



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### TESIS

Potencial tumorigénico de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en un modelo de cáncer renal

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

### PRESENTA:

L.B.D. Brenda Larissa Calvo Hernández

### TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Luis A. Herrera Montalvo  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

### MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)  
Dra. Marcela Lizano Soberón  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Octubre, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Calvo Hernández Brenda Larissa**  
**Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 28 de junio del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Potencial tumorigénico de Hsp90a y Hsp90β en un modelo de cáncer renal**", dirigida por el/la Dr(a). **Herrera Montalvo Luis Alonso**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Alejandro Manuel García Carrancá
VOCAL	María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
VOCAL	Carlo César Cortés González
VOCAL	Jonatan Barrera Chimal
SECRETARIO	Pedraza Chaverri José

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 28 de junio de 2021**  
**COORDINADORA**



**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

# Agradecimientos

El presente proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología perteneciente a la Unidad Periférica de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y del Dr. Carlo César Cortés González, y recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del Fondo SEP-CONACyT con número de proyecto 243380.

Agradezco al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas (UNAM), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría. Así como al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por los recursos otorgados para la asistencia al Congreso "Next Frontiers to Cure Cancer", en Sao Paulo, Brasil.

Gracias al Dr. Carlo César Cortés González por la confianza brindada, pero sobre todo por hacerme sentir parte de una segunda familia, en donde mis compañeros de laboratorio fueron pieza fundamental para concretar este trabajo. Gracias a Gaby, Eduardo, Aline y Rafael.

Agradezco al Dr. Luis A. Herrera Montalvo, a la Dra. Norma Araceli Bobadilla y a la Dra. Marcela Lizano Soberón, miembros del Comité Tutor, por sus contribuciones al proyecto.

Porque este proyecto hubiera sido imposible sin el apoyo, motivación y trabajo en equipo que logré con mi amiga, compañera de laboratorio y ahora colega, Ilse Mariana. Gracias por impulsarme a ser mejor persona.

A mi familia, por ser el pilar más importante, por su apoyo incondicional y por enseñarme a hacer las cosas con amor y dedicación. La culminación de esta etapa se la dedico totalmente a mis padres, Gloria y Gilberto. A mis hermanas, Syaney, Gala y Frida por motivarme y dejarme ser un ejemplo.

# Índice

Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Abreviaturas	9
Resumen	12
Abstract	14
Introducción	16
Proteínas de choque térmico (Hsp)	18
Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)	20
Hsp90 en cáncer	23
Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ en cáncer	26
<i>Hsp90<math>\alpha</math> en cáncer</i>	26
<i>Hsp90<math>\beta</math> en cáncer</i>	27
Inhibición farmacológica de Hsp90 en cáncer	28
<i>Inhibición específica de las isoformas de Hsp90</i>	28
Modelos tumorales <i>in vitro</i> y su aplicación en la investigación biomédica	30
Adenocarcinoma renal	33
<i>Terapéutica actual contra el adenocarcinoma renal</i>	34
<i>Modelos tumorales in vitro y carcinoma renal</i>	35
Hsp90, como blanco terapéutico en adenocarcinoma renal	37
Antecedentes directos	40
Planteamiento del problema	41
Hipótesis	42
Objetivo general y particulares	42

Material y métodos	43
Resultados	48
Discusión	62
Conclusiones	70
Perspectivas	71
Figuras suplementarias	72
Bibliografía	73

# Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Gradientes que regulan la función y el comportamiento celular en un esferoide	31
<b>Figura 2.</b>	Hsp90 como blanco terapéutico en adenocarcinoma renal	38
<b>Figura 3.</b>	Adaptación de las técnicas <i>liquid overlay</i> y agitación para la generación de esferoides	44
<b>Figura 4.</b>	La línea celular de adenocarcinoma renal 786-O tiene la capacidad de formar esferoides	49
<b>Figura 5.</b>	Influencia de la densidad celular y concentración sérica para la generación de esferoides	50
<b>Figura 6.</b>	Capas características del modelo tumoral <i>in vitro</i>	51
<b>Figura 7.</b>	La microscopía de fluorescencia por Light-Sheet permitió validar la tridimensionalidad del modelo tumoral <i>in vitro</i>	52
<b>Figura 8.</b>	El uso del inhibidor de Hsp90 tiene un efecto en el tamaño, morfología y compactación en los esferoides generados con la línea celular 786-O	54
<b>Figura 9.</b>	Efecto de la inhibición de Hsp90 en la población de células vivas y muertas en esferoides generados con la línea celular 786-O	56
<b>Figura 10.</b>	Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ durante la formación y maduración de esferoides	59
<b>Figura 11.</b>	Efecto de la inhibición de Hsp90 en marcadores de maduración en esferoides generados con la línea celular 786-O	60
<b>Figura 12.</b>	El uso del inhibidor de Hsp90 disminuye la capacidad de formar colonias en esferoides generados con la línea celular 786-O	61
<b>Figura 13.</b>	El uso del inhibidor de Hsp90 impide que los esferoides alcancen la etapa de maduración.	66
<b>Figura 14.</b>	Optimización del modelo tumoral <i>in vitro</i>	72

# Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de la subfamilia de las Hsp: miembros representativos, localización intracelular y principales funciones	18
<b>Tabla 2.</b>	Principales características distintivas de los miembros de la familia Hsp90	20
<b>Tabla 3.</b>	Principales diferencias en la expresión y función de las isoformas Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$	22
<b>Tabla 4.</b>	Proteínas “cliente” de Hsp90 relacionadas con el crecimiento tumoral y supervivencia celular	23
<b>Tabla 5.</b>	Características genotípicas y fenotípicas de las líneas celulares de adenocarcinoma renal, 786-O y ACHN	43
<b>Tabla 6.</b>	Proteínas detectadas por inmunoblotting	47

# Abreviaturas

<b>17-AAG</b>	Inhibidor de Hsp90 (por su fórmula química, 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina)
<b>17-DMAG</b>	Inhibidor de Hsp90 (por su fórmula química, 17-dimetilamino-etilamino-17-demetoxidedanamicina)
<b>786-O</b>	Línea celular de adenocarcinoma renal, 786-O
<b>ACHN</b>	Línea celular de adenocarcinoma renal, ACHN
<b>Akt</b>	Proteína cinasa B
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato (del inglés, <i>Adenosine Triphosphate</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino (del inglés, <i>Bovine Serum Albumine</i> )
<b>CR</b>	Carcinoma Renal
<b>CRcc</b>	Carcinoma Renal de células claras
<b>ECM</b>	Matriz extracelular (del inglés, <i>Extra Cellular Matrix</i> )
<b>eHsp90</b>	Proteína Hsp90 secretada de manera extracelular (del inglés, <i>extracellular Hsp90</i> )
<b>eHsp90<math>\alpha</math></b>	Proteína Hsp90 secretada de manera extracelular, correspondiente a la isoforma alfa (del inglés, <i>extracellular Hsp90 alpha</i> )
<b>EMEM</b>	Medio de cultivo <i>Eagle s Minimum Essential Medium</i>
<b>EMT</b>	Transición epitelio mesénquima (del inglés, <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Sintasa endotelial (del inglés, <i>endothelial nitric oxyde synthase</i> )
<b>EthD-1</b>	Homodímero de etidio-1 (del inglés, <i>ethdium homodimer-1</i> )
<b>GA</b>	Geldanamicina
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (del inglés, <i>glycerladehyde-3-phosphate-dehydrogenase</i> )
<b>GLUT-1</b>	Transportador de glucosa 1 (del inglés, <i>Glucose Transporter-1</i> )

<b>Grp94</b>	Proteína reguladora por glucosa de 94 kDa (del inglés, <i>Glucose regulated protein 94</i> )
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible de hipoxia 1 $\alpha$ (del inglés, <i>Hypoxia Induction Factor 1a</i> )
<b>Hse's</b>	Elementos de choque térmico (del inglés, <i>Heat shock elements</i> )
<b>HSF-1</b>	Factor de choque térmico-1 (del inglés, <i>Heat Shock Factor-1</i> )
<b>Hsp</b>	Proteína de choque térmico (del inglés, <i>Heat Shock Protein</i> )
<b>Hsp90</b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa (del inglés, <i>Heat Shock Protein 90</i> )
<b>HSP90AA1</b>	Gen que codifica la proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa
<b>HSP90AB1</b>	Gen que codifica la proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma beta
<b>Hsp90<math>\alpha</math></b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa (del inglés, <i>Heat shock protein alpha</i> )
<b>Hsp90<math>\beta</math></b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma beta (del inglés, <i>Heat shock protein beta</i> )
<b>iHsp90</b>	inhibidor de Hsp90
<b>KUNB31</b>	Inhibidor selectivo de la isoforma Hsp90 $\beta$
<b>MCF 7</b>	Línea celular de cáncer de mama
<b>MMP2</b>	Metaloproteínasa 2 (del inglés, <i>matrix metalloproteinase-2</i> )
<b>mTOR</b>	Blanco de Rapamicina en células de mamífero (del inglés, <i>mammalian Target of Rapamycin</i> )
<b>NF-KB</b>	Factor nuclear Kappa B (del inglés, <i>Nuclear factor Kappa B</i> )
<b>NO</b>	Óxido Nítrico (del inglés, <i>Nitric Oxide</i> )
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fostato (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-cinasa (del inglés, <i>1-Phosphatidylinositol 3-kinase</i> )

<b>PTEN</b>	Homólogo de la fosfatasa tensina (del inglés, <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> )
<b>PVDF</b>	Membrana de Fluoruro de polivinilideno (del inglés, <i>Polyvinylidene fluoride</i> )
<b>pVHL</b>	Supresor tumoral Von Hippel Lindau (del inglés, <i>protein Von Hippel Lindau</i> )
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo <i>Roswell Park Medium Institute</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacralimida con dodecil sulfato sódico (del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>sHsp</b>	Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (del inglés, <i>small Heat shock protein</i> )
<b>SKBR3</b>	Línea celular de cáncer de mama aislada por el Centro de cáncer memorial Sloan Kettering
<b>TRAP1</b>	Proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral-1 (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor Type 1 receptor associated protein</i> )
<b>TBS</b>	Solución salina tamponada con Tris (del inglés, <i>Tris Buffered Saline</i> )
<b>USP22</b>	Proteasa específica de la ubiquitina 22 (del inglés, <i>Ubiquitine Specific Proteasa 22</i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i> )
<b>VEGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, <i>Vascular Endotelial Growth Factor Receptor</i> )
<b>VHL</b>	Gen Von Hippel Lindau

# Resumen

**Introducción:** La proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) es una chaperona molecular que incrementa la estabilidad de sus proteínas “cliente”. En células de cáncer se ha observado una mayor expresión de Hsp90 que en células normales, esto se debe a que un gran número de proteínas “cliente” de Hsp90 participan en el crecimiento y supervivencia de células cancerosas. Específicamente en carcinoma renal, la vía de señalización del fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), proteína cinasa B (Akt) y el blanco de Rapamicina en células de mamífero (mTOR), que regula el crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular, así como la angiogénesis y el metabolismo de las células, se encuentra desregulada, asociándose a un desarrollo de cáncer renal agresivo y con baja tasa de supervivencia. Dentro de esta vía de señalización se encuentran distintas oncoproteínas reguladas y estabilizadas por Hsp90. Como resultado, se han desarrollado inhibidores que interrumpen su actividad chaperona, provocando la degradación proteosomal de sus proteínas “cliente”. Sin embargo, la respuesta terapéutica del uso de inhibidores de Hsp90 no ha sido el esperado, debido a los efectos adversos y falta de afinidad específica por alguna de las isoformas de Hsp90, por lo que el presente proyecto de investigación propone estudiar la implicación de las isoformas citosólicas más abundantes de Hsp90, la proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa (Hsp90 $\alpha$ ) y la proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma beta (Hsp90 $\beta$ ), como proteínas clave en el desarrollo tumoral.

**Objetivo:** Establecer la participación de las proteínas de choque térmico; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación y maduración de tumores *in vitro* en un modelo de cáncer renal.

**Metodología:** Se estableció un modelo tumoral *in vitro* de adenocarcinoma renal en el cual se identificaron las etapas de formación y maduración, mediante microscopía de contraste de fases. con el objetivo de conocer si existía un cambio de perfil de expresión en los niveles de proteína de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y/o Hsp90 $\beta$ , los esferoides fueron tratados con el inhibidor de Hsp90 (iHsp90), 17-dimetilamino-etilamino-17-demetoxidedanamicina (17-DMAG), empleando curvas dosis-tiempo-respuesta, monitoreando la formación y maduración de los tumores *in vitro* con la presencia de marcadores de proliferación y quiescencia.

**Resultados:** En el presente proyecto de investigación se determinó la posible participación específica de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en un modelo tumoral *in vitro* de adenocarcinoma renal. Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de expresión proteica de la isoforma Hsp90 $\alpha$  son esenciales para la progresión tumoral, mientras que la expresión proteica de la isoforma Hsp90 $\beta$  es importante para la viabilidad y mantenimiento de los esferoides. Los ensayos de inhibición farmacológica de Hsp90 con 17-DMAG permitieron determinar que la maduración de los tumores *in vitro* es dependiente de Hsp90, donde el tratamiento no impidió la formación de tumores, pero si la maduración de estos.

**Conclusiones:** En el presente proyecto de investigación se demostró en un modelo tumoral *in vitro* de cáncer renal, el aumento en los niveles de proteína de la isoforma Hsp90 $\alpha$  se asociaron a la capacidad de formación de tumores, como a su capacidad para alcanzar la etapa de maduración. La inhibición farmacológica de Hsp90 con 17-DMAG tiene un efecto antitumoral en cultivos 3D *in vitro* generados con la línea celular de adenocarcinoma renal 786-O, impidiendo su maduración. De acuerdo con nuestros resultados, los inhibidores específicos de Hsp90 $\alpha$  podrían ser más efectivos contra la tumorigénesis del carcinoma renal que los inhibidores inespecíficos de isoforma, como el 17-DMAG.

# Abstract

**Introduction:** Heat shock protein 90 (Hsp90) is a molecular chaperone that increases the stability of its "client" proteins. In cancer cells a higher expression of Hsp90 than in normal cells has been observed, this is because many Hsp90 client proteins are involved in cancer cell growth and survival. Specifically in renal carcinoma, the signaling pathway of phosphoinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and mammalian target of Rapamycin (mTOR), which regulates cell growth, differentiation, migration and survival, as well as angiogenesis and cell metabolism, is deregulated, being associated with the development of aggressive renal cancer with a low survival rate. Within this signaling pathway are different oncoproteins regulated and stabilized by Hsp90. As a result, inhibitors have been developed that interrupt their chaperone activity, causing proteosomal degradation of their "client" proteins. However, the therapeutic response to the use of Hsp90 inhibitors has not been as expected, due to adverse effects and lack of specific affinity for any of the Hsp90 isoforms, therefore, the present research project proposes to study the involvement of the most abundant cytosolic isoforms of Hsp90, the Heat Shock protein 90, alpha isoform (Hsp90 $\alpha$ ) and the Heat shock protein 90, beta isoform (Hsp90 $\beta$ ), as key proteins in tumor development.

**Aim:** To establish the involvement of heat shock proteins; Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  during tumor formation and maturation in vitro in a renal cancer model.

**Methodology:** An in vitro tumor model of renal adenocarcinoma was established in which the stages of formation and maturation were identified by phase contrast microscopy. In order to determine whether there was a change in the expression profile of protein levels of Hsp90 $\alpha$  and/or Hsp90 $\beta$  isoforms, spheroids were treated with the Hsp90 inhibitor 17-DMAG using dose-time-response curves, monitoring tumor formation and maturation in vitro with the presence of proliferation and quiescence markers.

**Results:** In the present research project we determined the possible isoform-specific involvement between Hsp90 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  in an in vitro tumor model of renal adenocarcinoma. The results obtained suggest that protein expression levels of the Hsp90 $\alpha$  isoform are essential for tumor progression, whereas protein expression of the Hsp90 $\beta$  isoform is important for spheroid viability and maintenance. Pharmacological Hsp90

inhibition assays with 17-DMAG allowed us to determine that tumor maturation in vitro is Hsp90-dependent, where treatment did not prevent tumor formation, but did prevent tumor maturation.

**Conclusions :** In the present research project it was demonstrated in an in vitro tumor model of renal cancer, increased protein levels of the Hsp90 $\alpha$  isoform were associated with tumor formation capacity, as with its ability to reach the maturation stage. Pharmacological inhibition of Hsp90 with 17-DMAG has an antitumor effect on in vitro 3D cultures generated with the 786-O renal adenocarcinoma cell line, preventing its maturation. According to our results, Hsp90 $\alpha$ -specific inhibitors could be more effective against renal carcinoma tumorigenesis than isoform-nonspecific inhibitors, such as 17-DMAG.

