hsp90 y sus co-chaperonas: Hsp70, una proteína que contenga un dominio J como Hsp40; el complejo RA/maquinaria chaperona, mantiene al receptor en una correcta conformación y en un estado responsivo a hormonas. Por otro lado, la asociación de Hsp90 con el RA evita que el receptor pueda interactuar con los elementos de reconocimiento del DNA (elementos de respuesta) cuando no están en complejo con su ligando esteroideo (Smith y Toft; 2008, Echeverría y Piccard; 2010, Krishna, *et al.*, 2012)

La unión a ligando induce un cambio conformacional del receptor provocando la disociación del complejo con Hsp90 llevando a la dimerización del RA, la interacción con sus coactivadores y la unión al DNA llevando a la activación de sus genes blanco dentro de los que se encuentran genes que mantienen el crecimiento celular y la proliferación en cáncer de próstata hormono sensible y hormono resistente (Evans, 1988).

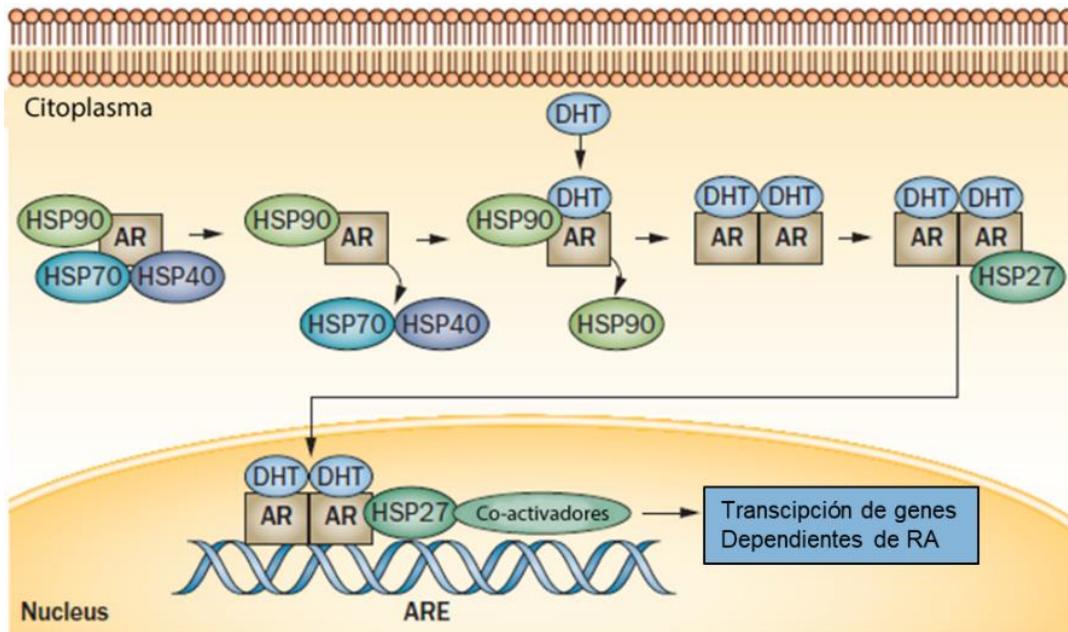


Figura 4. Estabilización del RA por Hsp90. El receptor de andrógenos es estabilizado por el complejo de Hsp90, manteniendo la afinidad a su ligando principal, Dihidrotosterona (DHT). La unión de Hsp27 permite la translocación al núcleo del RA, posterior unión a sus elementos de respuesta (ARE) y la transcripción de los genes dependientes del RA. Tomado de (Azad, *et al.*, 2014)

Receptor de andrógenos y Hsp90 en cáncer.

Aproximadamente del 20 al 30% de las mutaciones identificadas del receptor de andrógenos, incrementan la promiscuidad del RA o pueden mejorar la transactivación por interacción alterada con reguladores. Se ha demostrado que algunas de estas variantes (ARV567es y AR-V7) son inducidas por castración como respuesta adaptativa permitiendo el crecimiento sostenido (Gillis, *et al.*, 2013).

Algunas de estas variantes del receptor de andrógenos conducen a la pérdida del dominio de unión a ligando produciendo factores transcripcionales que pueden ser activados en ausencia de ligando y son resistentes a tratamientos agonistas a DHT (Ferraloeschi, *et al.*, 2016).

Proteínas de choque térmico de 90kDa (Hsp90).

Hsp90 es una chaperona molecular esencial para la sobrevivencia celular, siendo específica y selectiva de sus proteínas blanco conocidas como proteínas “cliente”; dentro de la cuales se han descrito más de 200 proteínas, incluidas una gran variedad de proteínas, dentro de las que se encuentran: a) proteínas cinasas como AKT, mTOR b) Factores transcripcionales como p53 c) Receptores esteroideos (Receptor de andrógenos, receptor de estrógenos) (Zhao, *et al.*, 2005; Den y Lou., 2012).

La familia de las proteínas Hsp90 pertenece a una familia multigénica conformada por 5 isoformas: Grp94, Hsp90N, TRAP1, Hsp90 α y Hsp90 β , siendo estas dos últimas las que conforman el 80% de esta familia, llegando a constituir aproximadamente del 1-2% de la proteína citosólica total en condiciones normales y hasta un 15% en condiciones de estrés (Sreedhar, *et al.*, 2004).

Hsp90 desempeña funciones esenciales para mantener la homeostasis celular, tales como el plegamiento *de novo* de proteínas durante el proceso de síntesis ribosomal, la translocación de proteínas a través de membranas y es responsable de mantener algunas de sus proteínas “cliente” en un plegamiento funcional; así como favorecer la degradación de éstas, a través de la vía ubiquitina-proteasoma.

Específicamente durante el proceso de tumorigénesis, la intervención de Hsp90 promueve la acumulación de mutaciones que conducen a la generación de nuevos fenotipos tumorales; este proceso está dado por la estabilización de proteínas mutadas, por parte de

la chaperona Hsp90, lo cual permite la función autónoma de señales inestables de crecimiento. (Wu, *et al.*, 2017) Dado lo anterior, las proteínas de choque térmico Hsp90 han sido descritas por Calderwood (Calderwood, *et al.*, 2005) como las “capacitoras de la evolución”.

El enfoque de las Hsp90 como blanco terapéutico para diferentes tipos de Cáncer, ha sido ampliamente estudiado a través de su inhibición farmacológica, la cual conduce a la desestabilización de sus proteínas cliente, llevándolas a su degradación vía proteosomal.

Inhibición farmacológica de Hsp90 como blanco terapéutico en CP.

Los primeros inhibidores de Hsp90 incluían a la geldanamicina y radicicol (Whitesell, *et al.*, 1994), ambos tienen como blanco el sitio de unión del nucleótido del dominio N-terminal con mayor afinidad que el ATP o ADP. De manera general, los inhibidores de Hsp90 aumentan el reclutamiento de ligasas de ubiquitina llevando a la degradación vía proteosomal de sus proteínas cliente.

Recientemente, se han desarrollado análogos a la geldanamicina, dada la alta toxicidad y baja solubilidad de los inhibidores de primera generación. Algunos de estos análogos 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG; Tenespimicina) y dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG; Alveespimicina), así como moléculas sintéticas de estos inhibidores como Ganetespib (STA-9090 [5-[2,4-Dihydroxy-5-(1-methylethyl) phenyl]-4-(1-methyl-1H-indol-5-yl)-2,4-dihydro-[1,2,4]triazol-3-one], han demostrado disminuir la toxicidad, así como aumentar su solubilidad y tener

100 veces una mayor afinidad por las células de cáncer que por las células normales. (Miyata, *et al.*, 2013).

A pesar del perfeccionamiento de estos fármacos, estudios clínicos no han mostrado resultados alentadores. Específicamente en pacientes (n=17) con CPHR, que previamente habían sido tratados con quimioterapia con docetaxel se les administró ganetespib (200mg/m²), un inhibidor de Hsp90, los pacientes no mostraron aumentar la sobrevida ni mostraron disminuir los niveles de marcadores de progresión como el PSA (Thakur, *et al.*, 2016, Oh, *et al.*, 2011, Heath, *et al.*, 2008).

Algunos estudios han sugerido que la falla en estos resultados podría deberse a que algunos inhibidores pueden actuar selectivamente por alguna de las isoformas citosólicas de Hsp90: Hsp90 α o Hsp90 β , pudiendo afectar de manera diferencial la expresión y actividad de sus proteínas cliente incluyendo el receptor de andrógenos (Prince *et al.*, 2015).

Proteínas de choque térmico de 90kDa: Hsp90 α y Hsp90 β .

Las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β conforman el 80% de la subfamilia Hsp90, llegando a constituir aproximadamente del 1-2% de la proteína citosólica total en condiciones fisiológicas y hasta un 15% en condiciones de estrés, incluyendo el cáncer (Wu, *et al.*, 2017, Sreedhar, *et al.*, 2004) Aunque estas isoformas poseen un 86% de identidad, presentan diferencias a distinto niveles, que se resumen en la tabla 1 (Milicevic, *et al.*, 2007, Hyun Lee *et al.*, 2015, Rong, *et al.*, 2014).

Isoforma Hsp90	Hsp90α	Hsp90β
Secuencia de aminoácidos	732 aminoácidos	724 aminoácidos
Localización en el genoma humano	14q32-2	6p21.1
Gen codificante	HSP90AA1	HSP90AB1
Principal conformación estructural	Dimérica	Monomérica
Nivel de expresión	Inducible	Constitutiva
Principal asociación clínica en cáncer	Progresión de tumores	Resistencia a tratamientos

Tabla 1. Principales diferencias funcionales entre las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β .

Algunas diferencias entre isoformas como su conformación dimérica o monomérica, han mostrado conferir diferente susceptibilidad a los inhibidores; lo que podría conferir a los inhibidores diferente afinidad por determinadas proteínas cliente. (Sreedhar, *et al.*, 2004, Milicevic, *et al.*, 2008, Lee, *et al.*, 2015, McDowell, *et al.*, 2009).

El proceso de estabilización, maduración y activación del receptor de andrógenos depende de la chaperona molecular Hsp90, siendo la inhibición de Hsp90 un tratamiento prometedor para pacientes con este padecimiento (Chen, *et al.*, 2008)

Algunos estudios como el de Krishna y colaboradores (2012) han demostrado que el uso de inhibidores de Hsp90 como la geldanamicina y el radicicol a concentraciones mínimas inhibitorias, desestabiliza a los receptores hormonales de manera ligando independiente; inhibiendo la proliferación de la línea LNCaP, y asociándose con un arresto celular en G0-G1. (Krishna *et al.* 2012)

Otros estudios (Gillis, *et al.*, 2013, Ferraloeschi, *et al.*, 2016), empleando inhibidores de nueva generación de Hsp90 en variantes del RA, demuestran que existe una reducción a nivel de proteínas del v-RA aunque no la que se observa con el receptor de andrógenos silvestre (RAwt). Por otro lado, se observa que existe una inhibición de la translocación al núcleo del RA con el iHsp90 mientras que las variantes del receptor (v-RA) se siguen translocando al núcleo aun en presencia del iHsp90.

En estudios del grupo de investigación de Gillis (Gillis, *et al.*, 2013) en cultivos primarios de próstata empleando el iHsp90, AUY922, se observó una tendencia a disminuir el nivel proteico del receptor de andrógenos WT mientras que se observa un aumento a nivel de mRNA; explicada por una degradación del RA por la iHsp90 el cual regula negativamente su transcripción.

Se ha descrito que uno de los mecanismos de resistencia a andrógenos recae sobre la activación del RA dependiente de la oncoproteína Akt (vía 4 en la *Figura 2*). En este aspecto, nuestro grupo de investigación demostró que las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β regulan de manera diferencial la actividad de la proteína Akt, donde Hsp90 α promueve su activación por fosforilación, mientras que Hsp90 β la previene (Cortés-González, *et al.*, 2010).

Por otro lado, en estudios previos del grupo de investigación, se demostró que la inhibición farmacológica de Hsp90 (17-DMAG, a concentraciones mínimas inhibitorias) en líneas celulares de CP, produce un cambio en el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β . De manera interesante, se observó que el aumento de la proteína Hsp90 α fue directamente proporcional al tiempo de inhibición de Hsp90 en las líneas celulares de PrEC (línea de próstata normal) y PC3. Por el contrario, la línea celular DU145 solo aumentó la abundancia de Hsp90 α después de 18h de tratamiento con el iHsp90. De manera interesante, después de 72h de tratamiento con el iHsp90, la expresión de Hsp90 α fue reestablecida.

En el mismo estudio, la abundancia de la isoforma Hsp90 β mostró un ligero aumento como consecuencia del iHsp90 en la línea PrEC (línea celular de próstata normal). Por otro lado, no se observaron cambios significativos de Hsp90 β en la línea PC3. Cabe destacar que el tratamiento con el iHsp90, 17-DMAG indujo una disminución en la abundancia de Hsp90 β en la línea celular DU145 (RA+). De igual manera, este cambio también presentó cambios a nivel funcional con la pérdida de la capacidad migratoria de las líneas PC3 y DU145, con menor susceptibilidad por la línea celular normal de próstata PrEC. (*Figura 5*) (Mejía-Hernández, 2016).

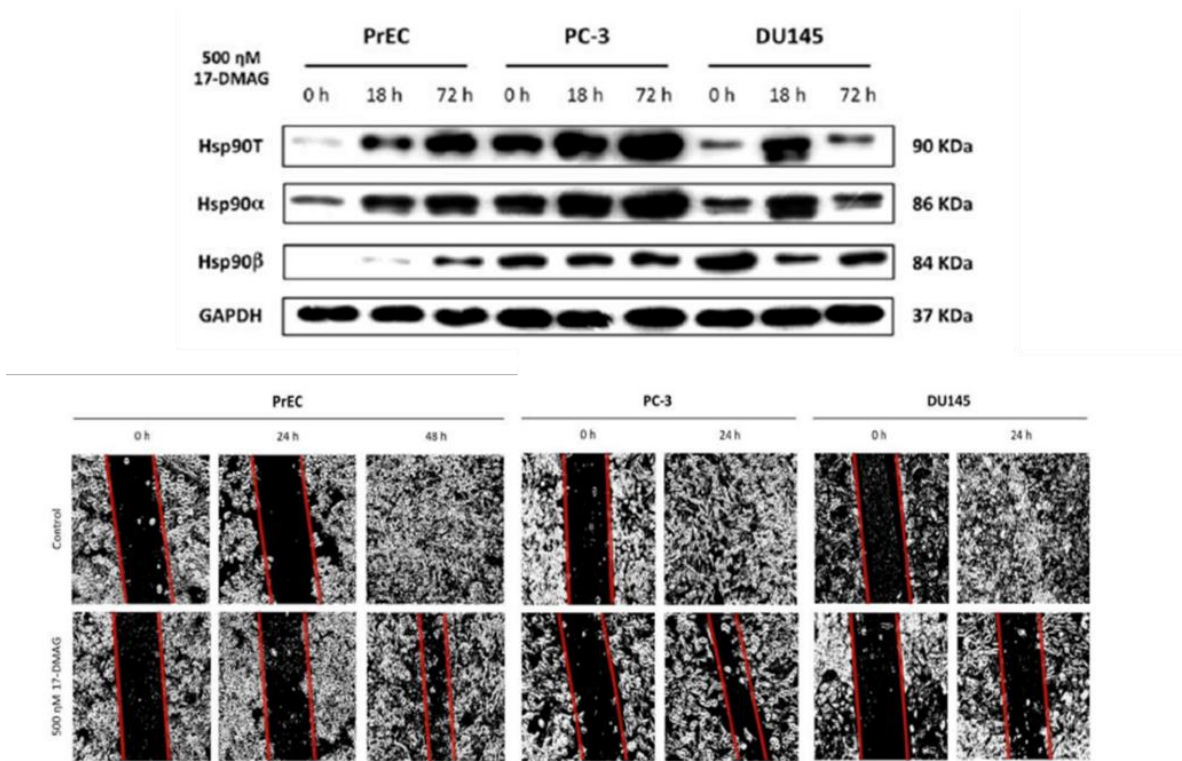


Figura 5. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre las líneas celulares de CP. (A) Efecto del 17-DMAG [500nM] sobre la expresión de Hsp90 y de sus isoformas Hsp90α y Hsp90β en las líneas celulares de CP: PC3 y DU145 y la línea de próstata normal PrEC. (B) Efecto del 17-DMAG [500nM] sobre la migración celular en las líneas celulares de CP: PC3 y DU145 y la línea de próstata normal PrEC.

Finalmente, muchos de estos conceptos han sido desarrollados en cultivos 2D tradicionales (monocapa), aunque claramente estos resultados no son una réplica fehaciente de los todos los mecanismos tanto bioquímicos como biológicos presentes *in vivo* (Pampaloni, et al., 2007). Debido a esto, se han desarrollado modelos 3D capaces de recrear la citoarquitectura específica de los tejidos y de disminuir las diferencias que existen entre el cultivo celular *in vitro* y un tejido fisiológico *in vivo*, como es el caso de los esferoides (Achilli, et al., 2012). En cáncer, los esferoides han sido un modelo ampliamente usado para evaluar la resistencia a fármacos, así como a la quimioterapia y radioterapia; ya que se ha determinado que las células en esferoides son más resistentes a fármacos que las células en monocapa (Yuan y Elliot., 2011).

P LANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios recientes en el grupo de investigación demuestran que el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β se asocia con la susceptibilidad del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG.

Dado lo anterior, surge la necesidad de estudiar el papel específico de Hsp90 α y Hsp90 β durante la formación de tumores de cáncer de próstata con diferente sensibilidad a andrógenos.

La capacidad para formar esferoides de cultivos de células de CP hormono-resistente dependerá de mantener niveles basales de la proteína Hsp90 α , donde el tratamiento con el inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, disminuirá dichos niveles, comprometiendo la formación de esferoides.

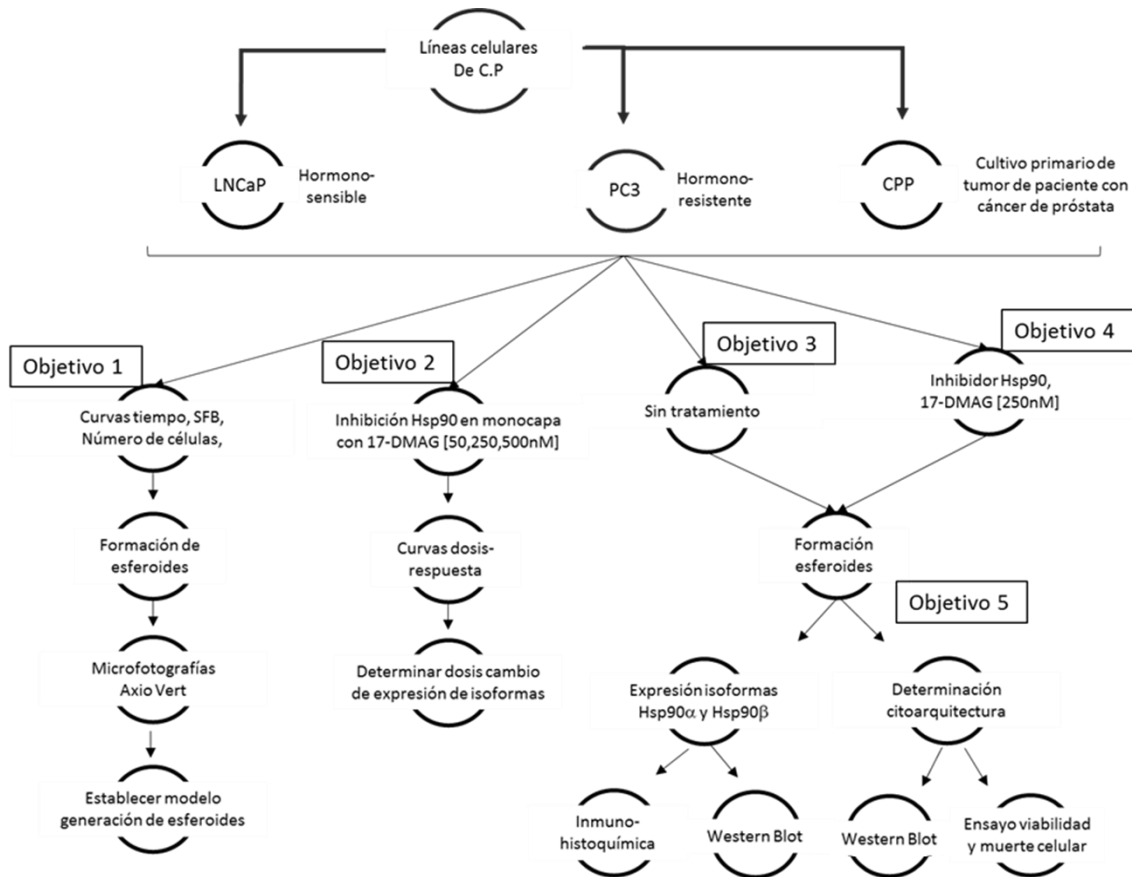
Objetivo General:

Determinar el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β durante la formación de esferoides y establecer la participación específica de las isoformas en este proceso en un modelo 3D de cáncer de próstata.

Objetivos Particulares

- I. Establecer un modelo de esferoides 3D a partir de líneas de cáncer de próstata (CP) con distinta sensibilidad a andrógenos.
- II. Determinar la susceptibilidad al inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en los cultivos de CP y su asociación con el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β .
- III. Evaluar el de perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β en la formación de esferoides de CP con diferente sensibilidad a andrógenos.
- IV. Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 en la formación de esferoides de CP con distinta sensibilidad a andrógenos.
- V. Asociar el papel de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β con la formación de esferoides.

E STRATEGIA EXPERIMENTAL



I. Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de próstata con diferente tumorigenicidad y sensibilidad a andrógenos (Tabla 2): PC3 (ATCC-CRL-1435) y LNCaP clone FGC (ATCC-CRL-1740). En todos los experimentos, se aseguró que los pases de cada línea celular no fueran mayores a 5 entre cada experimento., iniciando en los pases 4 y 11, respectivamente. Las células de la línea celular PC3 fueron cultivadas con medio F12K (# Cat. 10-025-CVR, *Corning*), mientras que la línea LNCaP se mantuvo con medio RPMI (#Cat. 10-041-CVR, *Corning*). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, #Cat. 10-056-CVR, *Corning*) y todos los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmosfera de CO₂ al 5%.

Cultivo Celular	Tumorigenicidad	Dependencia andrógenos	Receptor de Andrógenos	Modelo CP
PC3	Alta	No	Ausente	CPHR
LNCaP	Baja	Si	Presente	CPHS
CPP	Alta	SI	Presente	CPHS

Tabla 2. Principales características de las líneas celulares de próstata. Tejido de procedencia de las líneas celulares y su dependencia a andrógenos con su relación al modelo de cáncer de próstata: CPHR (Cáncer de próstata hormono-resistente) CPHS (Cáncer próstata hormono-sensible) y su capacidad de formar tumores.

Establecimiento de cultivo primario derivado de tumor de paciente con CP.

Para el establecimiento del cultivo primario, se inició el cultivo celular con la disgregación de un fragmento de 30-50 mg proveniente de tejido tumoral, hasta obtener fragmentos de aproximadamente 5mm. El tejido seccionado fue sometido a cuatro sucesivas digestiones enzimáticas empleando búfer de digestión (250U de colagenasa tipo I y II, ICN *Biomedicals*), en medio DMEM, se incubó a 37°C y con agitación a 60 rpm durante 60 minutos cada digestión. Posteriormente el tejido disgregado será centrifugando dos veces; la primera 5 minutos a 500 rpm, y se decantará el sobrenadante en tubo de 15ml nuevo, ambos tubos, fueron centrifugados nuevamente 5 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante de ambos tubos se desechó y se agregaron 1.5ml de medio DMEM F-12, SFB 15%, MEM vitaminas 1x y Antimicótico-Antibiótico 1x a ambos tubos, para sembrar en placa de 6 pozos. Al tejido residual se le agregaron nuevamente 5ml de búfer de digestión y se continuó con la siguiente digestión hasta completar la disgregación del tejido tumoral seccionado. El cultivo celular se mantuvo con medio DMEM-F12 a 37°C, con una atmosfera de CO₂ al 5%.

II. Formación de esferoides para líneas celulares de CP.

Se estableció la formación de esferoides empleando las líneas de CP (Tabla 2). Los esferoides de las líneas PC3 y CPP, se formaron utilizando una técnica modificada de “liquid overlay” (Yuhas, *et al.*, 1997); se utilizaron placas de 96 pozos, con 50 µl agarosa al 1.5% para formar una superficie no adherente y se pudiera formar un menisco, así como 150µl de medio L-15. Las placas se mantuvieron en ausencia de CO₂ y en agitación orbital a 60 rpm. Por cada

pozo de la placa de 96 se sembraron 2,000 y 10,000 células, de las células de CPP y PC3, respectivamente.

Para la línea LNCaP se utilizó la técnica clásica de “Liquid overlay” en botellas 25cm² con 5% de CO₂ sin agitación con medio RPMI suplementado con 10% de SFB; sembrando 8x10⁵ células por botella. Estos cultivos se limpiaron al tercer día de sembrado para extraer agregados celulares amorfos.

Los esferoides formados se evaluaron por microscopía de campo claro cada 24h para determinar su curva de crecimiento. Con la finalidad de determinar la formación de las capas del esferoide, se monitoreó microscópicamente la zona más densa en el centro y fue evaluada como sugerente de centro hipóxico (necrosis).

Ensayos de viabilidad y de muerte celular en cultivos 3D.