# Introducción

El carcinoma renal (CR) es un grupo heterogéneo de cánceres que se desarrolla en las células del epitelio tubular y comprende alrededor del 85% de las neoplasias renales, siendo el carcinoma renal de células claras (CRcc) el subtipo histológico más común (Hsieh JJ, *et al.*, 2017). Los tumores de CR se caracterizan por un fenotipo agresivo y desarrollo de resistencia a la terapia, características atribuidas al genotipo VHL (-/-) y PTEN (-/-), donde la vía de señalización Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  se encuentra desregulada. Dentro de esta vía de señalización se encuentran distintas oncoproteínas reguladas y estabilizadas por la proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90).

En el año 2010, se evaluó la participación de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la vía de señalización de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y óxido nítrico (NO) mediada por la cinasa Akt. Empleando un modelo *in vitro* de sobreexpresión de cada una de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , demostraron que la sobreexpresión de la isoforma Hsp90 $\alpha$  se asoció a un incremento en los niveles de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, mientras que la sobreexpresión de Hsp90 $\beta$  produjo el efecto contrario, reduciendo significativamente los metabolitos del óxido nítrico (Cortés *et al.*, 2010). Estos resultados propusieron que la función diferencial entre las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la vía de señalización eNOS/NO/O<sub>2</sub>, se promovía a través de la fosforilación de la cinasa Akt.

En células de cáncer se ha observado una mayor expresión de Hsp90 que en células normales, esto se debe a que un gran número de proteínas “cliente” de Hsp90 participan en el crecimiento y sobrevivencia de células cancerosas. Durante décadas, se ha estudiado el potencial de Hsp90 como blanco terapéutico en la terapéutica actual contra diversos tipos de cáncer (Neckers *et al.*, 1999; Sharp & Workman. 2006). Como resultado, se han desarrollado inhibidores que interrumpen la unión del adenosin trifosfato (ATP) a Hsp90 y por consiguiente su actividad chaperona, provocando la degradación proteosomal de sus proteínas “cliente”. La seguridad y eficacia de varios inhibidores de Hsp90 se han probado en ensayos clínicos de fase I, fase II y fase III, tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes anticancerosos (Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, han demostrado efectos adversos como hepatotoxicidad, náuseas, vómitos, diarrea e hipersensibilidad (Anyika *et al.*, 2015), debido a las propiedades farmacológicas de los agentes desarrollados,

afinidad contra isoformas de la familia de proteínas Hsp90; así como, a la dosificación y esquema de tratamiento empleados.

Considerando el papel de Hsp90 como “chaperona del cáncer” y del rol diferencial de sus isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , el presente proyecto de investigación propone estudiar la implicación de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  como proteínas clave en el desarrollo tumoral. La caracterización de los niveles de las proteínas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación y maduración de tumores *in vitro* (esferoides o cultivos 3D) generados con líneas celulares de CR con fenotipo agresivo, permitirá ampliar las bases moleculares que dictaminan la tumorigénesis del cáncer renal.

# Proteínas de choque térmico (Hsp)

Las Hsp's pertenecen a una familia multigénica de proteínas descritas como chaperonas moleculares por la función celular que desempeñan. El peso molecular de los distintos miembros de la familia Hsp varía entre los 10 y 150 kDa, dando lugar a una clasificación de 6 subfamilias: Hsp pequeñas, de bajo peso molecular o small Hsp (sHsp) (18-30kDa), proteínas de choque térmico menores a 40 kDa (Hsp40), proteínas de choque térmico menores a 60 kDa (Hsp60), proteínas de choque térmico menores a 70 kDa (Hsp70), proteínas de choque térmico 90 kDa (Hsp90) y Hsp de alto peso molecular (>100 kDa) (Sreedhar *et al.*, 2004).

En la tabla 1, se describen los miembros pertenecientes a cada subfamilia de Hsp, indicando su principal localización intracelular y su función celular más estudiada.

**Tabla 1. Clasificación de la subfamilia de las Hsp's: miembros representativos, localización intracelular y principales funciones.**

Subfamilia	Miembros	Localización intracelular	Función	Referencia
sHsp	Ubiquitina Hsp10 Hsp20-30	C, N, y M	Degradación de proteínas, tolerancia al estrés oxidativo, co-factor de Hsp60.	Jakob <i>et al.</i> , 1993.
Hsp40	Hsp40 Hsp47	C, N, y RE	Co-chaperona de Hsp72, plegamiento de proteínas.	Misselwitz <i>et al.</i> , 1998
Hsp60	Hsp60	C y M	Plegamiento de proteínas.	Csermely <i>et al.</i> , 1998.
Hsp70	Hsp72 Hsp73 mtHsp70	C, M, y RE	Termotolerancia, plegamiento de proteínas, transporte de proteínas.	Misselwitz <i>et al.</i> , 1998
Hsp90	Hsp90 $\alpha$ Hsp90 $\beta$ TRAP-1 Grp94 Hsp90-N	C, N, M, y RE	Plegamiento y degradación de proteínas, interacción con receptores hormonales y factores de transcripción.	Csermely <i>et al.</i> , 1998.
Hsp100	Hsp 104-110	C, N, RE	Termotolerancia, tolerancia isquémica	Lund. 2001

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

Como se muestra en la Tabla 1, cada uno de los miembros de la subfamilia de las Hsp's, tienen una función específica en el mantenimiento de la homeostasis celular.

En la subfamilia Hsp90, se encuentran dos tipos de proteínas; las independientes de ATP y las ATP dependientes. Las sHsp son las encargadas de unirse a proteínas desnaturalizadas y evitar su agregación irreversible (Jakob *et al.*, 1993), mientras que Hsp40 se considera el principal controlador de la función de Hsp70 (Misselwitz *et al.*, 1998), ambas chaperonas moleculares tienen una función independiente de ATP y cooperativa hacia la familia Hsp90.

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

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

El trabajo coordinado de todas las Hsp's es necesario para el mantenimiento de la homeostasis celular, sin embargo, Hsp90, sobresale por su papel en diversas vías de señalización que la hacen un blanco importante en el entendimiento y tratamiento de distintas patologías, dentro de las que se encuentra el cáncer (Xu & Neckers. 2007).

# Proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)

En condiciones fisiológicas, Hsp90 comprende del 1 al 2% del contenido celular proteico. La función molecular más estudiada y conocida de Hsp90 es que actúa como modulador alostérico de diversas proteínas blanco o mejor conocidas como proteínas “cliente” de Hsp90 (Pearl. 2016). Dentro de las principales funciones celulares de Hsp90 se encuentran:

- Asistir al plegamiento de proteínas inmaduras, proporcionando la conformación adecuada y evitando la agregación proteica.
- Favorecer la translocación de sus proteínas “cliente” a organelos o a la membrana celular y nuclear.
- Activar las proteínas “cliente” a través de su fosforilación y/o dimerización.
- Degradación de proteínas mediante ubiquitinación.
- Mediación de procesos pro y antiapoptóticos.
- Desarrollo y diferenciación celular, mediante regulación del ciclo celular.

La subfamilia de las proteínas Hsp90 está compuesta por cinco miembros, que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Principales características distintivas de los miembros de la familia Hsp90**

Gen	Nombre completo	Proteína a la que codifica	Localización subcelular	Referencia
<b>HSP90AA1</b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa alfa, clase A, miembro 1	Hsp90 alfa (Hsp90 $\alpha$ )	Citoplasma	Zhao <i>et al.</i> , 2005
<b>HSP90AB1</b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa beta, clase B, miembro 1	Hsp90 beta (Hsp90 $\beta$ )	Citoplasma	Zhao <i>et al.</i> , 2005
<b>HSP90B1</b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa beta, miembro 1	Glucose regulated protein (Grp94/96)	Retículo endoplásmico	Marzec <i>et al.</i> , 2012
<b>TRAP1</b>	Proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral, tipo1	Hsp90L	Mitocondria	Hoter <i>et al.</i> , 2018
<b>HSP90N</b>	Proteína de choque térmico de 90 kDa N	Hsp90N Hsp89 $\alpha$ $\Delta$ N	Membrana	Hoter <i>et al.</i> , 2018

La localización subcelular de las proteínas Hsp90 incluye el citosol, al retículo endoplásmico, membranas celulares y mitocondrias. La función de cada isoforma está relacionada con el compartimento celular en el que se encuentra y de las proteínas “cliente” que regula (Sreedhar *et al.*, 2004).

Por ejemplo, la proteína reguladora por glucosa de 94 kDa (Grp94) codificada por el gen HSP90B1 al encontrarse en RE, sus proteínas “cliente” son distintas a la de otros miembros de la subfamilia de Hsp90. Las proteínas plegadas en el RE contienen pliegues distintos, en su mayoría compuestos por una gran cantidad de puentes disulfuro, además de ser dependientes del plegamiento oxidativo. Las cisteínas en estas proteínas tienden a oxidarse debido a que el lumen del RE es aproximadamente 30 veces más oxidante que el citosol; estas características hacen que la función y proteínas “cliente” de Grp94 sean específicas (Marzec *et al.*, 2012).

Como se observa en la Tabla 2, las dos isoformas citosólicas de Hsp90 corresponden a Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , codificadas por los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, respectivamente. En conjunto, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  interactúan con aproximadamente el 10% del proteoma eucarionte (Zhao *et al.*, 2005), lo que representa alrededor de 2,000 proteínas (Echeverría *et al.*, 2011), de las cuales experimentalmente se han confirmado ~725 interacciones proteína-proteína (Taipale *et al.*, 2010). Al ser ambas isoformas responsables de la maduración de las principales proteínas de señalización, como factores de transcripción, ubiquitina ligasas y cinasas reguladoras, el interés en conocer cómo es que participan y regulan distintos procesos celulares, las ha sugerido como un excelente blanco terapéutico (Prodromou. 2016).

A pesar de que las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  poseen una alta identidad de aminoácidos, a nivel de nucleótidos muestran cambios evidentes, especialmente en las regiones 3' y 5' no codificantes. Las diferencias en estas regiones no codificantes permiten la regulación específica de la expresión de Hsp90 $\alpha$  por diferentes factores de transcripción, dependiendo de las condiciones celulares, variaciones que divergen en las funciones específicas de cada proteína (Haasse & Fitze. 2015).

En la Tabla 3, se indican las principales diferencias en la expresión y las funciones intracelulares a las que han sido asociadas las isoformas de Hsp90; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ .

**Tabla 3. Principales diferencias en la expresión y función de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$**

Isoforma	Funciones intracelulares	Estado de mayor expresión	Referencia
<b>Proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma alfa (Hsp90<math>\alpha</math>)</b>	Promoción del crecimiento Regulación del ciclo celular Inducible por estrés Citoprotección	Inducible	Taherian et al., 2008
<b>Proteína de choque térmico de 90 kDa, isoforma beta (Hsp90<math>\beta</math>)</b>	Desarrollo embrionario temprano Maduración de células germinales Estabilización del citoesqueleto Transformación celular Transducción de señales	Constitutiva	Taherian et al., 2008

# Hsp90 en cáncer

En la mayoría de los cánceres, Hsp90 y sus proteínas “cliente” se encuentran expresadas en mayores niveles que en células normales. Dentro de la amplia gama de proteínas “cliente” involucradas en el desarrollo del cáncer se encuentran: receptores tirosina cinasa, moléculas de señalización, cinasas, factores de transcripción, entre otros. En la tabla 4 se observan las principales proteínas “cliente” de Hsp90 y la función con la que han sido relacionadas en cáncer (Carey *et al.*, 2006).

**Tabla 4. Proteínas “cliente” de Hsp90 relacionadas con el crecimiento tumoral y supervivencia celular.**

Clase	Proteína “cliente” de Hsp90	Función	Referencia
<b>Receptores tirosina-cinasa</b>	Human epidermic receptor-2 (Her2)	Promoción de proliferación celular e inhibición de la apoptosis.	Moasser. 2007
	Endothelial Growth Factor Receptor (EGFR mutada)	Promoción de proliferación celular, a través de la activación de la vía MAPK, AKT y JNK.	Voldborg <i>et al.</i> , 1997.
	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)	Promoción de vasculogénesis y angiogénesis.	Kliche & Waltenberg. 2001
<b>Moléculas de señalización y cinasas</b>	Proteina cinasa B (Akt)	Papel en apoptosis, proliferación celular, transcripción y migración celular.	Yoeli & Toker, 2006
	mammalian Target of Rapamycin (mTOR)	Regula proliferación celular, motilidad y supervivencia.	Guertin & Sabatini, 2007.
	v-Src	Promueve formación de cáncer, movimiento celular y proliferación.	Irby & Yeatman, 2000.

Clase	Proteína "cliente" de Hsp90	Función	Referencia
	Breakpoint cluster region protein/ Tyrosine-protein kinase ABL1 (Bcr-Abl)	Promueve proliferación celular y reduce apoptosis.	Quintas & Cortés, 2009.
<b>Factores de transcripción</b>	Twist-1	Promueve metástasis y reduce apoptosis.	Puisieux <i>et al.</i> , 2006.
	Hipoxia inducible factor 1 $\alpha$ (Hif-1 $\alpha$ )	Induce proliferación celular y angiogénesis.	Tiburcio <i>et al.</i> , 2014
	Necrosis Factor-Kappa B (NF-kB)	Mantiene proliferación celular y protege de la apoptosis.	Xia <i>et al.</i> , 2014
<b>Otros</b>	Ciclina D1	Control del ciclo celular	Qie & Diehl, 2016.
	Matrix Metallopeptidase 2/9 (MMP2/9)	Rol en invasión y angiogénesis, vía ruptura de la matriz extracelular.	Gialeli <i>et al.</i> , 2011
	Survivina	Inhibe apoptosis y regula mitosis	Mita <i>et al.</i> , 2008
	Vimentina	Incrementa migración y capacidad de invasión	Satelli & Li, 2011.

Al ser Hsp90 una proteína de estrés celular, en condiciones fisiopatológicas como lo es el cáncer, existe una mayor demanda de de Hsp90 para facilitar el plegamiento de las proteínas y evitar proteostasis de las mismas (Rutherford. 2003).

Si bien, los cambios genéticos acumulados en las células cancerosas son un factor determinante para el inicio del cáncer, no son suficientes para la evolución de la enfermedad. Genéticamente las células alteradas requieren interacciones con el microambiente, estas interacciones pueden ser directas o indirectas y generan presión selectiva a las células cancerosas, logrando que adquieran nuevas mutaciones que favorecerán la progresión del cáncer (Fortunato *et al.*, 2017).

En un ambiente permisivo, las células soportan el crecimiento de células alteradas genéticamente y capaces de sobrevivir en condiciones de estrés como: hipoxia, falta de nutrientes y acidosis. Bajo estas condiciones de estrés celular, Hsp90 actúa como buffer bioquímico a nivel fenotípico para la heterogeneidad genética característica del cáncer. Cuando la capacidad de buffer es excedida pudiendo dar lugar a una mayor carga de oncoproteínas mal plegadas, o a un microambiente celular hostil; donde, la homeostasis celular y en particular la proteostasis celular puede perderse, favoreciendo la progresión tumoral, con fenotipo invasivo, metastásico y resistente a fármacos antineoplásicos (Whitesell & Lindquist. 2005).

# Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ en cáncer

Al ser Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  las isoformas citosólicas más abundantes de la subfamilia de Hsp90, diversos estudios en la biología del cáncer se han enfocado en estos miembros de la subfamilia; sin embargo, el rol que tiene cada isoforma en el desarrollo del cáncer aún es poco conocido.

## Hsp90 $\alpha$ en cáncer

La isoforma alfa de la proteína de choque térmico; Hsp90 $\alpha$  ha sido propuesta como un factor promotor de motilidad, invasividad y adquisición de resistencia al estrés de las células cancerosas (Eustace *et al.*, 2004).

Además de las isoformas intracelulares de Hsp90, recientemente se ha descubierto que la proteína de 90 kDa extracelular (eHsp90 $\alpha$ ), es secretada por líneas tumorales y normales, haciendo más compleja la comprensión de su biología (Wang *et al.*, 2009). La presencia de eHsp90 $\alpha$  ha sido propuesta como fundamental en procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo el crecimiento tumoral (Parmiani *et al.* 2004), invasión y metástasis (Eustace *et al.*, 2004), curación de heridas (Nathan.1997) y angiogénesis (Pratt.1998).

Por otra parte, demostramos que eHsp90 $\alpha$  es un indispensable para una función pro invasiva, además de que los niveles de eHsp90 $\alpha$  en plasma se correlaciona positivamente con la malignidad del tumor en pacientes con cáncer. Lo anterior sugiere a eHsp90 $\alpha$  como un posible marcador diagnóstico de malignidad tumoral en la aplicación clínica (Wang *et al.*, 2009).