Se realizaron ensayos de viabilidad y de muerte celular con el kit LIVE/DEAD (#Cat. L7010. *Thermo Fisher Scientific*) para determinar la población de células vivas y muertas que conforman los esferoides de la línea LNCaP y el cultivo primario derivado de paciente. Para ello, los fluoróforos, Calceína AM y homodímero de etidio, fueron incubados durante 30min a 37°C protegiendo la placa de cultivo de la luz. Posteriormente, los esferoides fueron lavados con PBS y se observaron con el microscopio digitalizador ZOE® (*BioRad*). Las células viables se visualizaron en el canal verde (excitación: 355/40nm, emisión: 433/36nm), mientras que las células muertas se visualizaron en el canal rojo (excitación: 556/20nm, emisión: 615/61nm).

III. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

La extracción de proteínas totales de cada línea celular de CP se realizó, tanto en la línea parental como en suspensión y en esferoide, mediante lisis celular utilizando Buffer de lisis RIPA 1x, (#Cat. 92590, *Merck*) con adición de inhibidor de proteasas 1x. El homogenizado obtenido se incubó por 30 min en hielo, realizando un vórtex cada 5 min. Posteriormente, el homogenizado obtenido se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min a 4°C. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry, empleando el kit DC Protein Assay (#Cat. 500-0116, *BioRad*).

La electroforesis se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% empleando 20µg de proteína. Los geles se corrieron a 60 volts por 30 min en el gel concentrador, y para separar las proteínas, se corrieron 120 volts durante 150 min. Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) en un Trans-Blot® Turbo (*Bio Rad*), a 25 volts durante 40 min.

IV. Inmunodetección de las isoformas de Hsp90, Hsp90α y Hsp90β, y GAPDH mediante Western Blot

Las membranas PVDF con las proteínas transferidas se bloquearon durante 1h (#Cat. Blot-Quick Blocker, *Bio-Rad*) al 5% con búfer salino de Tris-Tween (TBS-T) a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios descritos en la tabla 3, se incubaron toda la noche a 4°C; mientras que los anticuerpos secundarios: a) anti-goat #V805A de *Promega*, b) anti-rabbit #AP132P, *Millipore*, y c) anti-mouse #AP124P, de *Millipore*; se incubaron 1h a

temperatura ambiente. Después de la incubación de cada anticuerpo, se realizaron 6 lavados con TBS-T.

Finalmente, la detección de las proteínas blanco se realizó por quimioluminiscencia (# cat. 32106 *Invitrogen*) y se reveló por autoradiografía (#Cat. 1901859). La autoradiografía de cada Western blot fue digitalizada para su análisis densitométrico (Image Scanner III, GE *Healthcare*).

Anticuerpo	Núm. Catálogo	Marca	Especie	Dilución WB	Dilución IHQ	Dilución IF	PM
Hsp90α	72174	Millipore	Rabbit	1:1500	1:700	-	~90 kDa
Hsp90β	Sc-1057	Santa Cruz	Goat	1:500	1:1500	-	~90 kDa
GAPDH	sc-47724	Santa Cruz	Rabbit	1:1000	-	-	~ 37 kDa

Tabla 3. Principales características de los anticuerpos primarios empleados para su inmunodetección por WB e IHQ en cultivos 2D y 3D de CP

V. Recuperación e inclusión en parafina de esferoides de cáncer de próstata

La recuperación de los esferoides se realizó a diferentes tiempos (24h, 48h, 72h y 96h) lavándose con PBS dos veces. Posteriormente, los esferoides recuperados se dejaron en formalina amortiguada (Merck®), por 4 horas a 4°C. Al finalizar el tiempo, los esferoides se lavaron otra vez dos veces con PBS y se transfirieron a etanol al 70% y se conservaron a 4°C hasta su inclusión en parafina.

Para la inclusión en parafina, se recuperaron los esferoides en papel filtro adecuado a manera de bolsa, adicionándoseles eosina para teñirlos y ayudar ad su visualización. Finalmente, se conservaron en cassettes de inclusión y se dejaron sumergidos toda la noche

en formalina amortiguada. Al día siguiente se realizó la inclusión en parafina en el Departamento de Patología del INCan, para finalmente realizar cortes de 3µm en un micrótomo (Hyrax M 25, Zeiss®).

VI. Inmunohistoquímica de Hsp90α y Hsp90β en los esferoides de cultivos celulares de CP.

La inmunoexpresión y localización subcelular de las isoformas de Hsp90, Hsp90α y Hsp90β se determinó mediante ensayos de inmunohistoquímica utilizando el kit de Millipore (#Cat. 2867619, Millipore). Los anticuerpos primarios (tabla 3) se incubaron durante 1h a temperatura ambiente, así como los anticuerpos secundarios; finalmente se tiñó con diaminobencidina (DAB) kit de Dako (#Cat. ab64238). Las microfotografías de los esferoides fueron obtenidas con ayuda del microscopio invertido, Axio Vert (Zeiss).

VII. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG, en líneas celulares de CP.

Con la finalidad de determinar una concentración mínima inhibitoria del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, necesaria para producir un cambio en el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90, se realizaron curvas de inhibición dosis-tiempo-respuesta en cultivos en monocapa de las líneas celulares de CP, LNCaP y PC3, así como de CPP.

Cada línea celular se sembró en placas de cultivo de 100mm asegurando obtener una confluencia del 80% en cada uno de los tiempos (24h, 48h, 72h y 96h). Después de 24h del sembrado, se les retiró el SFB para sincronizar las células durante 24h y se reemplazó el

medio +SFB por medio con inhibidor 17-DMAG a diferentes concentraciones (50nM, 250nM y 500nM), extrayéndose proteínas totales a los diferentes tiempos.

Por otro lado, la viabilidad celular se monitoreó mediante el kit de viabilidad “LIVE/DEAD” (*Thermo Fisher Scientific*) para determinar que en las células no se producía una muerte mayor al 70% con el uso del iHsp90.

VIII. Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG en la formación de esferoides de CP.

Con base en los ensayos de inhibición en monocapa de cada línea celular, se determinó la dosis de 250nm para determinar el efecto en el cambio de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en la formación de los esferoides de CP; para esto, se recuperaron los esferoides de 24h, 48h, 72h y 96h. Posteriormente, se realizó extracción de proteínas totales de los esferoides control y tratados con 17-DMAG, así como la fijación de estos, a cada uno de los tiempos. Para cada uno de estos procedimientos, se utilizó una placa de cultivo de 96 pozos para la recuperación de los esferoides.

- I. Establecer un modelo de esferoides 3D a partir de líneas de cáncer de próstata (CP) con distinta sensibilidad a andrógenos.

La capacidad de formación de esferoides fue determinada para dos cultivos celulares de CP con diferente tumorigenicidad y sensibilidad a andrógenos (PC3 y LNCaP); así como de un cultivo primario derivado de paciente con cáncer de próstata (CPP) estos cultivos fueron monitoreados mediante microscopía durante 96h (Figura 6A, 6B y 6C).

La información obtenida mediante microscopía durante la formación de los esferoides durante 4 días cada 24h, permitió determinar que los tres cultivos celulares (PC3, LNCaP y CPP) poseen la capacidad de formar esferoides. Cada cultivo posee diámetros máximos diferentes; asimismo, se evaluó la citoarquitectura de los esferoides, determinada por la aparición de un centro más denso formado por células necróticas.

El centro necrótico en los esferoides de la línea PC3 se observó hasta las 72h, mientras que la aparición en el CPP se obtuvo a las 96h. Por su parte, los esferoides de la línea LNCaP, al formarse en botellas para cultivo celular con superficie no adherente, no se pudo establecer un tiempo exacto de maduración, pero se logran apreciar las capas características de maduración aproximadamente cuando alcanzaron un diámetro de 300µm.

Con respecto al diámetro, la línea celular PC3 alcanzó su tamaño máximo a las 48h conservándolo hasta las 72h mientras que a las 96h empieza a decaer. En el caso de los esferoides formados con la línea celular LNCaP su diámetro máximo osciló entre los 320

μm , el cual se puede encontrar entre los 8 y 10 días de sembradas las células. Finalmente, el CPP empieza su formación con un tamaño de $290\mu\text{m}$ y va decreciendo hasta llegar a $116\mu\text{m}$, este fenómeno es debido a que aumenta la compactación del esferoide y disminuye su diámetro.

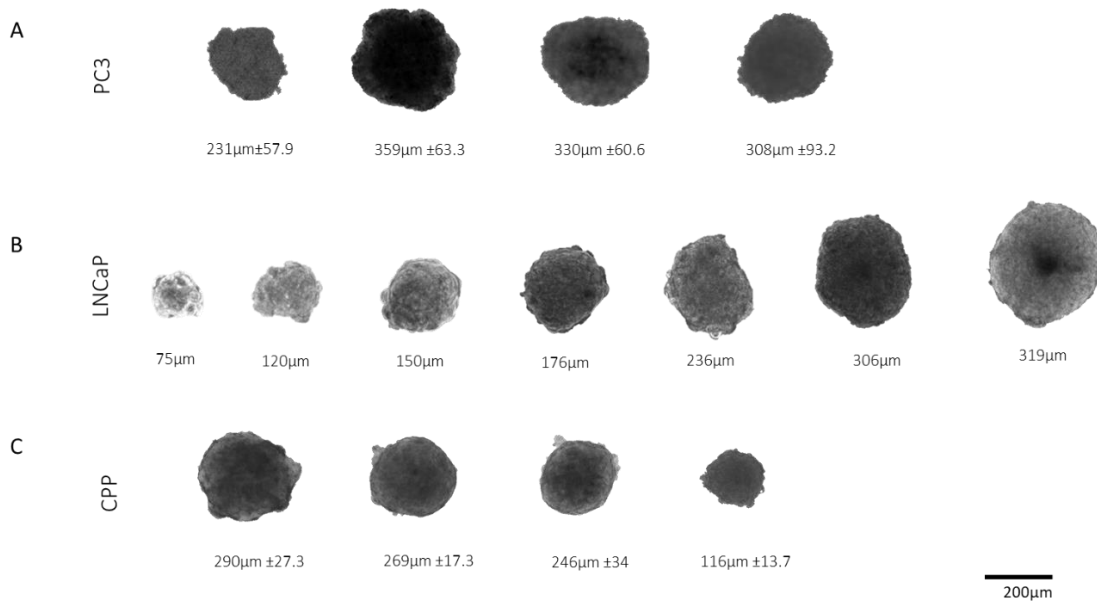


Figura 6. Microfotografías de esferoides de 3 líneas celulares de Cáncer de próstata. (A) Formación de esferoides de la línea celular PC3 alcanzan su tamaño máximo y formación de centro necrótico a las 72h. **(B)** Formación de esferoides de la línea celular LNCaP, el centro necrótico se empieza a observar cuando miden $\geq 300\mu\text{m}$. **(C)** Formación de esferoides del CPP, se pueden apreciar las capas características a las 96h.

- II. Determinar la susceptibilidad al inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en los cultivos de CP y su asociación con el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β .

Con la finalidad de determinar la concentración mínima inhibitoria del 17-DMAG, en cada uno de los cultivos celulares PC3, LNCaP y CPP, los cultivos en monocapa se mantuvieron en una confluencia del 70%, previo al tratamiento del iHsp90. En cada grupo de cultivo se realizaron curvas dosis-tiempo respuesta del iHsp90, obteniendo proteínas totales a cada uno de los tiempos analizados (24 a 96h), con la finalidad de obtener y estudiar el comportamiento del perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β (Figura 7).

Administrando una concentración de 250nM de 17-DMAG, se observaron cambios en el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en todas las líneas celulares (Figura 7A, B y C). A una concentración de 17-DMAG [50nm] se observan cambios significativos de los niveles de proteína de la isoforma Hsp90 α únicamente en el CPP a las 72h y 96h, mientras que en los cultivos de PC3 y LNCaP no se observan cambios para ninguna de las dos isoformas de Hsp90 a ningún tiempo.

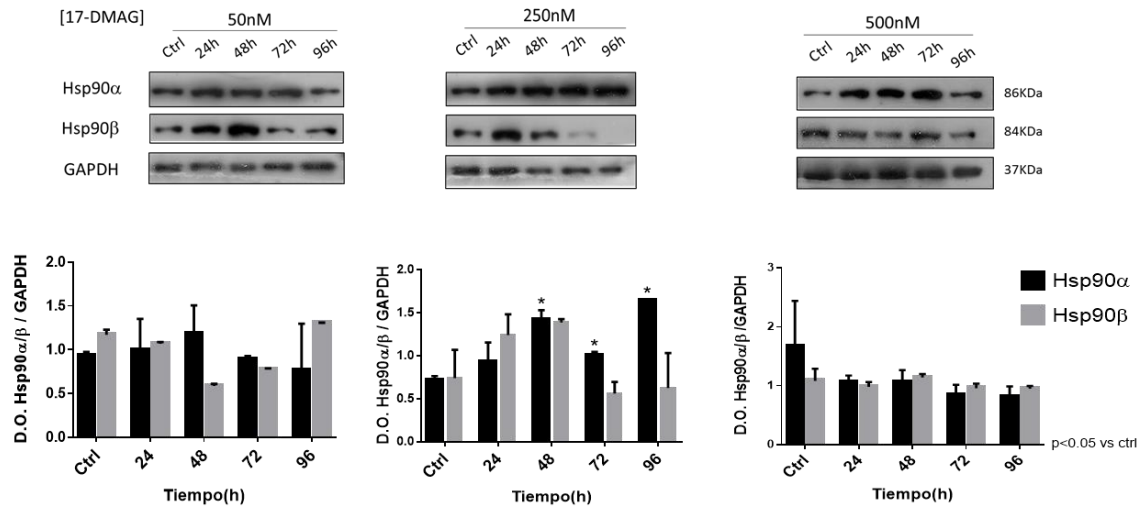
Utilizando el iHsp90 a una concentración de 17-DMAG [250nM] en la línea celular PC3 existe un aumento de la isoforma Hsp90 α con respecto al control, siendo significativo de las 48h a las 96h; donde la expresión de la proteína Hsp90 β tiende a aumentar a las 24h, mientras que a tiempos largos tiende a disminuir, sin presentar cambios significativos. Con respecto a la línea celular LNCaP, el tratamiento del iHsp90 a una concentración de [250 nM] indujo una disminución significativa de Hsp90 α a las 24h, incrementando durante los siguientes tiempos posteriores, siendo este aumento significativo a las 96 h comparadas con el control.