En un modelo de cáncer de mama, se relacionó el cambio de supervivencia celular a apoptosis a la disponibilidad de Hsp90 $\alpha$ . La línea celular de cáncer de mama, SKBR3 fue tratada con iHsp90, observando una reducción en la proliferación y aumento de la apoptosis. Sugiriendo que Hsp90 $\alpha$  además de tener un papel en la supervivencia celular, también tiene una función pro apoptótica específica del tipo de la célula, microambiente y estado de transformación celular (Perotti *et al.*, 2008).

## Hsp90 $\beta$ en cáncer

Por su parte, la isoforma Hsp90 $\beta$  se asocia a un papel crítico para la viabilidad celular, resultando ser letal su *knock out*. En cáncer gástrico, la expresión de HSP90 $\beta$  es mayor en el tejido de cáncer gástrico que en la mucosa gástrica no cancerosa, este efecto también se reportó a nivel *in vitro*, donde en líneas celulares de cáncer gástrico también se reportó mayor expresión de Hsp90 $\beta$ , respecto a las líneas celulares parentales (Liu *et al.*, 1999).

En un estudio realizado en 2019, se determinaron los mecanismos moleculares dependientes de la proteasa específica de la ubiquitina 22 (USP22), gen asociado a mecanismos de muerte celular, en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer colorrectal. Los resultados obtenidos demostraron que tras la eliminación de USP22, la isoforma Hsp90 $\beta$  se veía afectados a nivel gen y proteína, además de que el uso del iHsp90, Ganetespib, dio una mayor vulnerabilidad en células de cáncer, reduciendo eficazmente el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*. En este estudio se identificó a Hsp90 $\beta$  como blanco terapéutico dependiente de USP22 en cáncer de mama y cáncer colorrectal (Kosinsky *et al.*, 2019).

# Inhibición farmacológica de Hsp90 en cáncer

Sabiendo que Hsp90 es una proteína chaperona esencial para la estabilidad y la función de una amplia gama de oncoproteínas, se ha propuesto como blanco terapéutico debido a su atractivo potencial de interrumpir simultáneamente múltiples vías de señalización y, por lo tanto, ejercer un ataque múltiple en células malignas (Xu & Neckers. 2007).

Diversos estudios han indicado que los inhibidores de Hsp90 son más tóxicos para las células malignas que para los tejidos normales, y por lo tanto existe la posibilidad de una citotoxicidad selectiva (Chiosis & Neckers. 2006; Chiosis *et al.*, 2003; Kamal *et al.*, 2003; Workman. 2004). Además, algunos inhibidores de Hsp90 se acumulan en las células malignas en mayor medida que en células normales (Chiosis *et al.*, 2003).

En apoyo de esta observación, Kamal y colaboradores demostraron que la acumulación aparente de inhibidores de Hsp90 en células tumorales después de la administración sistémica podría resultar del aumento de la afinidad de Hsp90 presente en las células cancerosas en comparación con las células normales (Kamal *et al.*, 2003).

La mayoría de los inhibidores de Hsp90 presentan actividad pan inhibitoria contra las cuatro isoformas de Hsp90, induciendo una respuesta de choque térmico, que a su vez activa a HSF-1, llevando a la transcripción de Hsp27, Hsp70 y otras Hsp's. La regulación al alza de Hsp90 implica un aumento en la dosificación del fármaco, estrategia que se ha observado limitada por la toxicidad hepática, cardiovascular e incluso ocular. Como resultado de estas observaciones se ha propuesto el uso de inhibidores específicos de isoformas como una forma viable de mitigar los perjuicios y complicaciones (Sánchez *et al.*, 2020).

## Inhibición específica de las isoformas de Hsp90

Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  comparten aproximadamente el 95% de identidad dentro del *pocket* de unión a ATP, y se diferencian sólo en dos aminoácidos; Hsp90 $\beta$  reemplaza los residuos de Ser e Ile de Hsp90 $\alpha$  en las posiciones 52 y 91 con residuos de Ala y Leu respectivamente (Haase & Fitze. 2016). Sobre la base de esta característica, se han desarrollado los primeros inhibidores selectivos de Hsp90 $\beta$ . KUNB31, es el primer inhibidor N-terminal

selectivo para la isoforma Hsp90 $\beta$  producido y actualmente se está trabajando en el desarrollo de inhibidores selectivos hacia las isoformas citosólicas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  (Sanchez *et al.*, 2020).

Estudios recientes han demostrado que la activación de la muerte celular extrínseca a través del factor de necrosis tumoral (TNF) o el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) da como resultado la degradación de la isoforma HSP90 $\beta$ . La co-incubación de células con TNF o TRAIL en combinación con el inhibidor de HSP90 $\beta$ , KUNB105, pero no con la inhibición selectiva de HSP90 $\alpha$  promueve la inducción de la apoptosis. En él mismo estudio se identificó y validó la degradación de HIF1 $\alpha$  desencadenada por inhibidor. Estos hallazgos sugieren que la inhibición selectiva de las isoformas de Hsp90 junto con la estimulación del ligando de muerte puede proporcionar estrategias novedosas para la terapia de enfermedades inflamatorias o cáncer, en el futuro (Heck *et al.*, 2021).

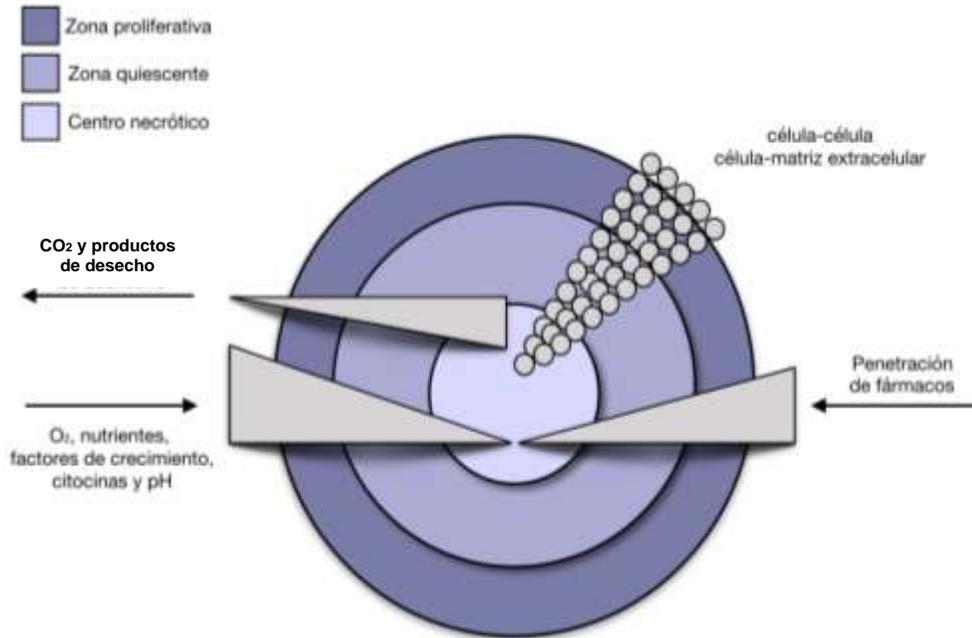
# Modelos tumorales *in vitro* y su aplicación en la investigación biomédica

La tasa de aprobación de medicamentos contra el cáncer es  $\leq 5\%$ , a pesar de las inversiones en investigación, descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer. Una estrategia para mejorar la tasa de éxito de nuevos medicamentos contra el cáncer en transición a la clínica es alinear los modelos celulares utilizados en el descubrimiento temprano con modelos preclínicos y tumores en pacientes. Para los tumores sólidos, esto exigiría el desarrollo y la implementación de modelos tumorales *in vitro* que recapitulan con mayor precisión la arquitectura y la biología del tumor sólido humano (Sant & Johnston.2017).

Tradicionalmente los cultivos bidimensionales se han usado para estudios de biología celular, con el supuesto de que las células en monocapa reflejan la fisiología de un tejido real. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el cultivo celular bidimensional no puede replicar el microambiente y los comportamientos celulares *in vivo* debido a la falta de interacciones célula-célula, célula-matriz y a la pérdida de la arquitectura específica del tejido, señales mecánicas y químicas, que son esenciales para funciones únicas de tejidos reales en el cuerpo humano (Cui *et al.*, 2017).

Los modelos tumorales *in vitro*, son cultivos auto-ensamblados de células tumorales formados en condiciones donde las interacciones célula-célula predomina sobre las interacciones célula-sustrato (Mehta *et al.*, 2012).

Los esferoides tumorales multicelulares se asemejan a los nódulos tumorales avasculares, las micro metástasis o las regiones intervasculares de los tumores sólidos grandes con respecto a sus características morfológicas, microambiente, cinética de crecimiento y gradientes de distribución de nutrientes, concentración de oxígeno, proliferación celular y acceso a fármacos (Friedrich *et al.*, 2009; Lovitt *et al.*, 2014; Ekert *et al.*, 2014; Vinci *et al.*, 2012). En la figura 1 se muestran las diferentes señales celulares a las que están expuestas las células tumorales cultivadas en microambientes 3D.



**Figura 1. Gradientes que regulan la función y el comportamiento celular en un esferoide.** Las células tumorales cultivadas en esferoides existen en un microambiente 3D altamente interactivo donde las interacciones célula-célula, las interacciones célula-ECM y los gradientes locales de nutrientes, factores de crecimiento, factores secretados y oxígeno regulan la función y el comportamiento celular. La estructura interna de un esferoide está compuesta por tres capas: zona proliferativa, zona quiescente y centro necrótico. Figura adaptada de Lin & Chang.2008.

En un estudio publicado en el 2017, se evaluó la potencia radiosensibilizadora de varios agentes quimioterapéuticos, entre ellos el iHsp90, 17-DMAG, en un modelo tumoral *in vitro* de cáncer de próstata. Los resultados indicaron que la radioterapia del cáncer de próstata puede optimizarse mediante la combinación con inhibidores de Hsp90. En donde se observó un aumento en la muerte celular y un retraso en el crecimiento de esferoides inducido por la combinación de radiación más el uso del inhibidor (Rae & Mairs. 2017).

En otro estudio realizado, se establecieron paneles de cultivos de esferoides derivados de pacientes a partir de seis muestras de carcinoma de células pequeñas del cuello uterino, en donde se evaluó la radiosensibilidad intrínseca y el mecanismo de radioresistencia. En un modelo radioresistente, se observó que el iHsp90, 17-AAG, suprimió la expresión de HIF-1 $\alpha$  inducida por la radiación, además de aumentar la sensibilidad de la radiación (Nakajima *et al.*, 2015).

En un modelo de cáncer colorrectal, se demostró por primera vez que la inhibición de HSP90 regula a la baja tanto HIF-1 $\alpha$  como NF-kB, lo que conduce a la inhibición de EMT, motilidad e invasividad en el cáncer colorrectal. El tratamiento de las líneas celulares de cáncer colorrectal HT-29 y HCT-116 con Ganetespib a 50  $\eta$ M durante 24 h inhibió la EMT (vimentina regulada a la baja y cadherina regulada al alza), invasión a matrigel y migración de esferoides (Nagaraju *et al.*, 2015).

# Adenocarcinoma renal

El adenocarcinoma renal es un grupo heterogéneo de cánceres que se desarrolla en las células del epitelio tubular y comprende el 85% de las neoplasias renales primarias. Su clasificación se basa en el origen anatómico, características histológicas y moleculares (Wolf *et al.*, 2020). La mayoría de los adenocarcinomas renales se agrupan en tres subconjuntos definidos histológicamente que incluyen el CRcc con aproximadamente el 70% de los diagnósticos de cáncer renal y caracterizado microscópicamente por el aspecto claro del citoplasma debido a la presencia de glucógeno y lípidos (Liu *et al.*, 2007), seguido del subtipo papilar que se desarrolla del 10% al 15% de los pacientes con un patrón predominantemente papilar (Kaldany *et al.*, 2019) y por último, el subtipo cromóforo caracterizado por células con citoplasma abundante, pálido y aspecto granular, que comprende alrededor del 5% de las neoplasias renales (Hsieh *et al.*, 2017).

Múltiples factores de riesgo se han descrito para el CR, dividiéndolos en factores adquiridos, como lo son: el consumo de tabaco, hipertensión, obesidad, uso de crónico de analgésicos y diabetes. Dentro de los factores genéticos, uno de los genes mayormente involucrados en el desarrollo del CR es el gen Von Hippel-Lindau (VHL) y el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Siegel *et al.*, 2012).

Por su parte, el gen supresor de tumores VHL juega un rol importante en el desarrollo de CRcc hereditario, así como en la progresión, malignidad y resistencia a este subtipo de cáncer. Se estima que del 50 al 60% de los pacientes que desarrollan CRcc tienen una anomalía en el gen VHL. Individuos con alteraciones en el gen VHL nacen con una copia inactivada del gen en todas las células y otra copia del gen normal. Para que el proceso de tumorigénesis se desarrolle debe de haber una pérdida de función del segundo gen. Este “segundo hit” tiene lugar como un resultado de una mutación somática o delección del alelo. El producto del gen VHL es el supresor tumoral Von Hippel Lindau (pVHL) que actúa que es un regulador crítico de la respuesta a hipoxia (Maranchie *et al.*, 2002).

PTEN ha sido descrito como un gen supresor de tumores componente de diversas vías de señalización involucradas en la regulación del crecimiento celular, proliferación y apoptosis, así como un participante en el control del ciclo celular. Se ha demostrado que PTEN antagoniza la vía de señalización PI3k/PTEN/AKT que tiene un papel en el crecimiento,

diferenciación y supervivencia celular, salvaguardando maquinarias celulares contra la carcinogénesis. Así, la pérdida de la expresión de PTEN puede causar el inicio del proceso de tumorigénesis (Parsons & Simpson. 2003).

mTOR es una proteína cinasa que es codificada por el gen MTOR y juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. La vía de señalización mTOR/PI3K inicia con la unión de factores de crecimiento a la superficie celular, resultando en la activación de la proteína PI3K. Esta vía de señalización culmina con la codificación de la proteína HIF, que tiene la habilidad de incrementar la producción de proteínas angiogénicas como VEGF, PDGF y TGFB, implicados en el crecimiento celular y la progresión del tumor (Guertin & Sabatini. 2007).

### Terapéutica actual contra el adenocarcinoma renal

Actualmente, la nefrectomía parcial o radical sigue siendo el *gold standard* para el tratamiento del CR. La selección de tumores para la nefrectomía parcial está dictada por la localización anatómica, estadio del tumor y otras características que limitan el potencial de una completa resección del tumor (Petejova & Martinek. 2016).

Aproximadamente, el 17% los pacientes que presentan por primera vez algún tipo de CR tienen un alto índice de recurrencia y desarrollo de metástasis. El tratamiento de la enfermedad metastásica es complejo y depende del subtipo histológico, masa tumoral renal y estado clínico del paciente (Rini *et al.*, 2009).

El tratamiento para CR metastásico ha sido desarrollado significativamente: inhibidores del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), así como los inhibidores de tirosinas cinasas y fármacos que inhiben la vía de señalización mTOR, se han convertido en el pilar para el manejo del CR avanzado. El objetivo del uso de inhibidores de moléculas pequeñas es el bloqueo de vías de señalización que disminuyan la producción de factores angiogénicos y el crecimiento tumoral, sin embargo, los resultados han sido poco favorecedores para el paciente, limitando sus opciones terapéuticas (Petejova & Martinek. 2016).

## Modelos tumorales *in vitro* y carcinoma renal

Tomando en cuenta que los métodos actuales para estudiar el carcinoma de células renales se limitan al cultivo bidimensional (2D) de líneas celulares primarias y modelos de xenoinjerto derivados del paciente. Numerosos estudios han sugerido que el cultivo 2D representa pobremente la diversidad, la heterogeneidad y la resistencia a los medicamentos de los tumores primarios, proponiendo los modelos tumorales 3D como cierre de la brecha entre el cultivo celular *in vitro* y los modelos de xenoinjerto derivados del paciente *in vivo* (Pan *et al.*, 2015).

En el 2020, el grupo de investigación liderado por Na Chae, realizó una comparación entre el cultivo 2D y organoides 3D derivados de paciente, en donde se observó que los modelos 3D conservaron la morfología característica del CRcc, es decir células claras y ricas en lípidos. Además de que los biomarcadores como: anhidrasa carbónica IX (CAIX) y vimentina fueron validados. Proponiendo que los modelos tumorales *in vitro* pueden funcionar como un nuevo sistema para el desarrollo de modelos clínicos *in vitro* específicos para el paciente con carcinoma avanzado de células renales (Na *et al.*, 2020).