La expresión de la proteína Hsp90β se mantuvo constante durante todos los tiempos evaluados de tratamiento.

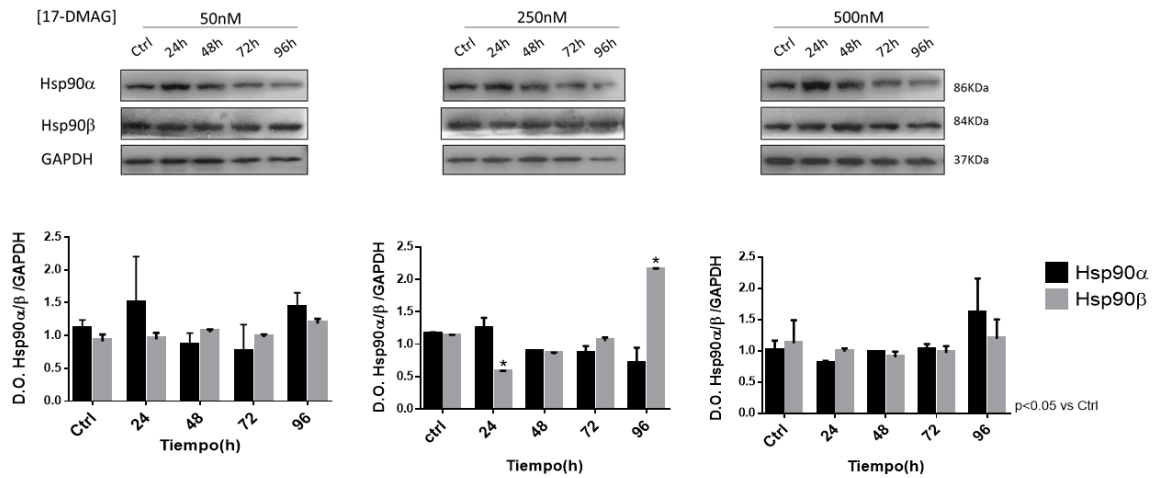
Respecto al cultivo CPP, la expresión proteica de las isoformas Hsp90α y Hsp90β tienden a disminuir, siendo este cambio significativo para la isoforma Hsp90α a las 48h y 96h.

Finalmente, empleando una concentración de [500nM] del iHsp90, 17-DMAG, en los 3 cultivos celulares no se observa un cambio significativo con respecto a la expresión proteica de Hsp90α y Hsp90β, analizada a los distintos tiempos comparados con el control (Figura 7, Panel derecho).

A (PC3)



B (LNCaP)



C (CpP)

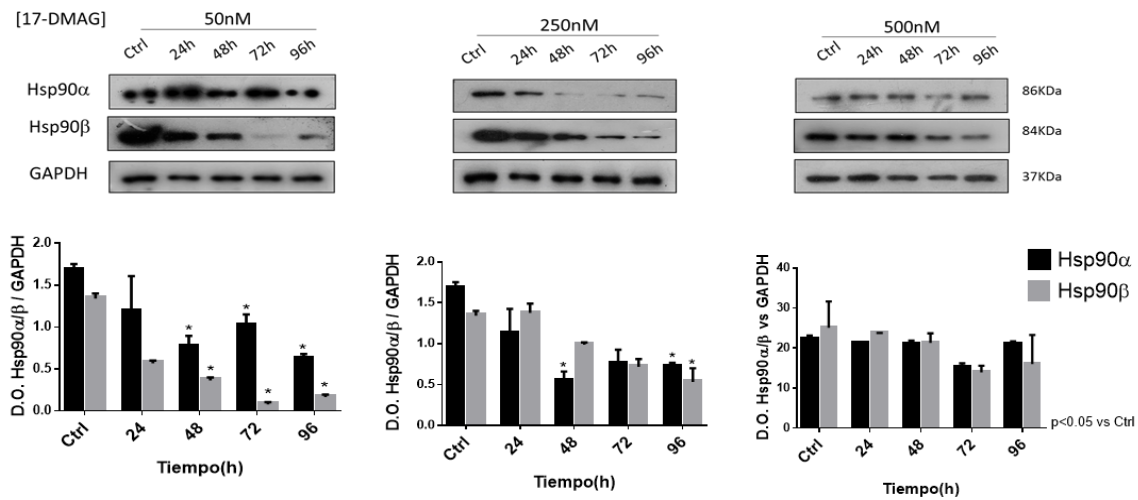


Figura 7. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de las proteínas Hsp90α y Hsp90β en los cultivos celulares de cáncer de próstata Los cultivos celulares de cáncer de próstata PC3, LNCaP y CPP fueron tratados con el iHsp90, 17-DMAG, a tres concentraciones [50nM], [250nM] y [500nM] por 24, 48, 72 y 96hrs. Se determinó el perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β mediante western Blot. **(A)** Efecto de la inhibición de Hsp90 en el perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β en la línea hormono-resistente, PC3. **(B)** Efecto de la inhibición de Hsp90 en el perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β en la línea hormono sensible, LNCaP. **(C)** Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β en la línea CPP. Se muestra de manera gráfica los valores relativos de las isoformas de Hsp90α y Hsp90β *p<0.05. Densidad óptica (D.O.) en unidades arbitrarias

- III. Evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 en la formación de esferoides de CP con distinta sensibilidad a andrógenos.

Una vez determinada la concentración necesaria para el cambio de expresión de las isoformas, se evaluó el efecto de la inhibición de Hsp90 empleando 17-DMAG [250nM] en la formación de esferoides de los cultivos celulares de cáncer de próstata: PC3, LNCaP y CPP. El efecto del iHsp90 en la formación de los esferoides es dependiente del tipo celular. En el caso de la línea celular PC3, la línea representativa de cáncer de próstata hormono-resistente, se observaron los siguientes efectos microscópicos asociados a la inhibición de Hsp90 con el 17-DMAG durante la formación de esferoides: a) Las células pierden la capacidad de formar esferoides, b) El esferoide pierde la compactación y cito-arquitectura característica, y c) Únicamente se observó la formación de agregados celulares.

Para la línea PC3, se sembró el mismo número de células y se añadieron [20nM] de 17-DMAG. A las 24h de tratamiento con el iHsp90, las células de la línea PC3 presentan microscópicamente un agregado celular con un diámetro de 1253 μm , siendo este mayor a los esferoides no tratados con iHsp90 [250nM]. A las 72h, diámetro se redujo a 990 $\mu\text{m} \pm 153.9 \mu\text{m}$, sin lograr alcanzar el crecimiento máximo del esferoide con respecto al control (330 $\mu\text{m} \pm 60.6 \mu\text{m}$). En todos los tiempos evaluados, la cinética de crecimiento mostró diferencias significativas en el tamaño con respecto al control ($p < 0.001$) (Figura 8).

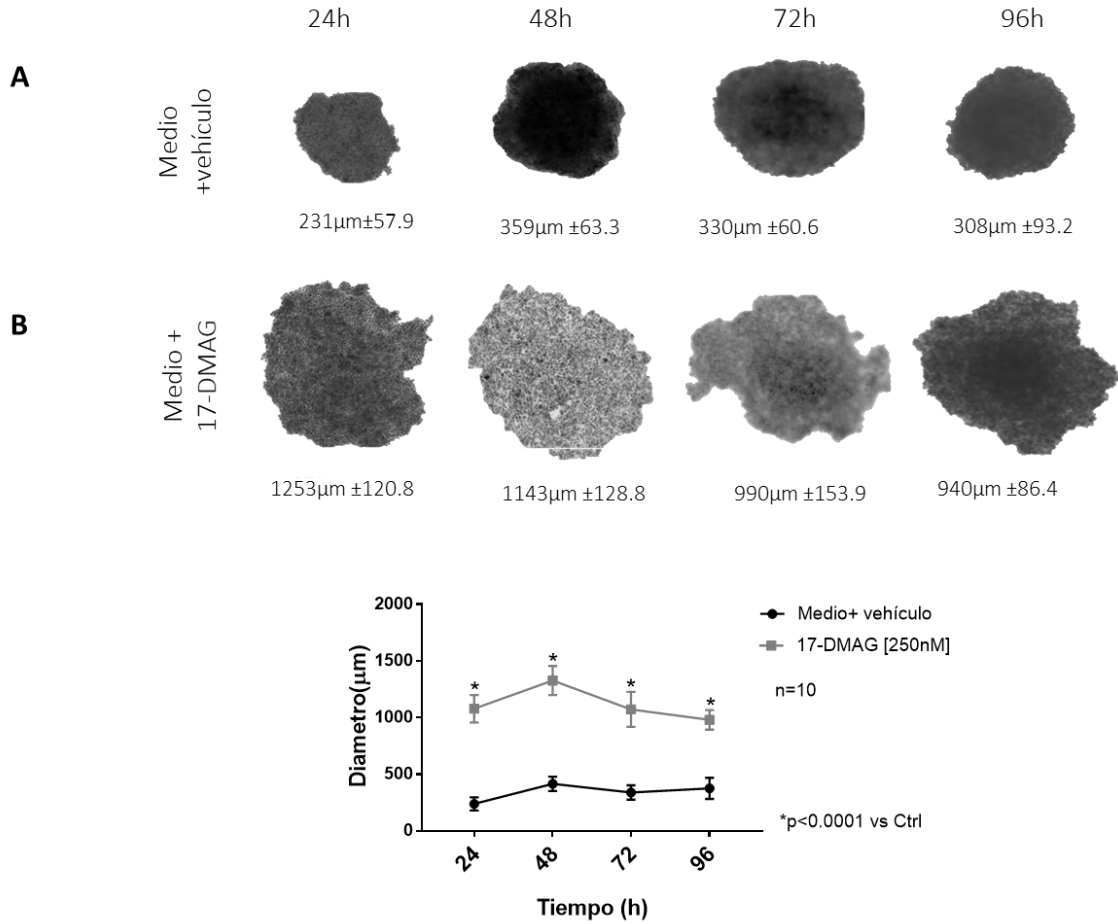


Figura 8. Efecto de la inhibición de Hsp90 en la Cinética de crecimiento de esferoides de la línea celular de CP, PC3. (A) Curva de crecimiento de esferoides sin inhibidor de Hsp90, se indica el diámetro obtenido a cada tiempo en la parte inferior. **(B)** Curva de crecimiento de esferoides con inhibidor 17-DMAG [250nm], se observa la formación únicamente de agregados celulares sin potencial de alcanzar la maduración **(C)** Cinética de crecimiento de esferoides tratados y no tratados con iHsp90. En el eje de las x se muestra el diámetro de los esferoides, mientras que en el eje de las y se grafica el tiempo. La p se calculó usando una prueba de t para la comparación entre grupos; se muestran diferencias significativas en cuanto a tamaño en todos los tiempos. *p < 0.001. Se muestra valor promedio ± desviación estándar. n=10 para cada uno de los tiempos (24h, 48h, 72h, 96h)

En el caso de la línea de CP, LNCaP, (línea celular sensible a andrógenos), la inhibición de Hsp90 favoreció la capacidad de las células para formar esferoides; lográndose un mayor número de esferoides, de mayor tamaño y a tiempos más cortos comparados con esferoides no tratados (Figura 9A y 9B).

Para el análisis de los resultados, los esferoides se dividieron en 3 grupos dependiendo del tamaño; de 0-200 μ m, de 200-400 μ m, 400-600 μ m, los esferoides se evaluaron a los 8 días de sembradas las células, observando esferoides de todos los tamaños en el grupo no tratado, siendo los rangos de 0-200 μ m y de 200-400 μ m los más predominantes, mientras que esferoides de mayor tamaño solo se encontraron pocos. En el caso del grupo tratado con iHsp90 los esferoides se encontraban mayormente el rango que va de 200-400 μ m con varios esferoides de mayor tamaño; mientras que se encontraban muy pocos esferoides del rango menor a 200 μ m, con respecto al control.