Las metástasis óseas derivadas de CR son típicamente líticas, destructivas y resistentes a los regímenes de tratamiento. Los modelos *in vitro* actuales para estudiar metástasis introducen artefactos que limitan su utilidad. Muchas características de los tumores que crecen en el hueso se pierden cuando las células humanas se cultivan en bidimensionalidad (Lee & Kotov. 2008). La línea celular 786-O puede utilizarse para estudiar la metástasis ósea en CR, diversos estudios han demostrado que la inyección de células 786-O en ratones desnudos, tanto directamente en la tibia como en el ventrículo cardíaco, causan destrucción ósea y vascularización (Xie *et al.*, 2012). Partiendo de este antecedente, en un estudio publicado en el 2015, se utilizó una sublínea derivada de dichos tumores metastásicos para estudiar la metástasis ósea derivada de CR. Los resultados arrojaron que los esferoides generados con la sublínea de 786-O, mostraron tasas de proliferación más bajas que sus contrapartes cultivadas en 2D. En general, los patrones de expresión génica de los esferoides imitaban más a los observados *in vivo* que los de las células cultivadas en 2D. De particular importancia, las moléculas de adhesión seleccionadas, los factores de angiogénesis y los factores osteolíticos que se ha demostrado que están involucrados en la metástasis ósea del CR se expresaron a niveles más altos en cultivos 3D que en cultivos 2D. Proponiendo que el sistema de cultivo 3D proporciona una

plataforma mejorada para los estudios de metástasis óseas en comparación con los sistemas 2D (Pan *et al.*, 2015).

En el CR, el uso de inhibidores de tirosina cinasa (TKI), son un tratamiento estándar. Sin embargo, el papel de PTEN en la resistencia a este tipo de tratamiento sigue siendo poco conocido. En un estudio realizado por Sekino y colaboradores, se determinó conocer el papel funcional de PTEN, analizando el efecto de la inactivación de PTEN sobre la formación de esferoides y la resistencia a Sunitinib y Sorafenib. Los resultados sugirieron que la eliminación de PTEN promovió la formación de esferoides y disminuyó la sensibilidad a Sunitinib/Sorafenib en las líneas celulares de CR, concluyendo que PTEN puede ser un biomarcador y objetivo terapéutico en pacientes con CR metastásico (Sekino *et al.*, 2020).

# Hsp90, como blanco terapéutico en adenocarcinoma renal

Los tumores de CRcc se caracterizan por estar altamente vascularizados y se encuentran entre los tumores renales más letales (Kaelin, WG. 2007). En donde el factor de transcripción HIF es un importante participante dentro del contexto de la pérdida del gen supresor de tumores, VHL (Kondo *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2002; Iliopoulos *et al.*, 1996; Mandriota *et al.*, 2002).

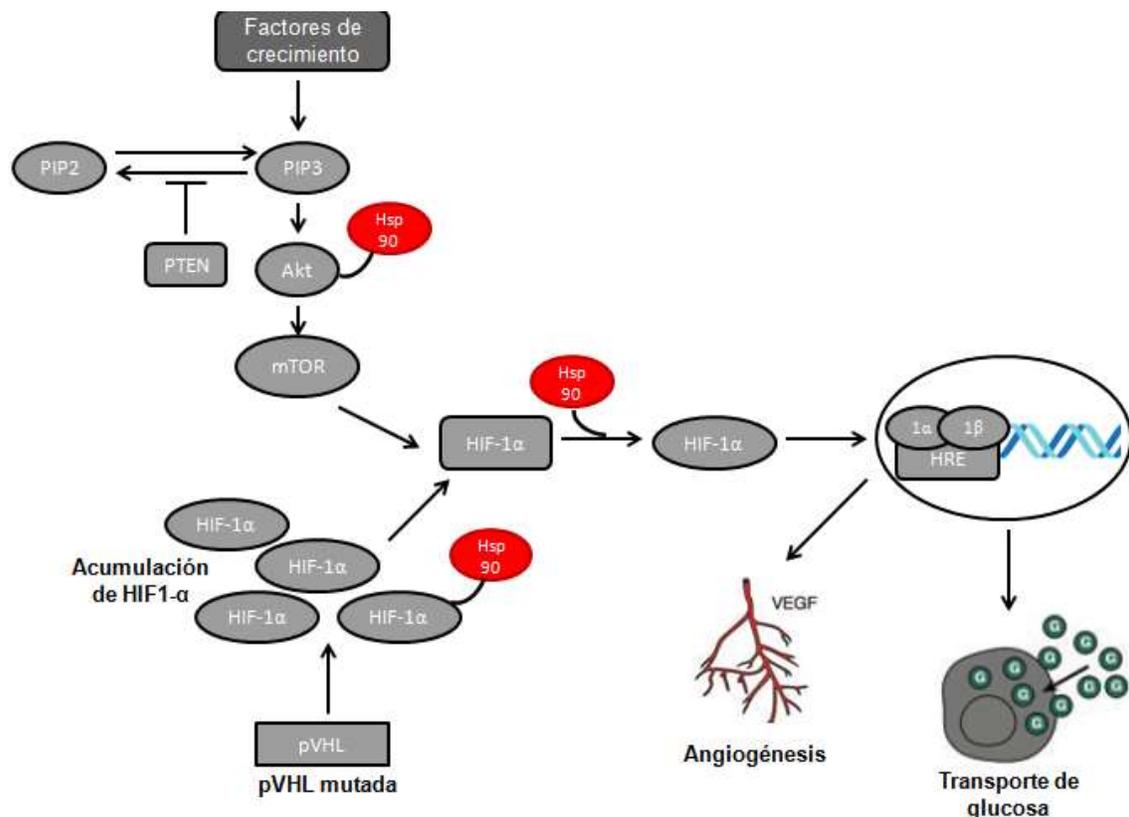
Los inhibidores de molécula pequeña de Hsp90 representan una clase creciente de agentes antitumorales clínicamente utilizados que han sido probados como un medio alternativo para atacar a HIF, dada su capacidad compartida para interrumpir la actividad chaperona de Hsp90, y bloquear el plegamiento de sus proteínas "cliente". Tomando en cuenta que HIF-1 $\alpha$  es una proteína "cliente" de Hsp90 (Minet *et al.*, 1999) varios estudios han demostrado que la inhibición de Hsp90 con Geldanamicina (GA) y derivados de moléculas pequeñas promueve la degradación de las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  y la supresión de su actividad transcripcional (Isaacs *et al.*, 2002; Majeesh *et al.*, 2002; Katschinski *et al.*, 2004). Por lo tanto, estos agentes son prometedores en entornos tumorales donde la función de VHL está comprometida, como en el caso del CRcc o hipoxia tumoral (Hur *et al.*, 2002).

Además del papel principal de las hidroxilasas en la regulación de la actividad de HIF-1 $\alpha$ , hay vías que implican la activación oncogénica que tienen contribuciones considerables en el control de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$ . En condiciones no hipóxicas, los factores de crecimiento, las citocinas y otras moléculas de señalización tienden a acumular la proteína HIF-1 $\alpha$  en las células (Hur *et al.*, 2002).

Se ha reportado que los inhibidores de Hsp90 como la GA podrían anular los niveles de HIF-1 $\alpha$  independientemente de la disponibilidad de oxígeno (Isaacs *et al.*, 2002). Se sabe que Hsp90 se une directamente con HIF-1 $\alpha$  induciendo algunos cambios conformacionales en su estructura para adaptarse y acoplarse con HIF-1 $\beta$  iniciando su transactivación. Además, Hsp90 puede estabilizar HIF-1 $\alpha$  contra su degradación, no dependiente de VHL (Gradin *et al.*, 1996).

La unión de Hsp90 a HIF-1 $\alpha$  promueve la actividad de HIF-1 $\alpha$  de dos maneras: (1) bloquea la degradación proteasómica independiente de VHL; y (2) ayuda a los heterodímeros HIF-1 $\alpha$  a adquirir la conformación apropiada para reclutar p300 y, en consecuencia, iniciar la transactivación de HIF-1 $\alpha$  (Hur *et al.*, 2002). Por lo tanto, se espera que los antagonistas de Hsp90 induzcan la degradación de HIF-1 $\alpha$  y por lo tanto exista un efecto antitumoral.

En la figura 2 se muestra la vía de activación del adenocarcinoma renal, así como las distintas oncoproteínas "cliente" que son estabilizadas por Hsp90 y que favorecen el proceso de carcinogénesis, sobresaliendo el fosfoinositol-3-cinasa (PIP3), la proteína cinasa B (Akt), el blanco de rapamicina en células de mamífero (mTOR) y el factor inducible de hipoxia1  $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ).



**Figura 2. Hsp90 como blanco terapéutico en adenocarcinoma renal.** Dentro de la vía de activación de adenocarcinoma renal se encuentran distintas oncoproteínas "cliente" que son estabilizadas por Hsp90, favoreciendo el proceso de carcinogénesis. Figura modificada de Masoud & Li (2015).

A continuación, se enlistan los principales antagonistas de Hsp90 y los efectos observados contra el factor de transcripción HIF.

- **Geldanamicinas (GA):** Altera la unión de Hsp90 a las proteínas "cliente" al competir por su sitio de unión a ATP, exponiéndolos a la ubiquitinación y degradación proteasómica. Sin embargo, debe abordarse la especificidad de la actividad antitumoral de este grupo de agentes, dado el hecho de que existe una amplia gama de proteínas "cliente" y no solo HIF-1 $\alpha$  puede verse afectada por la inhibición de Hsp90 (Miyata. 2005).
- **Radicol:** Es otra clase química de inhibidores de Hsp90 que posee mecanismos diferentes y superpuestos para la inhibición de HIF-1 $\alpha$ . Por ejemplo, el radicol evita la interacción entre los heterodímeros HIF-1 $\alpha$  / HIF-1 $\beta$  y el ácido desoxirribonucleico (ADN), que atenúa el proceso de activación de HIF-1 $\alpha$  sin un cambio significativo en la estabilidad de la proteína HIF-1 $\alpha$  (Hur *et al.*, 2002).
- **SCH66336:** Un derivado de farnesiltransferasa que demuestra la actividad antitumoral contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas, inhibe la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y Hsp90 promoviendo la degradación proteosomal de HIF-1 $\alpha$  (Han *et al.*, 2005).
- **Apigenina:** Es una flavona natural antiangiogénica. Se ha reportado que bloquea la regulación positiva inducida por la hipoxia de las proteínas HIF-1 $\alpha$ , el transportador de glucosa GLUT-1 y VEGF mediante la degradación de HIF-1 $\alpha$  a través de la interferencia con la función de Hsp90 (Osada *et al.*, 2004; Melstrom *et al.*, 2011).

## Antecedentes directos

Antecedentes en nuestro grupo de investigación, sugieren que las isoformas citosólicas más abundantes de Hsp90; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  tienen un papel diferencial y una connotación fisiológica y patológica en distintas vías de señalización.

En condiciones fisiológicas, en el año 2010, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la vía de señalización eNOS/NO. En dicho estudio se encontró que la sobreexpresión de Hsp90 $\alpha$  induce un incremento de los niveles de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, donde dicho efecto fue asociado con el incremento de fosforilación del residuo de Serina (Ser) 1177 en eNOS y de Ser473 en la cinasa Akt/PKB, incluyendo un notable incremento en la conformación dimérica de Hsp90 $\alpha$ . Mientras que la sobre-expresión de Hsp90 $\beta$  redujo significativamente los niveles de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> e incrementó la generación de O<sub>2</sub>. Estos efectos se asociaron a una reducción de la conformación dimérica de eNOS, un incremento en la fosforilación del residuo de Treonina (Thr) 495 en eNOS y a la disminución de la fosforilación de las cinasas Akt/PKB, además de un aumento de Hsp90 $\beta$  en su conformación monomérica (Cortés *et. al.*, 2010). Estos datos sugirieron por primera vez que Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  modulan de forma diferencial la activación de proteínas “cliente” como Akt y eNOS, a través de la promoción de cambios en la conformación y estado de activación por fosforilación.

En condiciones patológicas como el cáncer, la cinasa Akt es responsable de la activación de diversas vías de señalización oncogénicas. En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación se determinó la asociación entre la expresión de las proteínas Hsp90 $\alpha$  y de Hsp90 $\beta$  en tejido renal de pacientes con CR (datos no publicados). El estudio comprendió una cohorte de 30 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma renal y sometidos a nefrectomía. Los resultados permitieron identificar un subgrupo de pacientes con CR con peor pronóstico y estadio metastásico del cáncer, a través de la expresión diferencial entre las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ ; donde la sobre expresión de la isoforma Hsp90 $\alpha$  se asoció a pacientes metastásicos y menor sobrevida, mientras que la isoforma Hsp90 $\beta$  a un mayor tamaño tumoral.

# Planteamiento del problema

En tumores sólidos se ha reportado un incremento en los niveles de proteína Hsp90 como posible respuesta homeostática a la extensa heterogeneidad genética en distintos tipos de cáncer, por lo que la inhibición farmacológica de Hsp90 se ha propuesto como una terapéutica prometedora, sin embargo, el uso de inhibidores en ensayos clínicos ha demostrado poca eficacia, debido a la poca solubilidad acuosa de la molécula y alta hepatotoxicidad (Pacey *et al.*, 2011).

Antecedentes en nuestro grupo de investigación abren la posibilidad de que parte de la poca efectividad del uso de iHsp90 se debe al enfoque del conocimiento de las Hsp como una subfamilia de proteínas, siendo limitados los estudios que consideran el papel específico de las isoformas; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante el inicio y progresión del cáncer.

Considerando que dentro de la vía de activación del adenocarcinoma renal, se encuentran distintas oncoproteínas reguladas y estabilizadas por Hsp90, en el presente trabajo propuso un modelo tumoral *in vitro* de adenocarcinoma renal, que permitiera conocer los niveles de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , desde la formación, hasta la maduración de tumores *in vitro* y cómo es que el uso de un iHsp90 afectará el perfil preexistente de las isoformas citosólicas de Hsp90 y el efecto que esto tiene en el modelo tumoral establecido.

# Hipótesis

El aumento en los niveles de la isoforma Hsp90 $\alpha$  se asociará a la etapa de formación y maduración de tumores *in vitro* de cáncer renal, mientras que los niveles de la isoforma Hsp90 $\beta$  se asociará únicamente a la viabilidad celular y formación de tumores.

## Objetivo general y particulares

Establecer la participación específica de las proteínas de choque térmico; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación y maduración de tumores *in vitro* en un modelo de cáncer renal.

1. Establecer un modelo tumoral *in vitro* con líneas celulares de adenocarcinoma renal; ACHN y 786-O.
2. Evaluar el efecto del iHsp90; 17-DMAG sobre la citoarquitectura de los esferoides, así como en el estado de formación y maduración del modelo tumor *in vitro*.
3. Estudiar el comportamiento del perfil de expresión de proteínas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación y maduración de esferoides y evaluar el cambio en el perfil de expresión de las proteínas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  inducido por el iHsp90, 17-DMAG.
4. Establecer el posible papel diferencial de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , a través de su relación con marcadores de maduración de tumores *in vitro* de adenocarcinoma renal.

# Material y métodos

## Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma renal con distintas características genóticas y fenotípicas (Tabla 5), la línea celular de adenocarcinoma renal 786-O fue cultivada con medio de cultivo RPMI (por sus siglas en inglés, *Roswell Park Medium Institute*) (#Cat. 10-041-CVR, *Corning*), mientras que la línea celular de adenocarcinoma renal ACHN se cultivó con el medio de cultivo EMEM (por sus siglas en inglés *Eagle's Minimum Essential Medium*) (#Cat.10-009-CV, *Corning*). Los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (#Cat. 10-056-CVR, *Corning*). Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37° con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez que las células alcanzaron una confluencia entre el 80 y 90% fueron tripisinizadas y expandidas en una relación 1:4. En todos los experimentos se aseguró que los pases de cada línea celular no fueran mayores a cinco entre cada experimento.