Por otro lado, se realizaron ensayos de viabilidad y muerte celular con tinción LIVE/DEAD, en esferoides con 8 días después de sembradas las células, para determinar la población y citoarquitectura de los esferoides control y asociar si la inhibición de Hsp90 cambiaba las propiedades de los esferoides. Los esferoides control mostraron la presencia de una subpoblación de células marcadas con homodímero de etidio (rojo) conformando un centro necrótico en esferoides de aproximadamente 300 μ m y una subpoblación de células metabólicamente activas marcadas con calceína AM (verde) en la circunferencia del esferoide. Por otro lado, en esferoides tratados con iHsp90 esta citoarquitectura se pierde independientemente del tamaño; pudiéndose observar un incremento de células muertas y la pérdida de la localización de estas dentro del esferoide (Figura 9E).

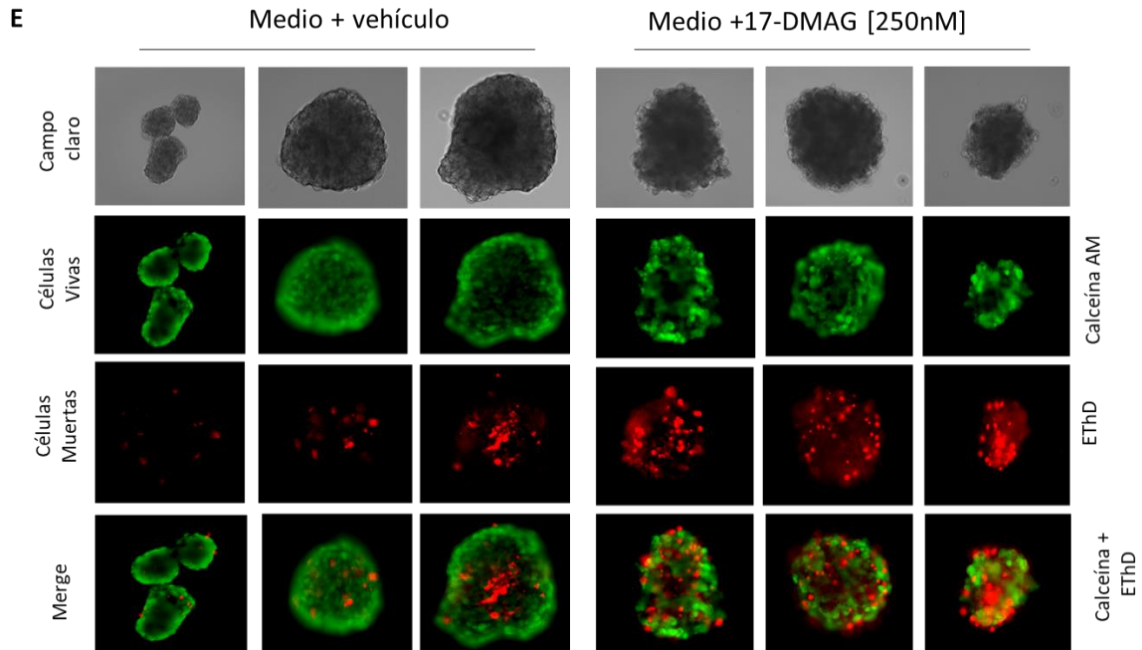
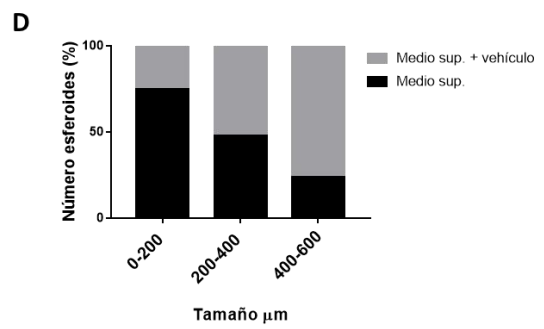
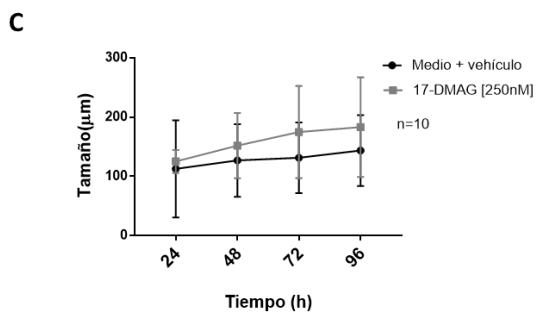
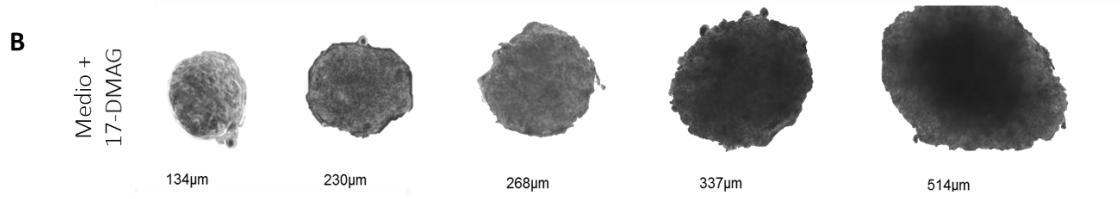
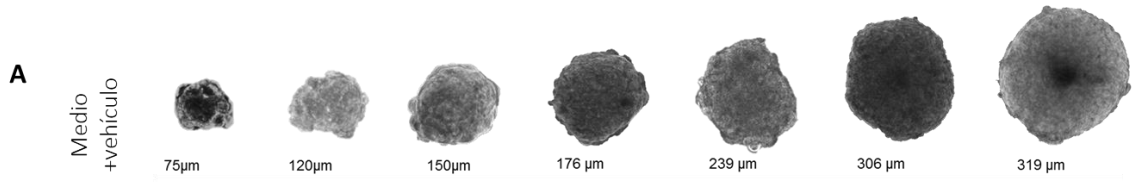
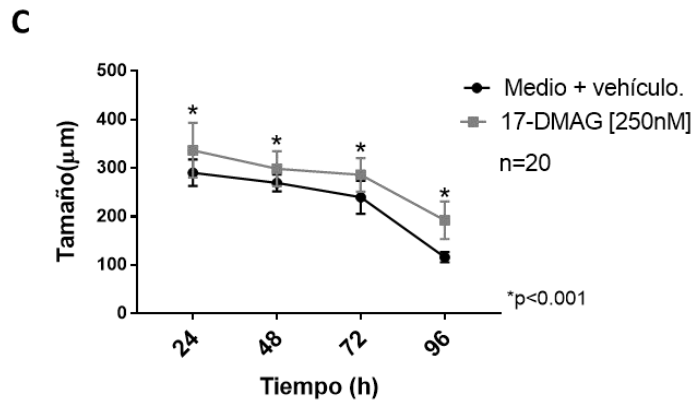
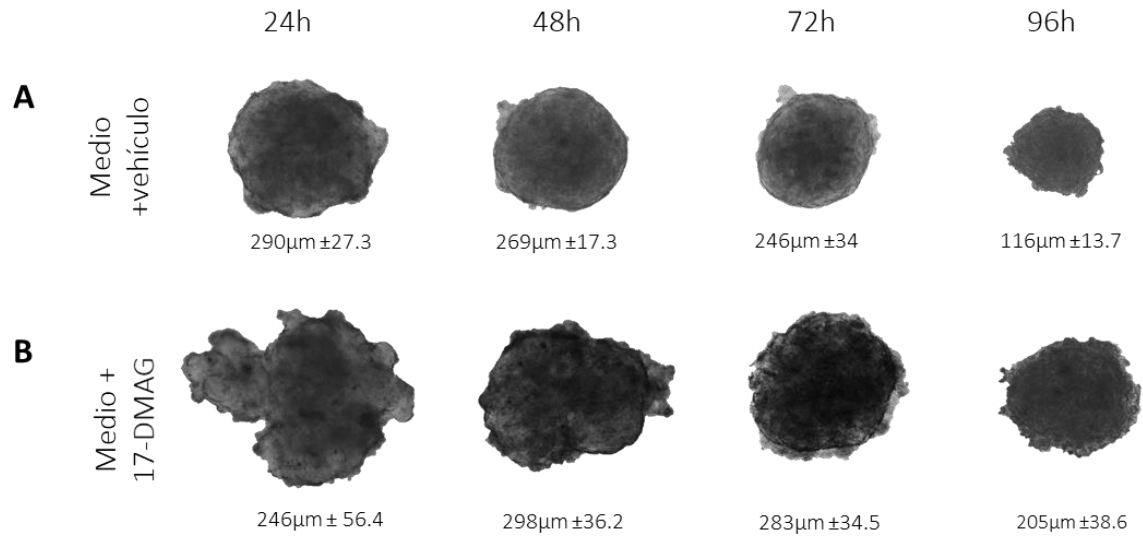


Figura 9. Efecto de la inhibición de Hsp90 en la cinética de crecimiento y citoarquitectura de esferoides de LNCaP. (A) Curva de crecimiento de esferoides de LNCaP sin inhibidor **(B)** Curva de crecimiento de esferoides de LNCaP con inhibidor 17-DMAG [250nm] **(C)** Cinética de crecimiento de esferoides tratados y no tratados con iHsp90 con respecto al tiempo **(D)** Número de esferoides encontrados a los 8 días con respecto al tamaño. **(E)** Ensayos de viabilidad LIVE/DEAD de esferoides tratados y no tratados con 17-DMAG, se muestran las células metabólicamente activas, marcadas con calceína AM (verde) y células muertas marcadas con homodímero de etidio (rojo) y el empalme de los canales (*merge*).

Finalmente, el efecto de la inhibición de Hsp90 en la formación de esferoides de CPP, fue un retraso en la formación de los esferoides. Los esferoides control, sin iHsp90, logran formarse a las 24h (290 μm), mientras que los esferoides tratados con iHsp90 no logran formar la estructura esférica y poseen un tamaño estadísticamente mayor (346 μm , $p < 0.05$). A las 48h se observó que los esferoides empiezan a retomar su estructura esférica, aunque con un tamaño mayor, siendo este aumento de tamaño estadísticamente significativo ($p < 0.05$) mientras que a las 72h se observa un esferoide totalmente formado (Figura 10 A y B).

Con la finalidad de determinar las subpoblaciones de células vivas y muertas, así como la citoarquitectura de los esferoides, se realizaron ensayos de viabilidad celular. En los esferoides control, se observó que la subpoblación de células muertas se localiza en el centro del esferoide, y estas van en aumento dependiendo del tiempo; se observa a las 72h, $\pm 50\%$ del diámetro de células marcadas de rojo al centro, mientras que, a las 96h, esta subpoblación celular alcanza el 80% del diámetro total del esferoide (Figura 10D, panel izquierdo). En el caso de los esferoides tratados con iHsp90, esta relación temporal y espacial se pierde, observando un aumento de células muertas en todo el esferoide (Figura 10D, panel derecho).