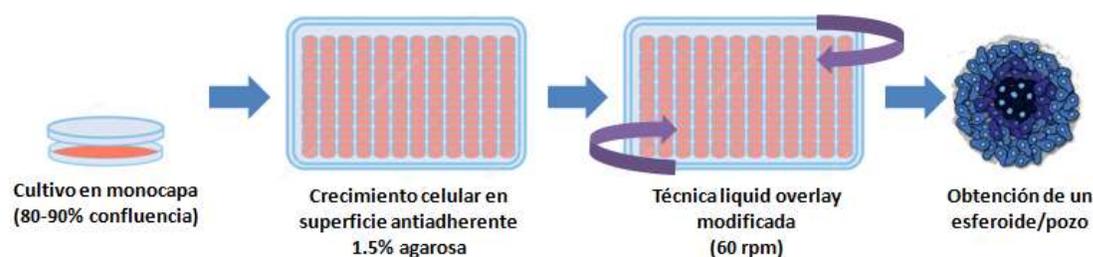
**Tabla 5. Características genóticas y fenotípicas de las líneas celulares de adenocarcinoma renal, 786-O y ACHN.**

Línea celular de adenocarcinoma renal	Características genóticas y fenotípicas	Referencia
786-O	<ul style="list-style-type: none"><li>• Genotipo VHL (-/-) y PTEN (-/-).</li><li>• Modelo representativo del genotipo del CRcc.</li><li>• Niveles elevados de las proteínas HIF-2<math>\alpha</math> y VEGF.</li><li>• Potencial modelo para el estudio de Cancer Stem Cell (CSC).</li></ul>	Brodaczewska <i>et al.</i> , 2016.
ACHN	<ul style="list-style-type: none"><li>• Características histológicas sarcomatoides poco diferenciadas.</li><li>• Mutaciones específicas en cMET.</li><li>• No hay mutaciones clásicas en VHL</li><li>• Modelo para el estudio de tumores tipo agresivo.</li><li>• No es un modelo representativo para el genotipo del CRcc.</li></ul>	Brodaczewska <i>et al.</i> , 2016.

## Establecimiento del modelo tumoral *in vitro*

Para el establecimiento del modelo tumoral *in vitro*, se realizó una técnica modificada de "liquid overlay" (Yuhas *et al.*, 1997); se utilizaron microplacas de 96 pozos, en las cuales, para asegurar la superficie no adherente, se agregaron 50  $\mu$ L de agarosa preparada al 1.5%. El número óptimo de células a sembrar y porcentaje de SFB se determinó a través de cinéticas de crecimiento y microscopía de contraste de fases. Partiendo de los cultivos celulares en monocapa con una confluencia entre el 80 y 90% las células se tripsinizaron en una relación 1:5 (Tripsina/solución salina tamponada con fosfato, por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*) durante 4 minutos en agitación orbital (20 rpm) a una temperatura de 37°C, para posteriormente ser centrifugadas a 1,200 rpm, temperatura ambiente.

Por cada pozo de la microplaca de 96 pozos previamente tratada con agarosa al 1.5%, se sembraron 5,000 células. La incubación se realizó a 37° C, en una atmósfera carente de CO<sub>2</sub> y en agitación orbital suave (60 rpm) durante 4 días. El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las esferas fue L-15 (#Cat. 10-045-CV, *Corning*), enriquecido con 5% de SFB. En la figura 3, se muestra de manera representativa el establecimiento del modelo tumoral *in vitro*, así como la fusión de las técnicas utilizadas.



**Figura 3. Adaptación de las técnicas *liquid overlay* y agitación para la generación de esferoides.** Los esferoides se generaron por medio de la combinación de la técnica "liquid overlay", que consiste en el uso de superficies antiadherentes y para acelerar el proceso de formación se empleó agitación orbital suave (60 rpm) (Cui, X., Hartanto, Y. & Zhang, H. 2017).

## Cinéticas de crecimiento del modelo tumoral *in vitro*

Las cinéticas de crecimiento se determinaron a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, mediante microscopía de campo claro (microscopio AxioVert. Z.1, *Carl Zeiss*). Las microfotografías fueron tomadas con el objetivo 20x, con una n= 30 esferoides para todos los ensayos realizados.

## Ensayo de inhibición de Hsp90 con 17-DMAG en la formación de esferoides

Para determinar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación de esferoides, se utilizó una concentración de [250  $\eta$ M] del iHsp90, 17-DMAG en el tiempo 0 horas de cultivo. Posteriormente se realizó extracción de proteínas totales de los esferoides control y tratados con 17-DMAG en los tiempos 24, 48, 72 y 96 horas.

## Ensayos de viabilidad LIVE/DEAD en esferoides

La viabilidad de la población celular en los esferoides generados con la línea celular 786-O se evaluó en los tiempos 24, 48, 72 y 96 horas empleando el kit LIVE/DEAD Cell Viability Assays (#Cat.L3224, *Invitrogen*). Las concentraciones utilizadas fueron 1 $\mu$ M de Calceína AM y 2  $\mu$ M de Homodímero de etidio (EthD-1), suspendidos en PBS 1x. Los fluoróforos fueron incubados 30 minutos a una temperatura de 37°C y visualizados en el sistema de imagen digital ZOE Fluorescent Cell Imager de BioRad.

## Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales, los esferoides fueron recuperados en microtubos de 1.5 mL fondo cónico y lavados con PBS 1X frío, para posteriormente ser resuspendidos en 150  $\mu$ L de buffer de extracción celular (#Cat. FNN0011, *Invitrogen*), adicionado con cóctel de inhibidor de proteasas (#Cat. 539131-10VL, *Calbiochem*) y tabletas inhibidoras de fosfatasas (PhosSTOP, *Sigma-Aldrich*). Los esferoides fueron disgregados por fuerza mecánica en tres periodos de 10 minutos, al finalizar los ciclos se completó la lisis celular con una jeringa de insulina durante 5 veces. Los lisados fueron centrifugados a 14,000 rpm/4° C durante 15 minutos. El sobrenadante (proteínas totales solubles) se separó y se preservó a -20°C realizando alícuotas de cada extracto hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método colorimétrico de Lowry. Empleando el kit de BioRad (#Cat. 5000002), se tomaron 10 µL de proteína y adicionaron 50 µL de reactivo “A” + 400 µL de reactivo “B”, para posteriormente realizar un vórtex y un ligero spin. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos en oscuridad para después leer las absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm. Las absorbancias se extrapolaron con una curva de albúmina BSA para la determinación de la cuantificación proteica.

### Inmunodetección de proteínas por Western blot

Para la inmunodetección por Western Blot, 40 µg de la proteína celular de cada una de las muestras se mezclaron con buffer de carga 4x, al 1% de β-mercaptoetanol y fueron aforadas a volúmenes iguales con PBS 1x, según fuera requerido. Las muestras se desnaturalizaron a 95° C durante 5 minutos y después colocadas en hielo. Los geles desnaturalizantes de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) se realizaron al 8% de poliacrilamida y fueron transferidos 30 minutos/60 V + 150 minutos/120 V a una membrana de polivinilideno (PVDF), tratada con 5% del agente bloqueante (Blotting-Grade Blocker (#Cat. 170-6404, Millipore) y 0.1% de Tween-20 en Tris Buffered Saline 1x (TBS), durante 1 hora.

Las membranas fueron incubadas con anticuerpos específicos para la proteína de choque térmico de 90 kDa, informa alfa y beta, respectivamente (Hsp90α, Hsp90β), inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B (también conocido como p27) y el marcador de proliferación Ki-67, como control de carga se utilizó un anticuerpo contra GAPDH. Las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia usando el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate (#Cat. RF231430, Thermo Scientific) por autoradiografía de bandas y se cuantificaron por análisis densitométrico empleando el software *ImageJ*.

En la tabla 6 se enlistan los anticuerpos utilizados, su peso molecular, así como su marca y No. de catálogo.

**Tabla 6. Proteínas detectadas por inmunoblotting**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Marca y No. catálogo</b>
<b>Hsp90<math>\alpha</math></b>	86	Millipore 72774
<b>Hsp90<math>\beta</math></b>	84	Santa Cruz SC-1057
<b>GAPDH</b>	37	Santa Cruz SC-66163
<b>p27/Kip1</b>	21	Novus Biologicals NBP1-32213
<b>Ki-67</b>	354	InmunodNA Retrierver BSB-5713

### Ensayo clonogénico de esferoides

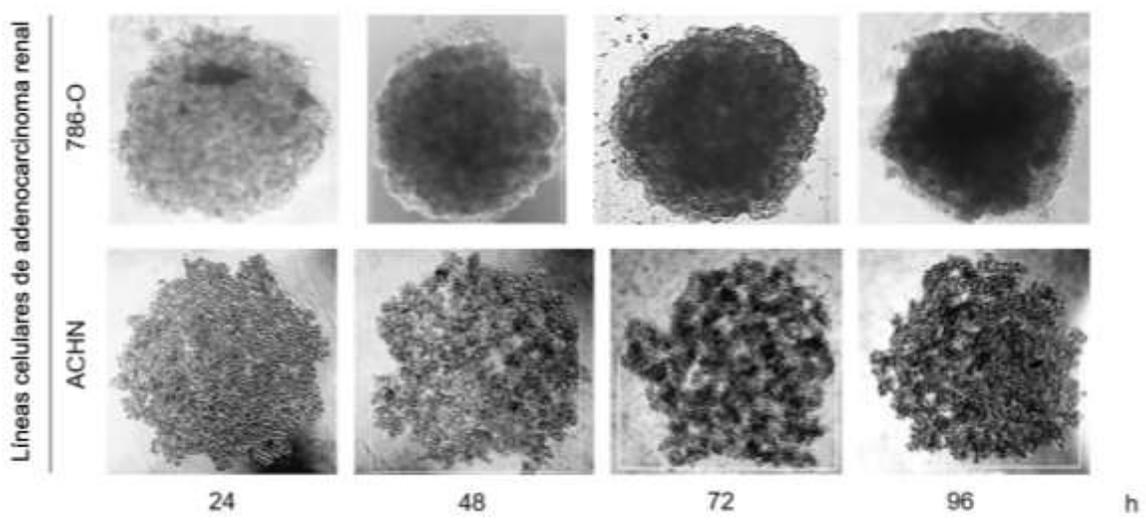
Se recuperaron los esferoides control y tratamiento [250  $\eta$ M] 17-DMAG, generados con la línea celular 786-O, correspondientes a los tiempos 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo. Posteriormente, fueron disgregados con acutasa a una temperatura de 37° C, evitando la formación de agregados celulares. Los esferoides disgregados fueron centrifugados a 1,200 rpm, temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y el *pellet* se resuspendió en medio de cultivo RPMI enriquecido con 10% de SFB para ser sembrado en placas de 6 pozos. El tiempo de incubación fue de 10 días y la tinción se realizó con cristal violeta. Los ensayos clonogénicos fueron realizados por triplicado y se cuantificó el número de colonias formadas.

# Resultados

## Establecimiento del modelo tumoral *in vitro*.

Como parte del establecimiento del modelo tumoral *in vitro* se determinó la capacidad para formar esferoides en las líneas celulares de adenocarcinoma renal: ACHN y 786-O, para ello se empleó una adaptación de las técnicas *liquid overlay* y agitación (Cui *et al.*, 2017), utilizando microplacas de 96 pozos con superficie de agarosa y condiciones de cultivo acompañadas de un sistema rotativo. Las células sembradas en cada pozo fueron monitoreadas a través de microscopía de contraste de fases y fotografiadas cada 24 horas, como control positivo en la formación de los esferoides se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF-7, una línea celular reportada en la literatura como “*formadora de esferoides*” (Comşa *et al.*, 2015). La obtención de fotografías a través de microscopía de contraste de fases permitió verificar que la adaptación de las técnicas *liquid overlay* y agitación funciona para la implementación del modelo, observando que la línea celular MCF-7, utilizada como *gold standard* presentó las características de un esferoide desde las 24 horas, es decir, una morfología redonda con una capa exterior bien definida y un centro ligeramente oscuro (Figura complementaria 1).

Es de particular interés mencionar que la optimización de las condiciones del modelo tumoral *in vitro* permitió conocer de manera paralela si las líneas celulares de adenocarcinoma renal ACHN y 786-O contaban con la capacidad para formar esferoides. De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó que la línea celular de adenocarcinoma renal 786-O tiene la capacidad para formar esferoides, observando desde las 24 hasta las 96 horas de tiempo de cultivo una morfología redonda que con el transcurso del tiempo se definió hasta observar las distintas densidades celulares y compactación del modelo, a través de microscopía de contraste de fases (figura 4). En contraste, la línea celular ACHN solo formó agregados celulares caracterizados por una acumulación de células que al estar en una superficie antiadherente no lograron formar una monocapa y en donde era posible observar de manera individual las células que conformaban el agregado celular, además de que, con el transcurso del tiempo de cultivo, el agregado celular perdió compactación y comenzó a disgregarse (figura 4). Por otra parte, se concluyó que la línea celular ACHN no cuenta con las características para formar esferoides y por lo tanto se descartó su uso para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

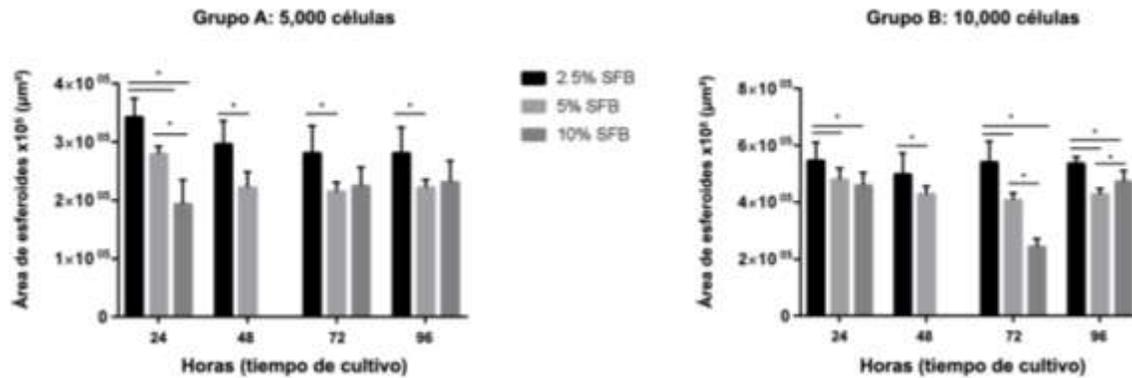


**Figura 4. La línea celular de adenocarcinoma renal 786-O tiene la capacidad de formar esferoides.** Panel de fotografías tomadas a las 24, 48, 72 y 96 horas de tiempo de cultivo. En la parte superior se observa que la línea celular 786-O tiene la capacidad de formar esferoides caracterizados por una morfología redonda y compacta, mientras que en la parte inferior se muestra la línea celular ACHN caracterizada por agregados celulares poco compactos con morfología y superficie irregular.

Una vez generado el modelo tumoral *in vitro* y sabiendo que la línea celular de adenocarcinoma renal 786-O es una línea formadora de esferoides, se buscaron las condiciones óptimas del modelo, para ello se utilizaron tres distintas concentraciones séricas, 2.5, 5 y 10% de SFB, así como el sembrado de dos densidades celulares distintas, 5,000 y 10,000 células. El monitoreo de los esferoides generados con la línea celular 786-O se realizó cada 24 horas durante 4 días.

En la figura 5 se muestran las gráficas correspondientes a la influencia de la densidad celular y concentración sérica en la generación de los esferoides, observando que el tamaño de esferoides es mayor en el grupo B: 10,000 células, en donde la mayoría de los esferoides alcanzaron un área >400  $\mu\text{m}$ , mientras que en el grupo A: 5,000 células, el tamaño promedio fue de 250  $\mu\text{m}$ , concluyendo que para la línea celular 786-O a mayor cantidad de células sembradas, mayor es el tamaño que alcanzan los esferoides. Por otro lado, al estudiar la influencia de la concentración sérica sobre la generación de esferoides, se observó que al utilizar la concentración de 2.5% de SFB el tamaño de los esferoides fue

mayor respecto al uso de concentración sérica de 5 y 10% de SFB, este efecto se observó durante los tiempos de 24, 72 y 96 h de cultivo.

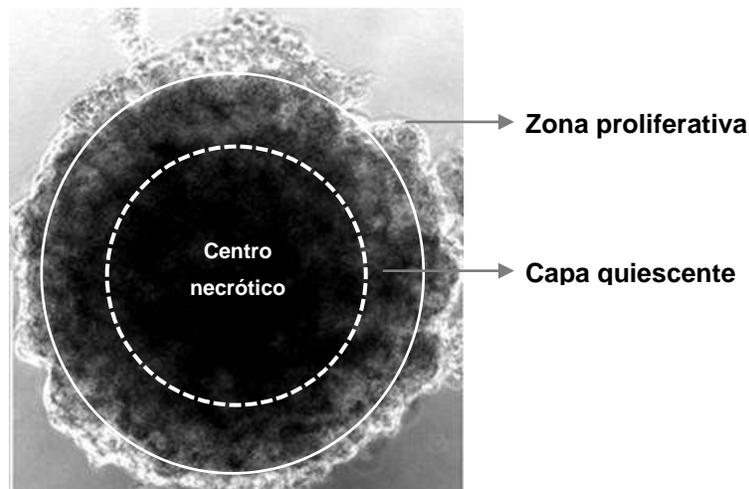


**Figura 5. Influencia de la densidad celular y concentración sérica para la generación de esferoides.** Gráficas correspondientes a la optimización del modelo tumoral *in vitro*, en el grupo A se sembró una densidad celular de 5,000 células por pozo, mientras que en el grupo B la densidad celular fue de 10,000 células por pozo. Las concentraciones séricas correspondientes a 2.5% son representadas por las barras negras, 5% barras color gris claro y 10% barras gris oscuro. En el eje de las "x" se indican las horas (tiempo de cultivo) y en el eje de las "y" el área que alcanzaron los esferoides (µm<sup>2</sup>). Los datos representados son la media ± error estándar de una n=10 esferoides. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Holm-Sidak, con α=0.05

Los resultados obtenidos permitieron concluir que para la generación de esferoides con la línea celular 786-O, la densidad celular influye en el tamaño de los mismos, sin embargo, la obtención de esferoides grandes (>400 µm) resulta en una disminución en la viabilidad celular que se refleja en esferoides frágiles y con pérdida de compactación. Además de que resultaron difíciles de manipular y monitorear a través de microscopía de contraste de fases, razón por lo que se consideró el sembrado de 5,000 células por pozo como la densidad celular óptima. Respecto a la concentración sérica, se observó que, a menor concentración sérica usada, se generaban esferoides más grandes, mientras que el uso de una concentración sérica del 10% generaba esferoides más pequeños, pero que en las últimas horas de tiempo de cultivo se caracterizaron por comenzar a disgregarse, por lo que para los objetivos del proyecto se consideró una concentración sérica del 5%, como óptima.

Durante el monitoreo por microscopía de contraste de fases se observó que en los esferoides generados con la línea celular 786-O, a partir de las 48 horas de cultivo era

posible observar las capas características del modelo tumoral *in vitro*. En la figura 6 se muestra una fotografía representativa del esferoide 786-O en donde es posible apreciar una capa exterior definida de células en proliferación y caracterizada por su poca densidad celular, seguida de una capa quiescente en donde comienza a oscurecer la superficie del esferoide y finalizando con el centro necrótico, la cual se caracteriza por ser el área más grande del esferoide y la zona más oscurecida debido a la densidad celular y compactación de esa zona.

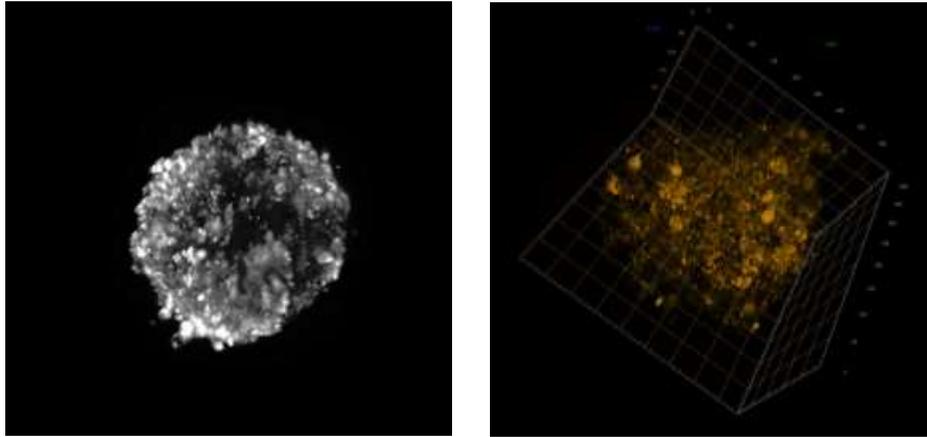


**Figura 6. Capas características del modelo tumoral *in vitro*.** Esferoide generado con la línea celular 786-O, 48 horas de cultivo, 20x. En el esferoide se aprecian tres zonas características; la capa proliferativa que es la capa más superficial, seguido de la capa quiescente y finalmente un centro necrótico que corresponde a la zona con mayor densidad celular.

Para finalizar el primero objetivo del proyecto se realizó la validación del modelo tumoral *in vitro* a través de un marcaje de lisosomas y microscopía de fluorescencia *Light Sheet* (*Carl Zeiss*), que permitió observar la diferente densidad celular de las capas de los esferoides, así como la tridimensionalidad de estos. De acuerdo con diversos estudios, se ha demostrado que este tipo de microscopía es adecuada para la obtención de imágenes de esferoides de células tumorales en tres dimensiones a alta resolución (*Verveer et al.*, 2007) y con células vivas (*Lorenzo et al.*, 2011).

En la figura 7 se muestran las fotografías de los esferoides generados con la línea celular 786-O a las 48 h de cultivo y obtenidas por microscopía de fluorescencia *Light Sheet*. En la primera fotografía, de lado izquierdo se observa en primer plano la capa proliferativa de los

esferoides en donde el marcaje con LysoTracker se aprecia en toda la superficie, en contraste, la segunda fotografía corresponde a un plano  $x, y, z$ ; en donde se observa el marcaje de lisosomas al interior del esferoide. De acuerdo con los resultados obtenidos se valida el establecimiento del modelo tumoral *in vitro*, en donde se comprueba su tridimensionalidad y viabilidad celular a las 48 h de cultivo.



**Figura 7. La microscopía de fluorescencia por Light-Sheet permitió validar la tridimensionalidad del modelo tumoral *in vitro*.** Los esferoides generados con la línea celular 786-O, correspondientes a las 48 horas de tiempo de cultivo fueron teñidos con LysoTracker, un marcador para lisosomas y se observaron bajo microscopía de fluorescencia por Light Sheet (20x).

## Efecto de la inhibición de Hsp90 en la citoarquitectura de esferoides 786-O.

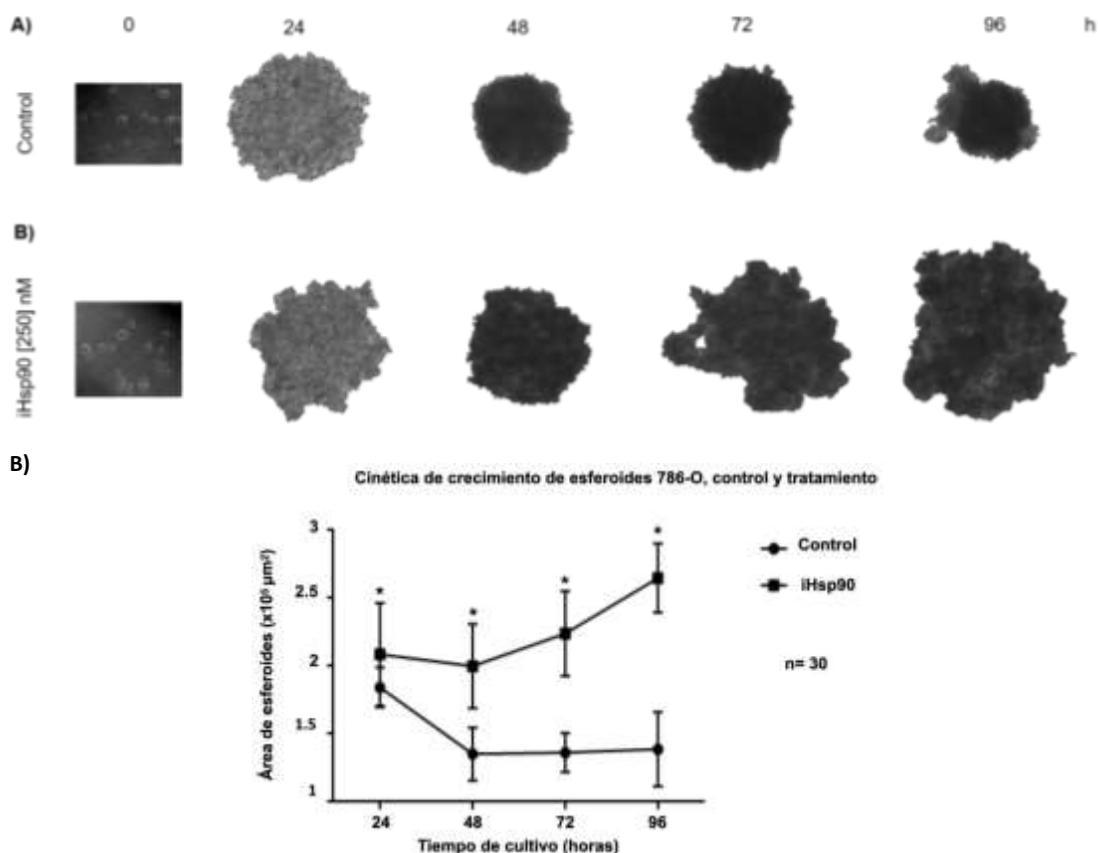
El monitoreo de los esferoides por microscopía de contraste de fases permitió detectar dos partes fundamentales durante el desarrollo del modelo tumoral *in vitro*: las etapas de formación y maduración de los esferoides. Considerando etapa de formación de esferoides desde el tiempo 0 horas, hasta que el esferoide alcanzó una forma circular, compacta y definida, mientras que se consideró como esferoide maduro cuando microscópicamente fue posible observar las distintas densidades celulares, resultado de las capas características de los esferoides: capa proliferativa, zona quiescente y centro necrótico.

Para evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la citoarquitectura de los esferoides se administró una concentración de 250 nM del iHsp90, 17-DMAG a las 0 horas de tiempo de cultivo. El monitoreo se realizó por microscopía de contraste de fases, cada 24 horas, durante 4 días.

En la figura 8 incisos A y B, se muestran las fotografías representativas de los esferoides generados con la línea celular 786-O, control y tratamiento, respectivamente. Los tiempos de cultivo mostrados van desde la hora 0, en donde se observan las células en suspensión hasta las 96 horas de tiempo de cultivo y en donde es posible observar los esferoides envejecidos. Los resultados obtenidos indican que la administración del 17-DMAG tiene un efecto directo sobre la morfología, ya que los esferoides control se caracterizaron por una forma circular y definida, en contraste con el grupo tratado que muestra una morfología poco definida e irregular. Por otra parte, es de particular interés mencionar que a diferencia de los esferoides control, en los esferoides tratados con 17-DMAG no fue posible observar a través de microscopía de contraste de fases las zonas características de los esferoides, lo anterior sugiere que la inhibición de Hsp90 impide que los esferoides alcancen el estado de maduración.

El comportamiento de los esferoides respecto al tamaño se estudió a través de la cinética de crecimiento mostrada en el inciso C, observando que los esferoides control exhiben una cinética de crecimiento de Gompertz (Marusić *et al.*, 1994), es decir, un crecimiento exponencial durante las primeras 24 h de tiempo de cultivo, seguido de un retraso exponencial en la tasa de crecimiento, el efecto contrario se observó en esferoides tratados

con 17-DMAG, en donde el aumento de tamaño fue proporcional al transcurso del tiempo de cultivo, el aumento de tamaño observado en la cinética de crecimiento se relaciona con la morfología irregular mostrada en el panel de fotografías del inciso B.



**Figura 8. El uso del inhibidor de Hsp90 tiene un efecto en el tamaño, morfología y compactación en los esferoides generados con la línea celular 786-O.** A) Esferoides control generados con la línea celular 786-O, desde el tiempo 0 h de cultivo hasta las 96 h. B) Esferoides tratados con iHsp90, 17-DMAG, [250  $\eta$ M], administrado a las 0 h de cultivo. C) Cinética de crecimiento de esferoides generados con la línea celular 786-O, control y tratamiento. En el eje de las "x" se observa el tiempo de cultivo en horas, mientras que en el eje de las "y", el área de los esferoides en  $\mu\text{m}^2$ . Los datos representados son la media  $\pm$  error estándar de una n=30 esferoides. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Holm-Sidak, con  $\alpha=0.05$

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la administración del 17-DMAG en el tiempo de 0 h tiene un efecto directo sobre la citoarquitectura de los esferoides generados con la línea celular 786-O, en los cuáles se observó una afectación a nivel tamaño y

morfología, relacionado a la pérdida de compactación, además de que la etapa de maduración también se observa afectada al no ser alcanzada.

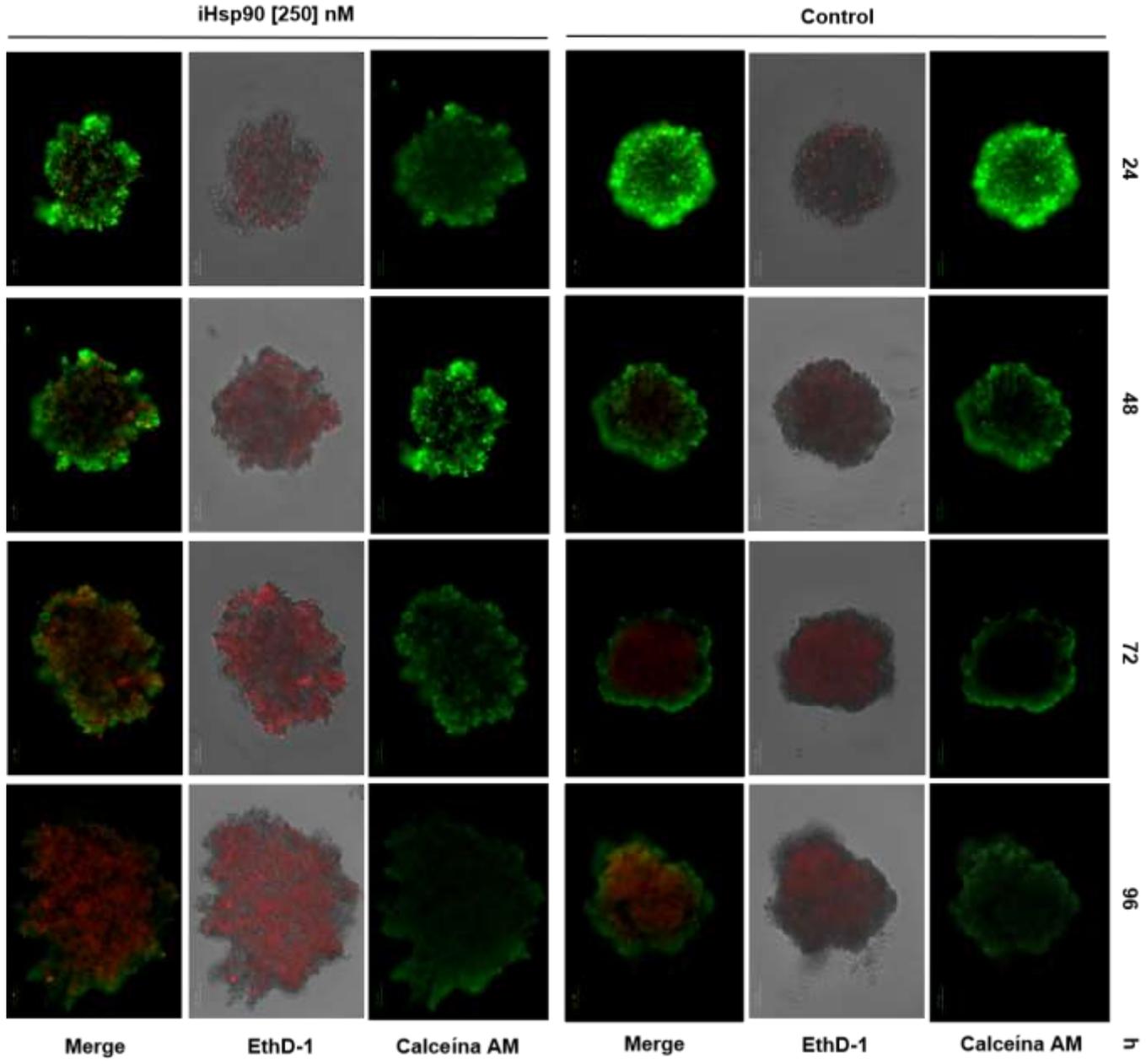
### Efecto de la inhibición de Hsp90 en la población celular de esferoides 786-O.

Para conocer en qué etapa del esferoide y tiempo de cultivo la viabilidad de las células comienza a disminuir y en consecuencia a formar el centro necrótico se realizó un ensayo de viabilidad celular que permitió discriminar entre las células vivas y muertas, a través del marcaje con Calceína AM, verde fluorescente y Homodímero-1 de etidio (EthD-1), rojo fluorescente, respectivamente. El análisis visual de los esferoides generados con la línea celular 786-O a través del generador de imágenes de células fluorescentes ZOE (BioRad) también permitió verificar la viabilidad temporal de las células durante el ensayo.