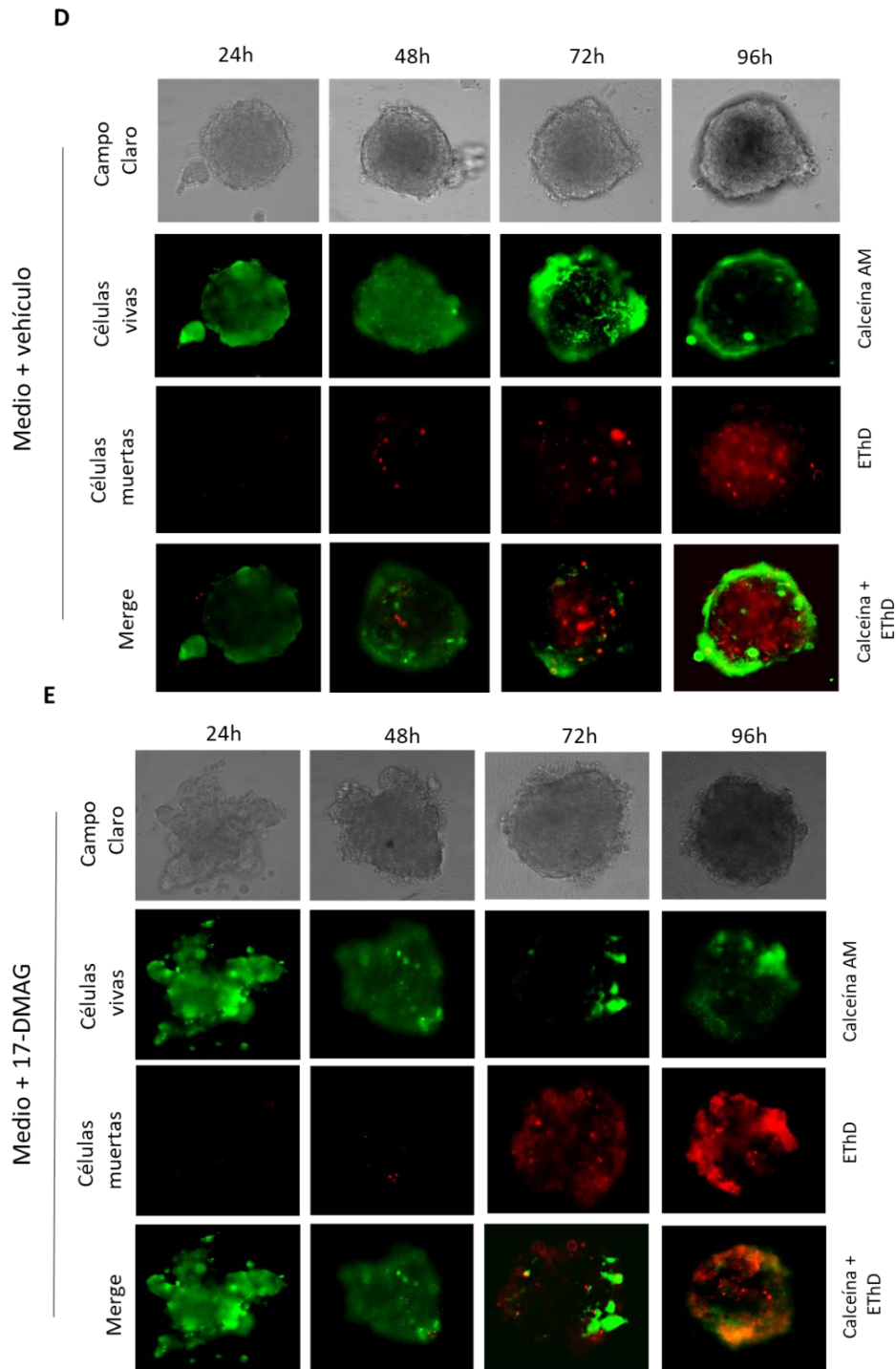


Figura 10. Efecto de la inhibición de Hsp90 en la Cinética de crecimiento y citoarquitectura de esferoides de CPP. (A) Curva de crecimiento de esferoides sin inhibidor (20x) **(B)** Curva de crecimiento de esferoides con inhibidor 17-DMAG [250nm] (20x) **(C)** Cinética de crecimiento de esferoides de CPP tratados con y sin inhibidor de Hsp90 **(D)** Ensayos de viabilidad y muerte celular (LIVE/DEAD®) de esferoides no tratados **(E)** Ensayos de viabilidad y muerte celular (LIVE/DEAD®) de esferoides tratados con iHsp90. (se muestran las células metabólicamente activas, marcadas con calceína AM (verde) y células muertas marcadas con homodímero de etidio (rojo)

- IV. Determinar el papel de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , en la formación de esferoides de cáncer de próstata.

A partir de esferoides recuperados cada 24h de la placa de 96 pozos, se obtuvo el perfil de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β mediante Western blot para determinar el papel específico de las isoformas en la formación de los esferoides de las líneas PC3 y CPP.

En los esferoides de la línea celular PC3, se observa un aumento en los niveles de Hsp90 α en los esferoides control (sin iHsp90) de manera tiempo dependiente. En el caso de Hsp90 β , los niveles de proteína se mantuvieron constantes en todos los tiempos monitoreados; mientras que en los esferoides tratados con iHsp90 se ve una disminución significativa ($p < 0.05$) de los niveles proteicos de Hsp90 α en los tiempos de 24h, 48h y 96h. La expresión de la proteína Hsp90 β , monitoreada durante toda la formación de los esferoides tanto control como tratados con iHsp90 no mostró diferencias significativas, mostrando que la línea PC3 posee la capacidad de mantenerse constante durante la formación de los esferoides hasta las 96h que disminuye su inmunodetección.

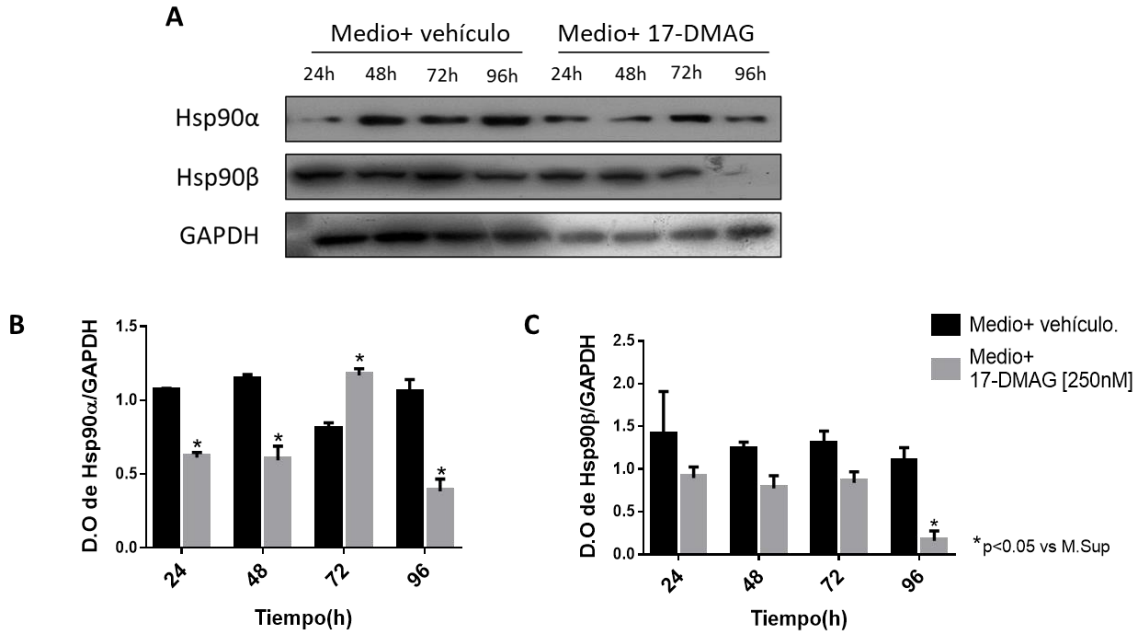


Figura 11. Efecto del inhibidor en la expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90α y Hsp90β en la formación de esferoides de la línea PC3 (A) WB representativo del perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β de esferoides control y tratados con iHsp90. **(B)** Niveles relativos de Hsp90α obtenidos por triplicado control y tratados con iHsp90 **(C)** Niveles relativos de Hsp90β obtenidos por triplicado de esferoides control y tratados con iHsp90. *Valor de $p < 0.05$ contra medio+ vehículo

Durante la formación y crecimiento de los esferoides de la línea celular LNCaP, el perfil de expresión de las isoformas Hsp90α y Hsp90β fue evaluada mediante inmunohistoquímica, dada la dificultad de obtener proteína total formando grupos de un solo tamaño de esferoide.

La inmunexpresión de Hsp90α obtenida por IHQ exhibió un aumento en los esferoides tratados con 17-DMAG, independientemente del tamaño, comparado con los esferoides sin tratamiento. Por el contrario, el marcaje de Hsp90β en los esferoides tratados con iHsp90 disminuye sin importar el tamaño del esferoide. En los esferoides de mayor a 300μm de

diámetro, se puede observar marca nuclear de ambas isoformas en los esferoides sin tratar (Figura 12, panel izquierdo).

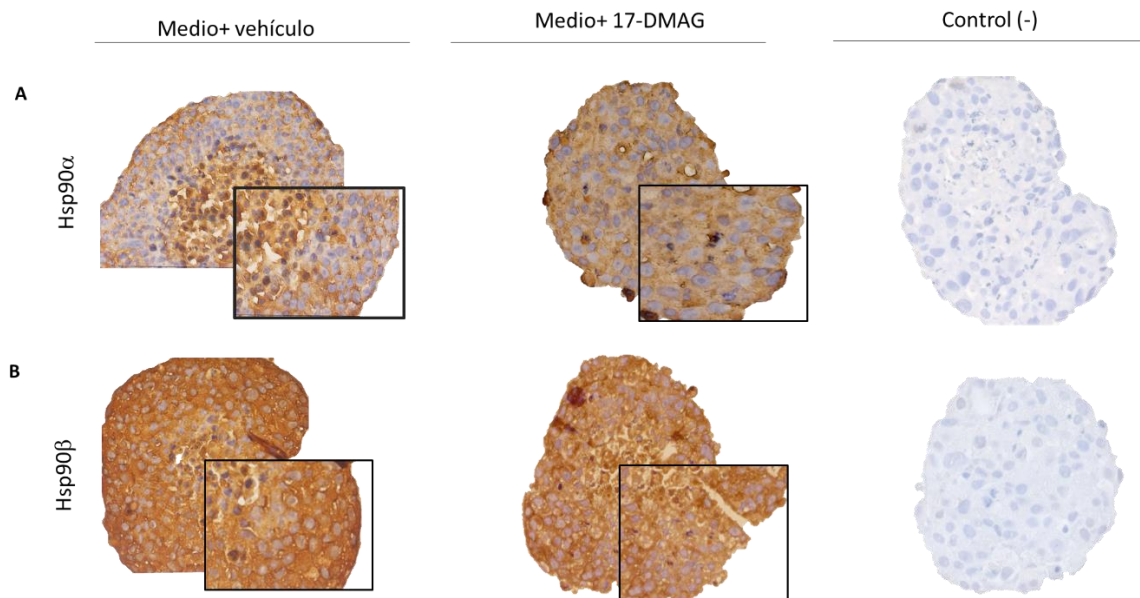


Figura 12. Efecto del inhibidor en la expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β en esferoides de la línea LNCaP (A) Imágenes representativas de Inmunohistoquímica de la isoforma Hsp90 α en esferoides control y tratados con iHsp90, así como una imagen representativa del control negativo **(B)** Imágenes representativas Inmunohistoquímica de la isoforma Hsp90 β en esferoides control y tratados con iHsp90, así como una imagen representativa del control negativo. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 20x y se me muestra en recuadro un aumento de 2 veces más.

Finalmente, la determinación del perfil de expresión de las isoformas en CPP se realizó mediante Western blot e inmunohistoquímica (Figura 13 y 14).

Por ensayos de WB, de los niveles de expresión proteica de las isoformas de Hsp90, se observa una tendencia tanto de Hsp90 α a aumentar a las 48h y disminuir a las 96h con respecto al control. Por otro lado, se observa que Hsp90 β tiende a disminuir de manera tiempo dependiente en los dos grupos evaluados (medio+ vehículo vs medio +17-DMAG).

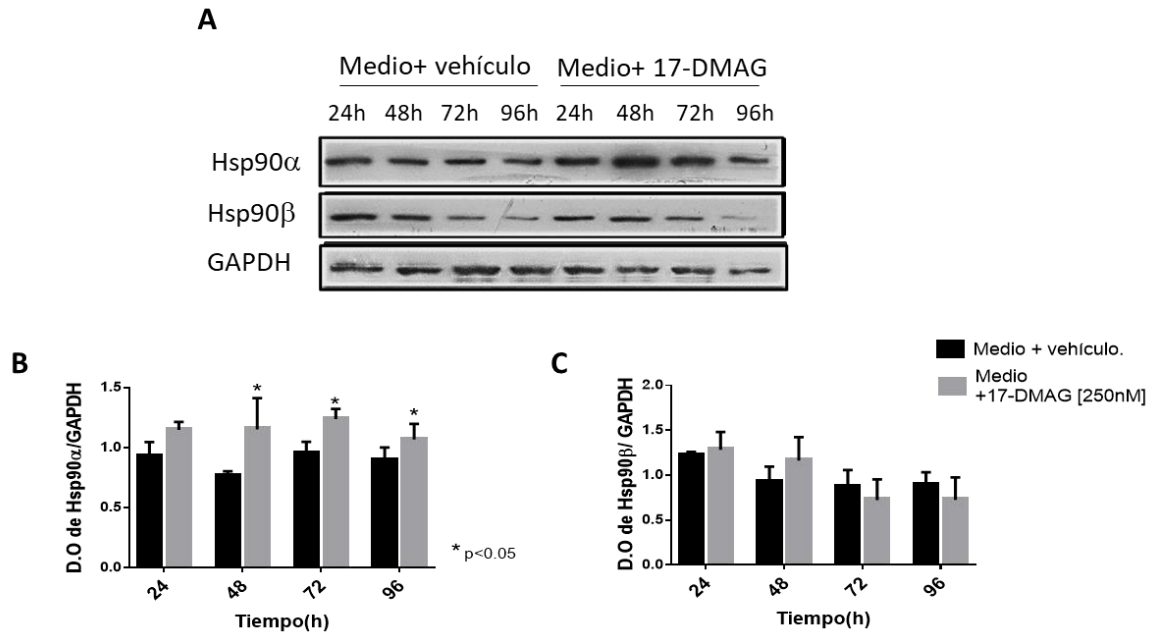


Figura 13. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, en la expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β durante la formación de esferoides obtenidos con el cultivo primario de CP (A) WB representativo de las isoformas Hsp90 α , Hsp90 β y p27. (B) Gráfica de los valores densitométricos relativos a la proteína Hsp90 α , (C) Gráfica de los valores densitométricos relativos de la proteína Hsp90 β . *p<005 vs medio+vehículo