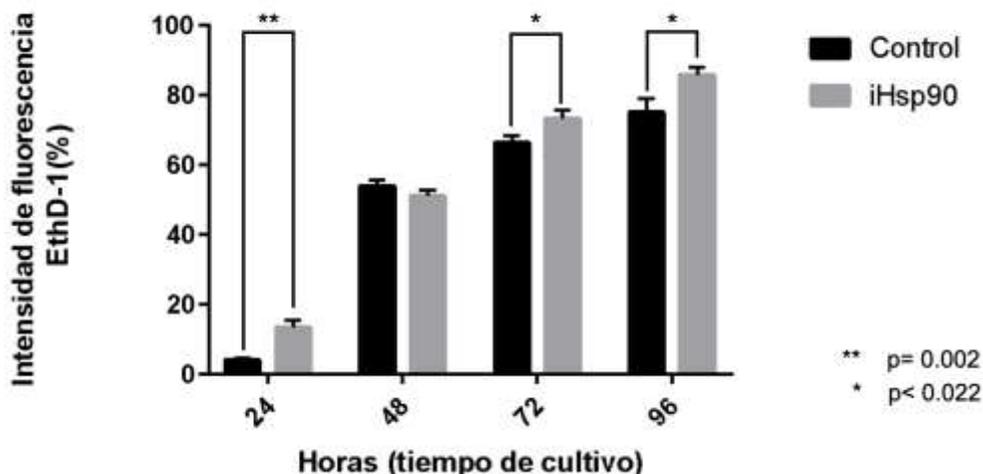
De acuerdo a lo observado en el panel de fotografías de la figura 9, en esferoides control el inicio del centro necrótico comienza a partir de las 48 h, en donde se comienza a observar un marcaje de células muertas al centro del esferoide y que aumenta continuamente durante el tiempo de cultivo, sin embargo se considera que la viabilidad celular comienza a disminuir a las 72 h en donde se observa un patrón de localización exclusivo de células muertas en el centro del esferoide y que comprende la mayor área del mismo. En contraste, en los esferoides tratados con 17-DMAG, la presencia de células muertas se observa de manera homogénea desde las 24 h y hasta las 96 h de cultivo, sin mostrar un patrón de localización.

Los resultados obtenidos a través de los ensayos de viabilidad LIVE/DEAD se relacionan con lo observado en la caracterización morfológica de los esferoides 786-O, en donde se establece que la etapa de maduración de los esferoides es a partir de las 48 horas de cultivo con la aparición de las distintas densidades celulares y de acuerdo con la observado en la figura 9, con el inicio de la formación del centro necrótico. De igual manera se corrobora que el uso del iHsp90, 17-DMAG, impide que los esferoides alcancen un estado de maduración lo cual tiene un efecto sobre la viabilidad celular, observando células muertas desde las 24 h.

A)



B)



**Figura 9. El uso del inhibidor de Hsp90 aumenta la población de células muertas en esferoides generados con la línea celular 786-O.** A) Panel de fotografías correspondientes a los ensayos de viabilidad LIVE/DEAD en esferoides control y tratamiento [250 nM], 17-DMAG, en los tiempos 24, 48, 72 y 96 h de cultivo. En color verde se observan las células metabólicamente activas y marcadas con Calceína AM, mientras que las células marcadas con EthD-1 se observan de color rojo y representan a la población de células muertas, la sobreposición de los canales se indica en el Merge. B) Muerte celular en esferoides generados con la línea celular 786-O control y tratamiento, en el eje de las "x" se observa el tiempo de cultivo correspondiente a 24, 48, 72 y 96 horas de tiempo de cultivo, mientras que en el eje de las "y" se observa el % de la intensidad de fluorescencia del Homodímero de etidio (EthD-1). Los datos representados son la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Holm-Sidak, con  $\alpha=0.05$

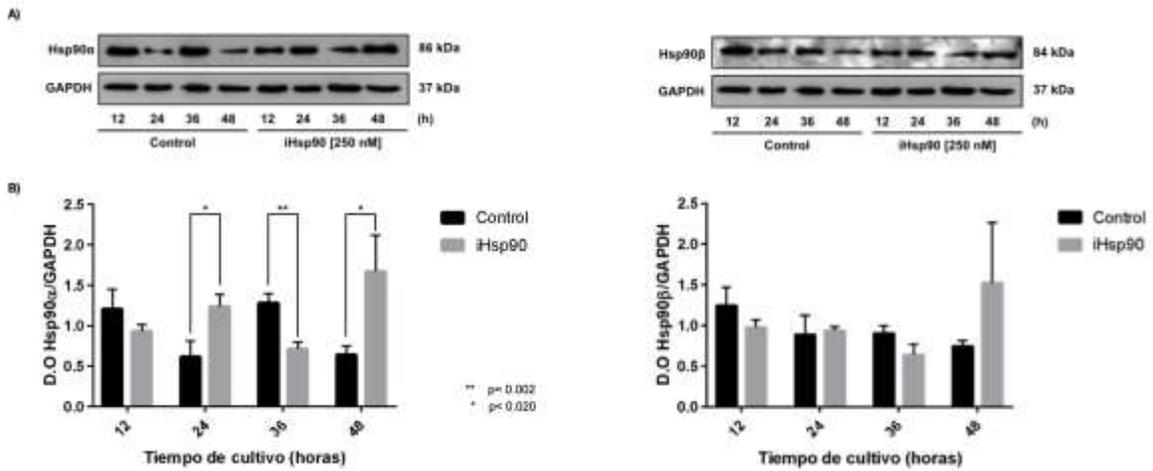
En la figura 9, inciso B, se observan los niveles de intensidad de fluorescencia correspondientes al marcaje con EthD-1, es decir el % de células muertas en los esferoides control y tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 horas de tiempo de cultivo. Observando de manera general que en los esferoides tratados hubo una mayor cantidad de células muertas, mostrando significancia los tiempos de 24, 72 y 96 horas.

## Efecto de la inhibición de Hsp90 en el perfil de expresión de las isoformas Hsp90 $\alpha$ y Hsp90 $\beta$ durante la formación y maduración de esferoides generados con la línea celular 786-O.

Con el objetivo de determinar el efecto del inhibidor de 17-DMAG [250  $\eta$ M] sobre el perfil de expresión de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en los esferoides generados con la línea celular 786-O se realizaron ensayos de western blot, para ello y con base a los resultados obtenidos a través de los ensayos de LIVE/DEAD en donde se observa que a partir de las 72 h de tiempo de cultivo los esferoides control comienzan a perder viabilidad celular, se recuperaron los esferoides correspondientes a las 12, 24, 36 y 48 horas de cultivo, tiempos que comprenden la etapa de formación y maduración de los esferoides.

En la figura 10, incisos A y B se muestran los westerns blots de los niveles de proteínas de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  respectivamente, mientras que en el inciso C se muestran las gráficas correspondientes a la cuantificación de la señal de las proteínas de interés. De manera general se observa que el iHsp90, 17-DMAG, indujo cambios de perfil de expresión en la proteína Hsp90 $\alpha$ , durante los tiempos 24, 36 y 48 h de cultivo. Por otra parte, los niveles de expresión de la proteína Hsp90 $\beta$  no mostraron cambios significativos respecto al tratamiento, aunque se aprecia un aumento de niveles de expresión a las 48 h de tiempo de cultivo, este no resultó significativo.

En la gráfica mostrada en el inciso C se observa que durante las primeras 24 h de tiempo de cultivo ocurre un cambio de perfil de expresión inducido por el iHsp90, 17-DMAG, caracterizado por un aumento en los niveles de la proteína Hsp90 $\alpha$ , seguido de un restablecimiento a las 36 h, resulta interesante el efecto que se observa en esferoides control en donde los niveles de proteína de Hsp90 $\alpha$  son elevados previos a alcanzar el estado de maduración sugiriendo la importancia de la isoforma Hsp90 $\alpha$  para alcanzar dicho estado. Conociendo que los esferoides se encuentran en un estado de maduración a partir de las 48 h de tiempo de cultivo y que de acuerdo a los resultados obtenidos en ensayos anteriores, la inhibición de Hsp90 impide que se alcance el estado de maduración, resultó de particular interés evaluar si existía un cambio de perfil de expresión durante la etapa de maduración (48 h), observando un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de la proteína Hsp90 $\alpha$ , correspondientes a esferoides tratados.



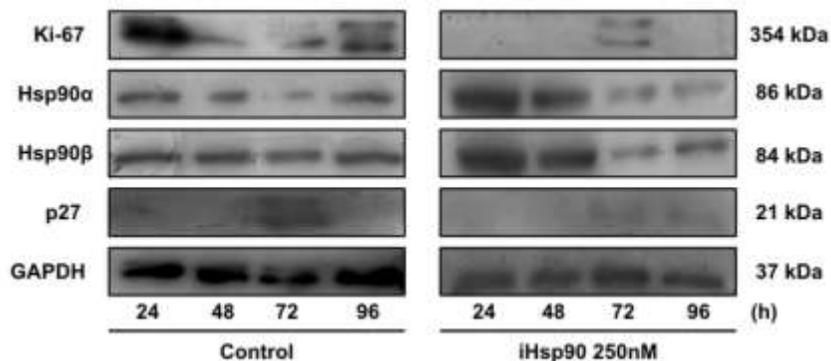
**Figura 10. Efecto de la inhibición de Hsp90 sobre el perfil de expresión de las isoformas Hsp90α y Hsp90β durante la formación y maduración de esferoides.** Incisos A y B) Western Blot representativo del perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β en esferoides control y tratamiento [250 ηM]. C) Gráficas correspondientes a los niveles de expresión de las proteínas Hsp90α y Hsp90β. Los datos representados son la media ± error estándar de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Holm-Sidak, con  $\alpha=0.05$

## Efecto de la inhibición de Hsp90 en la presencia de marcadores de maduración en esferoides 786-O.

Con el objetivo de conocer el efecto del uso del inhibidor de 17-DMAG [250 nM] en los esferoides generados con la línea celular 786-O y su relación con la presencia de los marcadores de proliferación y maduración, Ki-67 y p27, respectivamente se realizaron ensayos de western blot, en los tiempos de 24, 48, 72 y 96 horas.

En la figura 11 se observa que durante la etapa de formación de los esferoides que corresponde a las 24 horas de cultivo, se observa la presencia del marcador de proliferación Ki-67, mientras que en la etapa de maduración este marcador se observa en todos los tiempos. En contraste, en esferoides tratados la presencia del marcador Ki-67 solo se observa a las 72 h de cultivo.

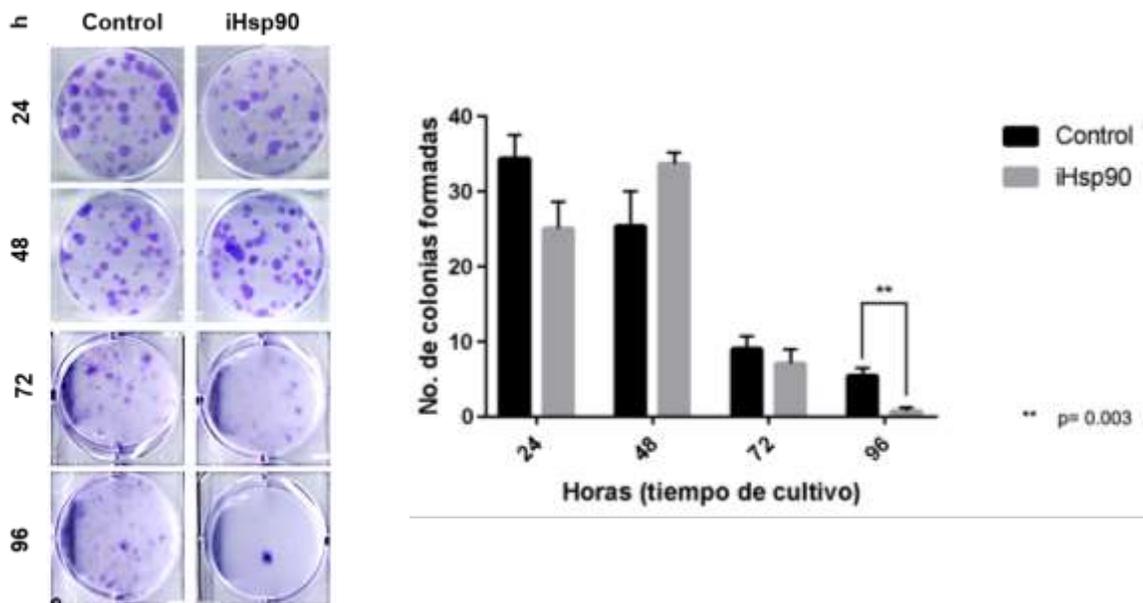
El marcador de quiescencia p27 se observa en esferoides control a las 72 h de cultivo, cuando los esferoides ya alcanzaron un estado de maduración, relacionado estos resultados con los ensayos de viabilidad recordemos que en este tiempo los esferoides ya cuentan con las capas características de los esferoides, por lo que se sugiere que era de esperarse la presencia de p27 en tiempos posteriores al estado de maduración. En esferoides tratados se observa la presencia del marcador en los tiempos de 72 y 96 h.



**Figura 11. Efecto de la iHsp90 en marcadores de maduración en esferoides generados con la línea celular 786-O.** Western Blot representativo del perfil de expresión de Hsp90α y Hsp90β en esferoides control y tratamiento, así como la presencia de marcadores de proliferación y quiescencia, Ki-67 y p27, respectivamente

## Efecto de la inhibición de Hsp90 en la capacidad de formación de colonias.

El efecto de la inhibición de Hsp90 sobre la formación de colonias se estudió a través de ensayos clonogénicos, en donde los esferoides control y tratamiento correspondientes a las 24, 48, 72 y 96 h de cultivo fueron recuperados y disgregados para su posterior sembrado en placas de seis pozos. De acuerdo con lo observado en la figura 12, solo existió una diferencia significativa en el número de colonias formadas a las 96 h de tiempo de cultivo, observando una mayor capacidad clonogénica en los esferoides control que en los esferoides que recibieron tratamiento. Aunque se observó una disminución de formación de colonias en los tiempos 24, 48 y 72 h, respecto a esferoides control, estos no fueron estadísticamente significativos.



**Figura 12. El uso del inhibidor de Hsp90 disminuye la capacidad de formar colonias en esferoides generados con la línea celular 786-O.** A) Fotografías representativas de las colonias formadas a partir de la disgregación de los esferoides control e iHsp90 [250 ηM], 17-DMAG, a las 24, 48, 72 y 96 h de tiempo de cultivo. B) Representación gráfica del efecto de la inhibición de Hsp90 en la capacidad de formación de colonias, en el eje de las "x" se observan las horas (tiempo de cultivo), mientras que en el eje de las "y" el número de colonias formadas. Los datos representados son la media ± error estándar de tres experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó mediante el método de Holm-Sidak, con  $\alpha=0.05$

## Discusión

El objetivo del proyecto fue conocer la participación específica de las proteínas de choque térmico; Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante la formación y maduración de tumores *in vitro* en un modelo de cáncer renal. Para ello, se buscó establecer un modelo tumoral *in vitro* con las líneas celulares de adenocarcinoma renal ACHN y 786-O. Existen varios métodos para generar esferoides, clasificándose en dos grupos: anclaje dependiente y anclaje-independiente (Cui *et al.*, 2017). Basándonos en el principio anclaje-dependiente, se adaptaron dos técnicas: *liquid overlay* y agitación, en donde se empleó una superficie de agarosa en microplacas de 96 pozos que evitó que las células se adhirieran a la superficie, favoreciendo la adhesión célula-célula y un sistema rotativo que contribuyó a la obtención de una estructura esférica. La fusión de ambas técnicas permitió controlar la uniformidad y la reproducción constante de esferoides de forma y tamaño homogéneos.

Se ha reportado que existen variables críticas como la composición del medio, superficie de cultivo, densidad celular, tiempo requerido para la formación, así como el origen y manejo del material tumoral que son determinantes para el establecimiento de cualquier modelo tumoral *in vitro* (Weiswald *et al.*, 2015). Por lo que de manera paralela se probaron diferentes condiciones como la densidad celular y la concentración sérica, observando que para la línea celular de adenocarcinoma renal 786-O a mayor número de células sembradas se generan esferoides más grandes, esta característica ya había sido reportada en varios tipos de líneas celulares de cáncer como glioma, mama y mesotelio (Sant & Johnston, 2017). Sin embargo, los esferoides más grandes se mostraron frágiles y sufrían una disgregación en un tiempo menor que los esferoides de tamaño más pequeños.

De acuerdo con lo reportado, todo modelo de cáncer esférico debe estar caracterizado por una morfología redonda, la presencia de células cancerosas y la capacidad para mantenerse como cultivo en suspensión (Pampaloni *et al.*, 2007). A partir de los resultados obtenidos (ver figura 4), la línea celular ACHN no cumplió estas características, formando agregados celulares que podían ser desprendidos fácilmente de la superficie anti-adherente usada, no podían ser manipulados o transferidos y carecían de una geometría esférica. Por otra parte, la línea celular 786-O formó esferoides, de morfología redonda, compacta y en los cuales con el paso del tiempo de cultivo fue posible observar una capa exterior, capa

intermedia y un centro oscurecido, por lo que esta línea celular se empleó en los ensayos posteriores, descartando el uso de la línea celular ACHN.