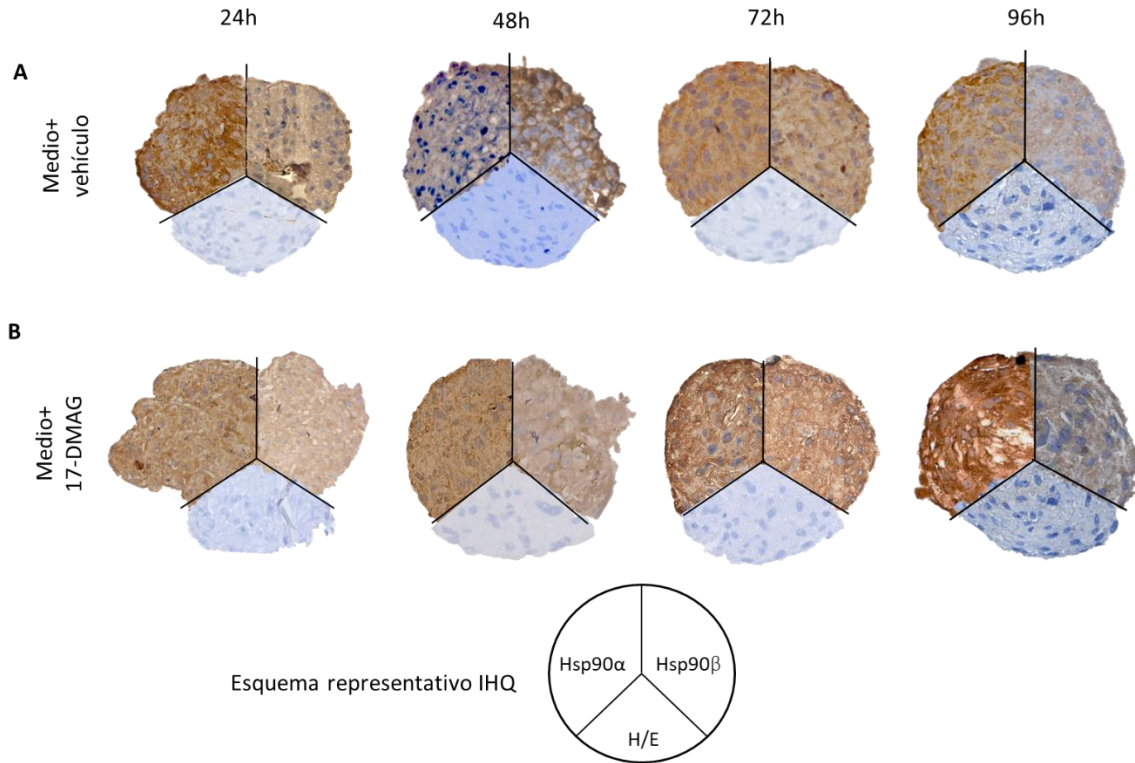


Figura 14. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en esferoides de CPP obtenida mediante inmunopresión. (A) IHQ de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en esferoides de CPP control (B) IHQ del perfil de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en esferoides de CPP tratados con 17-DMAG. Se muestran esferoides representativos obtenidos a diferentes tiempos, cada tercera parte de la circunferencia muestra la IHQ de cada una de las isoformas de Hsp90 como se muestra esquemáticamente en el panel inferior.

Finalmente, con el objetivo de determinar si la expresión de las isoformas cambiaba en los tipos celulares de los esferoides de CPP, se obtuvo la expresión de las isoformas en esferoides de CPP por inmunohistoquímica, se puede observar una tendencia a aumentar Hsp90 α a partir de las 48h con respecto al control, cuando el esferoide retoma la capacidad de formar la estructura esférica; mientras que las células poseen la capacidad de mantener constante Hsp90 β (Figura 14).

DISCUSIÓN

Actualmente existe una gran necesidad de nuevas terapias eficientes para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata hormono resistente (CPHR); en donde las terapias dirigidas a inhibir al receptor de andrógenos y sus vías de activación son las más estudiadas. En CPHR, una actividad elevada del RA puede ser resultado de: a) mutaciones en el dominio de unión al ligando, b) por un aumento en su transcripción, o c) por una incrementada fosforilación del receptor por otras vías de señalización. En este aspecto, diversos estudios han demostrado que la proteína de choque térmico de 90KDa (Hsp90), medía la estabilización del RA tanto en células normales como en cáncer; así como otras en otras vías necesarias para la sobrevivencia y crecimiento de células tumorales.

Por otro lado, se ha demostrado que la formación de esferoides en cáncer puede ser el puente entre los estudios *in vitro* e *in vivo* ya que representan mejor las condiciones de los organismos vivos. En el presente trabajo, se estableció la formación de esferoides de 2 líneas celulares de cáncer de próstata: PC3 y LNCaP, así como de un cultivo primario de paciente con cáncer de próstata (CPP).

Posteriormente para determinar la dosis necesaria para producir un cambio en el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90 y de esta manera determinar su papel específico en la formación de esferoides en las líneas celulares de CP, se realizaron curvas de tiempo-dosis-respuesta con un inhibidor de Hsp90 (17-DMAG).

Con el uso de 17-DMAG [50nM] no se observan diferencias significativas en el cambio de isoformas; algunos estudios previos del laboratorio (Pérez-Aquino, 2018), demostraron que tampoco esta dosis es suficiente para producir un efecto anti-migratorio por ensayo de cierre de herida en la línea PC3 a las 48h. Por esta razón, se descartó la dosis de [50nM]. Por otro lado 17-DMAG [500nM] tampoco demostró diferencias significativas en el perfil de expresión de las isoformas. Finalmente se decidió usar la dosis de 17-DMAG [250nM] ya que es la dosis a la que se observa un cambio significativo en las isoformas sin afectar la viabilidad como lo demuestran ensayos de viabilidad por MTT previos del laboratorio (Figura 15).

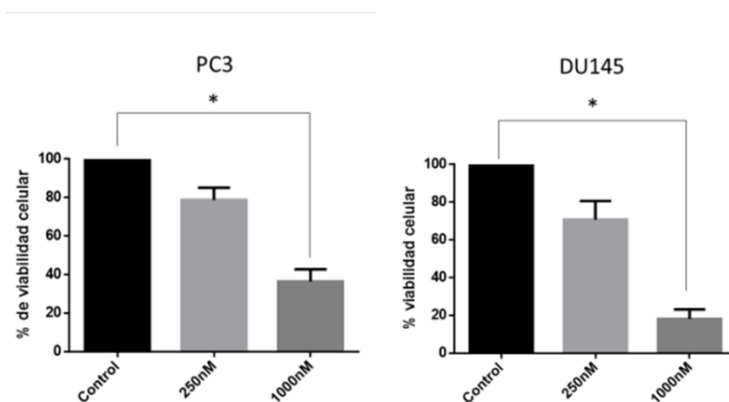


Figura 15. Efecto del inhibidor de Hsp90, 17-DMAG, sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata. Las líneas celulares PC3 y DU145 fueron incubadas con dos concentraciones de 17-DMAG, [250nM y 500nM] y se evaluaron a las 18h. Tomado de Pérez Aquino, 2018

Posteriormente, habiendo determinado la concentración, se decidió evaluar el efecto del inhibidor [250nM], en la formación de esferoides de las dos líneas celulares y el cultivo primario. La línea PC3, perdió la capacidad de formar esferoides, únicamente se formaron agregados celulares 3 veces mayor al esferoide control; esto debido a que no se logró la

compactación característica de la formación de esferoides. Probablemente la inhibición de Hsp90 esté afectando las uniones adherentes que permiten la compactación celular.

Por otro lado, al ser PC3 una línea celular muy agresiva, mostró ser muy sensible a la inhibición de Hsp90; se ha demostrado que la adicción a Hsp90 se presenta en líneas celulares más agresivas debido a la gran cantidad de oncoproteínas sobre expresadas que deben de ser estabilizadas por las chaperonas moleculares; algunos estudios demostraron que el uso de un iHsp90 (AT13387) inhibe la formación de esferoides de C666-1, una línea celular de carcinoma nasofaríngeo con sobreexpresión de AKT, encontrando únicamente células individuales(Chan, *et al.*, 2013).

Con relación a la pérdida de capacidad de formar esferoides, se observó una tendencia a disminuir la isoforma Hsp90 α en los esferoides de PC3 tratados con iHsp90.

En el caso de la línea celular LNCaP, la inhibición de Hsp90 provocó un aumento en la capacidad de formar esferoides; a tiempos cortos se observó una mayor cantidad de esferoides y de mayor tamaño con respecto al control esferoides de LNCaP tratados con 17-DMAG, aunque son más grandes, no logran sobrevivir el mismo tiempo que los esferoides sin tratamiento. Algunos estudios demuestran que la formación de los esferoides depende de las uniones celulares homotípicas mediadas principalmente por E-cadherina.

Se ha visto que la expresión diferencial de E-cadherina está asociada con la compactación de esferoides de células de hepatocarcinoma (Lin, *et al.*, 2006); en este aspecto, el estudio de Nagaraju en 2015, demostró que el uso de un inhibidor de Hsp90 (Ganetespib), promueve la sobreexpresión de E-cadherina en las líneas HTC-116 y HT-29 derivadas de cáncer colorrectal (Nagaraju, *et al.*, 2015).

Por otro lado, algunos estudios han descrito que inhibidores como la geldanamicina, inhibe el crecimiento de LNCaP (Krishna, *et al.*, 2006), y en esferoides se ha reportado que la inhibición de Hsp90 con 17-AAG retrasa la formación de los esferoides (Enmon, *et al.*, 2003); en este estudio se encontró que se fomenta la formación de esferoides, aunque éstos poseen un tiempo de vida más corto.

En este aspecto se ha descrito que el destino de los esferoides recae en el balance entre células vivas y muertas que lo conforman; en este caso pudimos observar una pérdida de la citoarquitectura característica y de la localización de las células muertas en núcleo; lo que puede llevar a los esferoides a su muerte prematura.

En conjunto, los resultados obtenidos en la línea LNCaP, se vieron asociados a la tendencia a incrementar la isoforma Hsp90 α ; caso contrario del observado en la línea PC3. Esto podría ser explicado por la expresión diferencial del receptor de andrógenos ya que se sabe que es proteína cliente de Hsp90.

Algunos estudios (Smith y Toft, 2008; Ferraloeschi, *et al.*; 2016) han demostrado que el receptor de andrógenos es sensible a la inhibición de Hsp90, perdiendo la habilidad de unión al ligando, disminuyendo su vida media y promoviendo la degradación vía proteosomal; todo esto podría sugerir que la iHsp90 inhibe la vía de receptor de andrógeno independiente de ligando llevando a la muerte celular de las células tanto hormono-resistentes como hormono-sensibles.

Finalmente, se desarrollaron esferoides derivados de tumores de pacientes con cáncer de próstata. Dada la dificultad de reconstruir el microambiente de un tumor *in vitro*, se han comenzado a desarrollar esferoides de cultivos primarios derivados de tumores; estos

modelos permiten recrear el microambiente, así como la heterogeneidad celular y conservar características histológicas del tumor (Ishiguro, *et al.*, 2017).

En este trabajo, se desarrollaron esferoides de un cultivo primario derivado de un paciente con cáncer de próstata, el paciente al momento del diagnóstico presentaba un PSA de 8.72; y un grado Gleason de 4+3=7. El paciente fue tratado con hormonoterapia y recibió radioterapia adyuvante sin lograr disminuir los niveles de PSA.

Los esferoides de CPP tratados con el iHsp90, mostraron un retraso en la formación del esferoide, algunos estudios demuestran que la inhibición de Hsp90 produce retraso en la formación de esferoides de las líneas celulares de CP: LNCaP y CWR22Rv1, este retraso se documentó de 2 a 9 días de formación (Enmon, *et al.*, 2006).

Es importante recalcar que, en los tres cultivos celulares, Hsp90 β se mantiene constante en tiempos cortos (24h a 72h) mientras que a tiempos largos (96h), cuando la subpoblación de células muertas es mayor, se pierde la inmunodetección de esta isoforma. Algunos estudios como el de Nogata en el 2000, demostraron que hay una sobreexpresión de Hsp90 β en tumores crónicos; lo que podría explicar la necesidad de las células por esta isoforma para mantener la integridad del esferoide (Nogata, *et al.*, 2000).

C ONCLUSIONES

- Las líneas celulares PC3 (RA-) y LNCaP (RA-), así como un cultivo derivado de tumor de cáncer de próstata (CPP) (RA+) poseen la capacidad de formar esferoides.
- El iHsp90, 17-DMAG [250nM] indujo un cambio significativo en el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β sin afectar su viabilidad.
- La susceptibilidad al iHsp90 en esferoides de CP se asoció a la hormono-dependencia., la línea celular PC3 (RA-) mostró ser sensible a la inhibición.
- La disminución de la isoforma Hsp90 α inducida por el uso del iHsp90, 17-DMAG, se asoció con la pérdida de formación de esferoides en la línea PC3 (hormono-resistente).
- El aumento de la isoforma Hsp90 α inducida por el uso del iHsp90, 17-DMAG, se vio asociada a un incremento en la capacidad de formar esferoides de la línea LNCaP, línea representativa de CPHS (RA+).
- El aumento de la isoforma de Hsp90 α a las 48h en CPP (RA+) se asoció con la capacidad de los esferoides de retomar su estructura.

- Achille, Tonie-Marie, Meyer, J., Morgan, J.R. (2012) 12(10): 1347–1360.
- Azad, A., Zoubeidi, A., Gleave, M., y Chi, K. (2014) Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* p. 1-10
- Ashkenazi, R, Gentry, Sara N., Jackson, T. (2008). Pathways to Tumorigenesis-Modeling Mutation Acquisition in Stem Cells and Their Progeny. 10(11): 1170–1182.
- Balistreri, CR; Candore, G., Lio, D; Carruba, G. (2005). Prostate cancer: from the pathophysiologic implications of some genetic risk factors to translation in personalized cancer treatments. *Cancer Gene Ther.* 21(1). p. 2-11
- Bernards, R., Weinberg, RA. (2002). A progression puzzles. *Nature.* 22 (418).
- Bryant, G., Lin-Wang, G., Mulholland, D. (2017). Overcoming Oncogenic Mediated Tumor Immunity in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (1542):1-19
- Calderwood, S., Khaleque, A., Sawyer D., Ciocca, D. (2006). Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences.* 31 (3) p. 164-172.
- Chan, K. C., Ting, C. M., Chan, P. S., Lo, M. C., Lo, K. W., Curry, J. E., Smyth, Mui Lee, T. W., Tong, W. N., Tsao, G. S., Shun, R. N. W., Lung, M. Li., Mak, N. K. (2013) A novel Hsp90 inhibitor AT13387 induces senescence in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells and suppresses tumor formation. *Molecular Cancer.* 12:128. p. 2-15

- Cortés-González, C. C., Ramírez-González, V., Ariza, A. C., & Bobadilla, N. A. (2008). Significado funcional de las proteínas de choque térmico de 90 kDa. *Revista de Investigación Clínica*, 60(4), 311-320
- Cortes-González, C., Barrera-Chimal, J., Ibarra Sánchez, M., Gilbert, M., Gamba, G., Zentella, A., Flores, M.E., Bobadilla, N.A. (2010). Opposite Effect of Hsp90 α and Hsp90 β on eNOS Ability to Produce Nitric Oxide or Superoxide Anion in Human Embryonic Kidney Cells. *Cell Physiol Biochem*. 26. P. 657-668.
- Den, R y Lou, B. (2012) Heat Shock protein 90 inhibition: rationale and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*. 4(4). 2011-2018
- Echeverría, P. C., Picard, D. (2009). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochimica et Biophysica*. 1803. p. 641-649
- Elliott NT, Yuan F. (2011) A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci*; 1001:59–74.
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889–895.
- Friedmann-Morvinski, D, Verma, Inder M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. 15(3) p. 244–253.
- Garcia-Carbonero R., Carnero A., Paz-Ares L. (2013) Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol*. 14(9) p 358-69
- Gillis, J. L., Selth, L. A., Centenera, M., Townley, S. L., Sun, S., Plymate, S. R., Tilley, W. D., Butler, L. M. (2013) Constitutively-active androgen receptor variants function

independently of the HSP90 chaperone but do not confer resistance to HSP90 inhibitors.

Oncotarget. 4 p. 691-704.

- Guo-Chang Fan. (2012) Role of Heat Shock Proteins in Stem Cell Behavior. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 111. p. 305–322.
- Hanahan, D., Weinberg, R., (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144. p. 646-674.
- Heath, E. I., Hillman, D. W., Vaishampayan, U., Sheng, S., Sarkar, F., Harper, F., Gaskins, M., Pitot, H. C., Tan, W., S., Ivy, P., Pili, R., Carducci, M. A., Lui, G. (2008). A Phase II Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG) in Patients with Hormone-Refractory Metastatic Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 14(23). p. 7940–7946.
- Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 108. p. 283–289
- Ji, L., Kyung, W., Jeong-Eun, K., Sang, W., Jae, H., Seok-Hyun, K., Jun, J., Tae, G, Hyun-Yeol, N., Mee, S., Eun, H., Lee, M., Mee-Seon, K., Hyoun, W. (2015) Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer. 8(8): p. 9487–9493.
- Jiménez, MA., Solares, M; Martínez P; Aguilar J.L.; Martínez, J., Hinojosa, J., Rivera, R., Zamora, J. (2011) Oncoguía: Cáncer de próstata. *InCan.* 14-18.
- Koreckij, T. D., & Corey, E. (2009). Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 9(2), 237-249.

- Krishna-Vanaja, D., Mitchell, S. H., Toft, D. O., Young, C. Y. F. (2002) Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability. *Cell Stress & Chaperones*. 7 (1). p. 55–64.
- Lathia, J., Venere, M., Rao, M., Rich, J. (2011) Seeing is Believing: Are Cancer Stem Cells the Loch Ness Monster of Tumor Biology? *Stem Cell Rev*. 7(2) p. 227–237
- Lee, J., Kang, K., Jeong-Eun, K., Sang, W., Park, J., Seok-Hyun, K., Jun, H., Tae, G., Hyun-Yeol, N., Mee, S., Eun, H., Moon-il, P., Mee-Seon, K., Hyoun, W. (2015) Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.*; 8(8) p. 9487–9493.
- Lin, R. Z., Chou, L. F., Chien, C. C. & Chang, H. Y. (2006) Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res*. 324. p. 411–422.
- McDowell, C., Sutton, R., Obermann, W. (2009). Expression of Hsp90 chaperome proteins in human tumor tissue. *International Journal of Biological Macromolecules* 45 p. 310–314.
- Milicevic, Z., Bogojevic, D., Mihailovic, M., Petrovic M., Krivokapic Z. (2008). Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression. 32(6). p 1169-78.
- Miyata, Y., Nakamoto, H., Neckers, L. (2013) The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks. *Current Pharmaceutical Design*. 19. 347-365.

- Monazzama, A., Razifarb, P., Iled, S., Rugaard, M. (2009). Evaluation of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multicellular tumour spheroids with respect to effects on growth and PET tracer uptake. 36. 335–342.
- Raymond Josephssonf, Carl Blomqvista, Bengt Langströmg, Mats Bergströmh
- Moltzahn, F., Thalmann, G. (2013) Cancer stem cells in prostate cancer. *Trans Androl Urol* 2(3) p. 242-253.
- Moro, A., Laborí, C., Bouzó, A., González, J. (2011) cáncer de próstata resistente a castración. Mecanismos de progresión y nuevos tratamientos. *Revista cubana de urología*. 1(1).
- Nagaraju, G. P., Long, T. E., Park, W., Landry, J. C., Taliaferro-Smith, L., Farris, A. B., Diaz R., El-Rayes, B. F. Heat Shock Protein 90 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition, Invasion and Migration in Colorectal Cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 54:1147–1158.
- Oh, W.K., Galsky, M. D., Stadler, W. M., Srinivas, S., Chu, F., Bubley, G., Goddard, J., Dunbar, J., Ross, R. W. (2011) Multicenter phase II trial of the heat shock protein 90 inhibitor, retaspimycin hydrochloride (IPI-504), in patients with castration-resistant prostate cancer. *Urology*. 78 (3). 626-30.
- Ogata, M., Naito, Z., Tanaka, S., Moriyama Y., Asano G. (2000) Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in ancretic carcinoma. *J Nippon Med Sch*. 67 (3). p. 177-185
- Pamploni, F., Reynaud, E.M., Stelzer, E, H, K. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews*. (8) p. 839-845.

- Pearl, L. H., & Prodromou, C. (2006). Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, p. 271-294.
- Prince, T. L., Kijima, T., Tatokoro, M., Lee, S., Tsutsumi, S., Yim, K., Rivas, C., Alarcon, S., Schwartz, H. (2015). Client Proteins and Small Molecule Inhibitors Display Distinct Binding Preferences for Constitutive and Stress-Induced HSP90 Isoforms and Their Conformationally Restricted Mutants. *PLOS ONE*. 10:137. p. 1-15
- Kofi Khamit-Kush¹, Bradley T. Scroggins³, Kristin Beebe¹, Jane B. Trepel², Len Neckers¹
- Pienta, KJ., Brandley, D. (2006) Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 12(6). 1665-71.
- Rong, B., Zhao, C., Liu, H., Cai, X., Gao, W., Yang, S. (2014) Identification and verification of Hsp90-beta as a potential serum biomarker for lung cancer. *Am J Cancer*. 4(6). p 874-885.
- Schedin, P., Elias, A. (2004) Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Research*. 6 (2) p. 93-101.
- Sharpe, B., Beresford, M., Bowen, R., Mitchard, J., Chalmers, A. (2013) Searching for Prostate Cancer Stem Cells: Markers and Methods.
- Smith D. F. y Toft D. O. The Intersection of Steroid Receptors with Molecular Chaperones: Observations and Questions. (2008). *Molecular Endocrinology*. 22(10). p. 2229–2240
- Sreedhar, S., Kalmár, É., Csermely, P., & Shen, Y.-F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562(1-3), p. 11-15.

- Stadler, M., Scherzer, M., Stefanie Walter¹, Holzner, S., Pudelko, K., Riedl, A., Unger C., Kramer, N., Weil, B., Neesen, J., Hengstschläger, M., Dolznig, H. (2018). Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Scientific REPORTS*. 8:1151. 1-16
- Stavridi, F., Karapanagiotou, E., Syrigos, K. (2010). Targeted therapeutic approaches for hormone-refractory prostate cancer. 36. p 122–130.
- Thakur, M. K., Heilbrun, L. K., Sheng, S., Stein, M., Liu, G., Antonarakis, E. S., Vaishampayan, U., Dzinic, S. H., Li, X., Freeman, S., Smith D., Heath, E. (2016). A phase II trial of ganetespib, a heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitor, in patients with docetaxel-pretreated metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC)-a prostate cancer clinical trials consortium (PCCTC) study. *Invest New Drugs*. 34. p. 112–118
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci*. 91. 8324–8328.
- Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews*, 5, p. 761-772.
- Wu, J., Lui, T., Rios, Z., Qibing, M., Lin, X., Shousong, C. (2017) Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38:3. P. 226-256
- Xin, Y., Stephen P. (2009) Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. *Urologic Oncology*. 27. p 36-41
- Yakota, J. Tumor progression and metastasis. (2000). *Carcinogenesis*. 21(3). P 497-503.

- Yuhas, J.M., Li A.P., Martínez, A.O., Ladman, A.J. (1977). A simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Research*. 37. p. 3639-3643
- Zong, Y., & Goldstein, A. S. (2013). Adaptation or selection mechanisms of castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol.*, 10(2), p. 90-98.
- Zhao R, Davey M, Hsu YC, Kaplanek P, Tong A, Parsons AB, Krogan N, Cagney G, Mai D, Greenblatt J, Boone C, Emili A, Houry WA.R. (2005) Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 120, p. 715–727.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

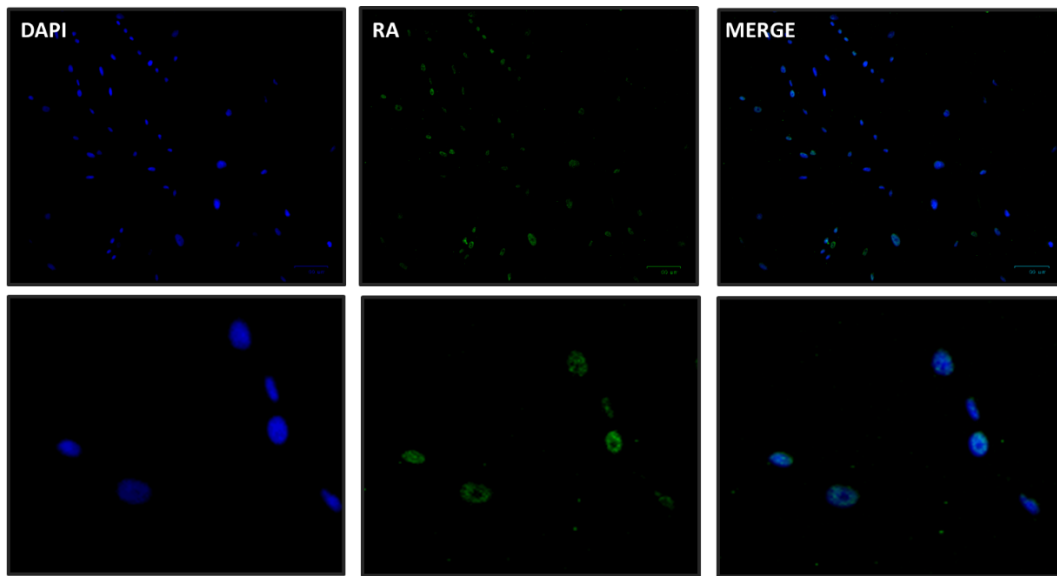


Figura 1. Inmunodetección de receptor de andrógenos en cultivo celular de CPP. Inmunofluorescencia del RA (verde) y nuclear (dapi) de cultivo derivado de tumor de pacientes con cancer de próstata.