Aunque pareciera que la técnica utilizada y el sistema implementado para la formación del modelo tumoral *in vitro*, obliga a las líneas celulares a formar esferoides, no ocurre así. En el 2007, un protocolo publicado por la revista Nature reportó que no todas las líneas celulares son capaces de formar esferoides (Friedrich *et al.*, 2007) y aunque la línea celular ACHN no fue utilizada en el protocolo, no se encontraron reportes en la literatura de ser una línea celular formadora de esferoides. Posiblemente la poca interacción célula-célula y célula-matriz, de algunas líneas celulares tenga un impacto en las propiedades biológicas, impidiendo que formen los tumores *in vitro* (Weiswald *et al.*, 2015).

Una vez establecido el modelo tumoral *in vitro*, la caracterización morfológica de los esferoides se realizó a través de microscopía de contraste de fases y la toma de fotografías en los tiempos deseados (24, 48, 72 y 96 h), para la posterior realización de cinéticas de crecimiento basadas en el área de los esferoides.

Se ha reportado que los mecanismos moleculares para la generación de esferoides constan de tres etapas. En primer lugar, las células que se encuentran en suspensión se aglomeran para formar agregados celulares poco compactos y donde a nivel microscópico es posible observar a las células de manera individual, durante este primer paso, las fibras de la matriz extracelular de cadena larga con múltiples motivos Arginina-Glicina-Aspártico (por el código de una letra en aminoácidos, RGD) para la unión de la integrina de la superficie celular proporcionan la agregación rápida de células dispersas, es decir, termina la etapa de formación del esferoide. En el segundo paso, una fase de retraso sigue a esta agregación que muestra la expresión de cadherina regulada al alza y finalmente, la unión cadherina-cadherina entre las células confiere una fuerte adhesión celular, formando esferoides compactos, es decir un esferoide en etapa de maduración (Lin & Chang. 2008).

La morfología de los esferoides se puede clasificar de acuerdo a su nivel de compacidad: esferoides compactos, agregados apretados y agregados celulares sueltos (Ivanov & Grabowska. 2017). De acuerdo con lo observado por microscopía de contraste de fases, los esferoides generados con la línea celular 786-O tienen una morfología compacta, en

donde las células están estrechamente unidas entre sí, lo que dificulta la distinción de células individuales.

En los esferoides generados con la línea celular 786-O, se consideró etapa de formación desde el tiempo 0 horas hasta que el esferoide obtuvo una geometría esférica en suspensión y no ocurría una disgregación ante un estrés mecánico. Por otra parte, se consideró un esferoide maduro cuando microscópicamente fue posible observar las zonas características de los esferoides, correspondientes a un centro apóptico/necrótico, una capa intermedia de células quiescente con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación. En los esferoides 786-O, las zonas características y, por lo tanto, el estado de maduración se observó a partir de las 48 horas de tiempo de cultivo.

El efecto de la inhibición de Hsp90 en los esferoides generados con la línea celular 786-O se estudió desde dos perspectivas: cambios a nivel estructural y caracterización de los perfiles de expresión de las proteínas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante las etapas de formación y maduración.

Se ha reportado que la alta resistencia de los esferoides a la quimioterapia ocurre de manera similar a los tumores sólidos *in vivo* (Pampaloni, F. *et al.*, 2007). Estando limitada la penetración del fármaco por su diámetro, se ha observado, que algunos medicamentos quimioterapéuticos penetran bien en esferoides pequeños (2,000 células/esferoide), mientras que en esferoides grandes (8, 000 célula/esferoides), la penetración se restringe a la capa exterior (~100  $\mu$ m de profundidad) (Gong, X. *et al.*, 2015). Tomando en cuenta que los esferoides maduros alcanzaron un diámetro promedio de 144  $\mu$ m y que fue de particular interés conocer el papel de las isoformas en la formación de esferoides, se optó por un esquema de administración del iHsp90, 17-DMAG de una sola dosis de 250  $\eta$ M, en el tiempo 0 h, es decir, cuando las células se encontraban en suspensión, de esta forma se garantizó la penetración del fármaco en todas las células.

El 17-dimetilamino-etilamino-17-demetoxidedanamicina (17-DMAG), es un derivado de la GA, con propiedades hidrosolubles y mayor afinidad por el dominio N-terminal de Hsp90 (Jhaveri. 2012; Eiseman. 2005). Un ensayo de fase I de 17-DMAG validó su utilidad clínica en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer renal (Pacey *et al.*, 2011). Sin embargo, no ha

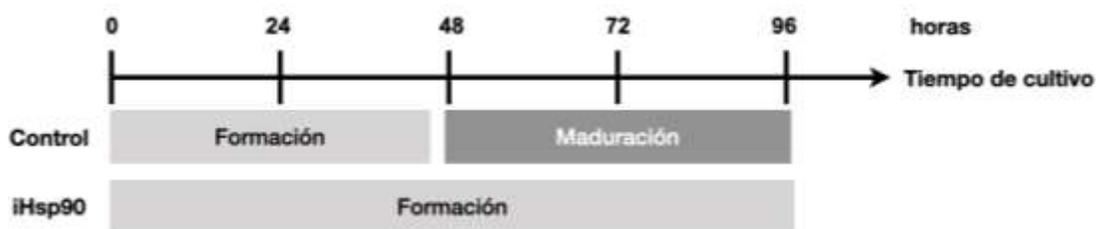
habido informes del efecto de la inhibición de Hsp90 enfocado al papel de las isoformas durante la progresión tumoral.

De acuerdo con lo observado en la figura 8, las cinéticas de crecimiento en esferoides control mostraron una dinámica de crecimiento como la descrita en el modelo de Gompertz, la cual al inicio de la formación del esferoide presenta un crecimiento lento, seguido de un crecimiento exponencial y finalmente se presenta una fase de meseta, en la cual mantienen su tamaño final. Esto va acompañado por el incremento de la población de células necróticas y la disminución de células proliferativas (Mueller-Klieser, W. 1997). Por otro lado, en esferoides tratados con 17-DMAG se observó que el tamaño fue aumentando conforme el tiempo de cultivo, además de que a nivel microscópico no fue posible identificar las capas características del modelo. Conociendo que la formación de esferoides se encuentra mediada por integrinas a moléculas ECM, y las células se agregan de forma compacta por mediación de e-cadherina (Hongxu, L. & Martina, HS. 2018), se sugiere que la inhibición de Hsp90 afecta estas proteínas, impidiendo una morfología compacta e incluso impidiendo que lleguen a un estado de maduración, sin embargo, estas proteínas no fueron estudiadas por lo que se propone como perspectiva del proyecto.

La tinción Live/Dead permitió conocer en qué etapa del esferoide y tiempo de cultivo la viabilidad de las células comienza a disminuir y, en consecuencia, a formar el centro necrótico. Una característica conocida de los esferoides envejecidos es la formación de un centro necrótico, que resulta de la acumulación de productos de desecho metabólicos y la difusión insuficiente de oxígeno/nutrientes en el centro del esferoide a partir de un diámetro superior a 200 a 500  $\mu\text{m}$  (Nath, S. & Devi, GR. 2016). En los esferoides generados con la línea celular 786-O la definición del centro necrótico se observa a las 72 h de tiempo de cultivo (ver figura 9), en donde se observa un patrón de localización de células teñidas con EthD-1, rojo fluorescente en el centro del esferoide y que conforma la mayor parte del mismo.

En conjunto, los resultados observados en la caracterización del modelo tumoral *in vitro*, más los ensayos de viabilidad en la población de células vivas y muertas en esferoides generados con la línea celular 786-O, permitieron concluir que la administración del iHsp90, 17-DMAG impide la etapa de maduración de los esferoides. Sin embargo, fue de particular

interés estudiar el perfil de expresión de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante las etapas identificadas en el modelo tumoral establecido.



**Figura 13.** El uso del inhibidor de Hsp90 impide que los esferoides alcancen la etapa de maduración. En esferoides control la maduración de los esferoides comienza a partir de las 48 h, mientras que en esferoides tratados con 17-DMAG, el estado de maduración no es alcanzado.

Las características genóticas y fenotípicas de la línea celular 786-O, permitieron el establecimiento de un modelo útil para el entendimiento del papel de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la activación del adenocarcinoma renal, mecanismo en donde sobresale la desregulación de la vía de señalización PI3K/Akt y mutaciones en las oncoproteínas PTEN (-/-) y VHL (-/-), Hsp90 actúa estabilizando a sus proteínas “cliente”, permitiendo que las células cancerosas desarrollen una adaptación celular al estrés, favoreciendo la sobrevivencia y proliferación celular, en un contexto que en condiciones fisiológicas sería letal para la célula (Posadas *et al.*, 2017).

Conociendo que los tumores de CRcc se caracterizan por estar muy vascularizados y se encuentran entre los tumores renales más letales (Hsieh *et al.*, 2017). El CRcc, con su pérdida definida de la función VHL y la expresión y actividad constitutiva de HIF resultante (Maranchie *et al.*, 2002), es un modelo útil para descifrar el papel de Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  en la progresión del cáncer y para evaluar las estrategias de inhibición específica contra las isoformas de Hsp90.

Para determinar los niveles de proteína de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante las etapas de formación y maduración de los esferoides, se realizó un western blot con los extractos de las proteínas en los tiempos 12, 24 y 36 h para estudiar la etapa de formación, mientras que el tiempo de 48 h de cultivo permitió estudiar la etapa de maduración. Los esferoides en etapa de formación y maduración presentaron una mayor

expresión de Hsp90 $\alpha$  que los esferoides tratados. Con base en este resultado, se sugiere que, en condiciones patológicas como el carcinoma renal, Hsp90 $\alpha$  podría participar directamente en el crecimiento tumoral, ya que la formación del modelo tumoral *in vitro* representa un contexto en donde las células se encuentran expuestas a condiciones más estresantes y por lo tanto, requieren una mayor expresión de chaperonas moleculares. Lo anterior se justifica en que los elementos de choque térmico (HSE's) se localizan río arriba del promotor de Hsp90 $\alpha$ , lo que, en condiciones de estrés celular, permite la inducción de su expresión tras la unión del factor de choque térmico (HSF1), principal regulador transcripcional de Hsp90 (Zhang *et al.*, 1999), sugiriendo que HSP90 $\alpha$  podría funcionar como un importante acompañante molecular en carcinoma renal.

En contraste con la isoforma Hsp90 $\alpha$ , no se encontraron cambios significativos en los niveles de proteína de Hsp90 $\beta$  durante las etapas de formación y maduración en los esferoides control y tratamiento (figura 10). Se ha reportado que los niveles basales de Hsp90 $\beta$  no dependen de HSF1, ya que, en un modelo de ovocitos, el *knock out* de HSF1 no condujo a la reducción de transcripción de HSP90 $\beta$  (Metchat *et al.* 2009). Lo anterior sugiere que Hsp90 $\beta$  no responde a los mismos estímulos de estrés que Hsp90 $\alpha$ , incluso en un ambiente tumoral *in vitro* caracterizado por condiciones de estrés, como lo son los esferoides.

Por otra parte, en un estudio realizado en el año 2019, los resultados arrojaron que los tumores de cáncer colorrectal de mayor tamaño tenían una expresión de Hsp90 $\beta$  significativamente mayor que los tumores de menor tamaño, mostrando una relación entre el aumento de expresión de Hsp90 $\beta$  y el tamaño del tumor, sugiriendo que HSP90 $\beta$  podría contribuir al crecimiento tumoral o expresarse cada vez más en tumores más grandes (Kim *et al.*, 2019). Aunque no es la primera vez que se relaciona el aumento de los niveles de Hsp90 con el tamaño tumoral, efecto observado en cáncer gástrico avanzado (Wang *et al.*, 2013) y tumores de estoma gastrointestinal (Li *et al.*, 2008), este estudio es de los primeros que muestra una relación específica entre la expresión de la isoforma de Hsp90 $\beta$  y el tamaño tumoral. Sin embargo, en el presente trabajo de investigación no se encontró una asociación entre los niveles de proteína de Hsp90 $\beta$  y el tamaño de los esferoides, lo anterior podría atribuirse a que la medición de los niveles de proteína se realizó solamente en los tiempos de 12, 24, 36 y 48 h, que si bien, son tiempos que cumplen con la evaluación de las etapas de formación y maduración, no son representativos para evaluar el tamaño

máximo que los esferoides alcanzaron, de acuerdo a la cinética de crecimiento obtenida (figura 8).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación no permiten asociar a la isoforma Hsp90 $\beta$  con las etapas de formación y maduración de los esferoides, o al tamaño tumoral. Sin embargo, al conocer que Hsp90 $\beta$  es la isoforma constitutiva y que los niveles de la proteína se hayan mantenido estables y sin cambios significativos, podría sugerir su importancia en la viabilidad y mantenimiento de las células durante el proceso de tumorigénesis, por lo que el rol de Hsp90 $\beta$  debe de seguir siendo explorado.

Durante años se han propuesto los inhibidores de Hsp90 como nuevos agentes terapéuticos, e incluso algunos se han evaluado en ensayos clínicos para diferentes tipos de cánceres, sin embargo, se han encontrado efectos secundarios y toxicidad que parecen resultar del efecto pan inhibitorio sobre las cuatro isoformas de Hsp90 (Whitesell *et al.*, 2003). Esto sugiere que las isoformas de Hsp90 podrían ser objetivos terapéuticos en el carcinoma renal. Además, de acuerdo con nuestros resultados, los inhibidores específicos de HSP90 $\alpha$  podrían ser más efectivos contra el carcinoma renal y tener menos efectos secundarios adversos que los inhibidores de otras isoformas. El impacto de la selectividad de isoformas en el índice de tratamiento y los efectos tóxicos de los inhibidores de Hsp90 deben explorarse en estudios futuros.

Tomando en cuenta que durante el tiempo de vida de cualquier modelo tumoral existe una población de células en proliferación, quiescencia y necróticas, se evaluó la presencia del marcador de proliferación Ki-67 y quiescencia, p27.

En esferoides control se observó la presencia del marcador de proliferación Ki-67 en los 4 tiempos evaluados (24, 48, 72 y 96 h), es decir, durante la etapa de formación y maduración del modelo tumoral *in vitro* la cantidad de células en proliferación es suficiente como para poder ser detectada a través de inmunoblotting. Lo anterior se relaciona con las imágenes obtenidas a través de los ensayos de viabilidad, en donde se aprecian células teñidas con Calceína AM, verde fluorescente, en todos los tiempos evaluados. Es conocido que Ki-67 es un marcador de proliferación que se expresa durante el ciclo celular en los estadios G1, S, G2 y M, excepto G0, y varios estudios han informado que su expresión se asocia con un mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Xie *et al.*, 2017).

En contraste, en esferoides tratados con 17-DMAG la presencia de Ki-67 solamente se observa las 72 h de tiempo de cultivo, lo que podría sugerir un efecto del inhibidor de Hsp90 directo sobre las células en proliferación.

En esferoides control, la presencia del marcador de quiescencia p27, se observa a las 72 h de tiempo de cultivo, en donde los esferoides se encontraban en un estado posterior a la maduración. Esta subpoblación de células inactivas es análoga a aquellas regiones dentro de los tumores en las que la vasculatura es inadecuada u ocluida, lo que da como resultado una masa hipóxica de células no proliferantes que son resistentes a muchas de las terapias actuales (Hanahan & Weiberg. 2011; Weis & Cheresch. 2011). La detención del ciclo celular en esferoides y tumores se ha atribuido a tensiones microambientales, como la privación de oxígeno, factores de crecimiento y / o nutrientes, o la producción de factores inhibidores a partir de células inactivas o necróticas (Lindau *et al.*, 2013; Shiao *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2011). Por otra parte, el marcador de quiescencia, p27 se observó en esferoides tratados a las 72 y 96 horas de tiempo de cultivo, lo anterior se relaciona con lo obtenido a través de los ensayos de viabilidad en donde a estos tiempos la mayoría de las células han mostrado un daño a nivel membrana y por lo tanto se encuentran teñidas con el EthD-1, rojo fluorescente.

El ensayo clonogénico se utilizó para determinar la capacidad de las células provenientes de un microambiente tumoral *in vitro* para replicarse y formar colonias (> 50 células), además de evaluar si existía un efecto del iHsp90, 17-DMAG sobre esta capacidad. Los resultados sugieren que mientras los esferoides se encuentran en una etapa de formación, existe un efecto del iHsp90 sobre la capacidad para formar colonias, observando una disminución significativa en el número de colonias formadas respecto al control. Por otra parte, en esferoides control que alcanzan su estado de maduración a las 48 h de tiempo de cultivo se observó el efecto contrario en donde se observa una disminución significativa de número de colonias formadas respecto al tratamiento.

# Conclusiones

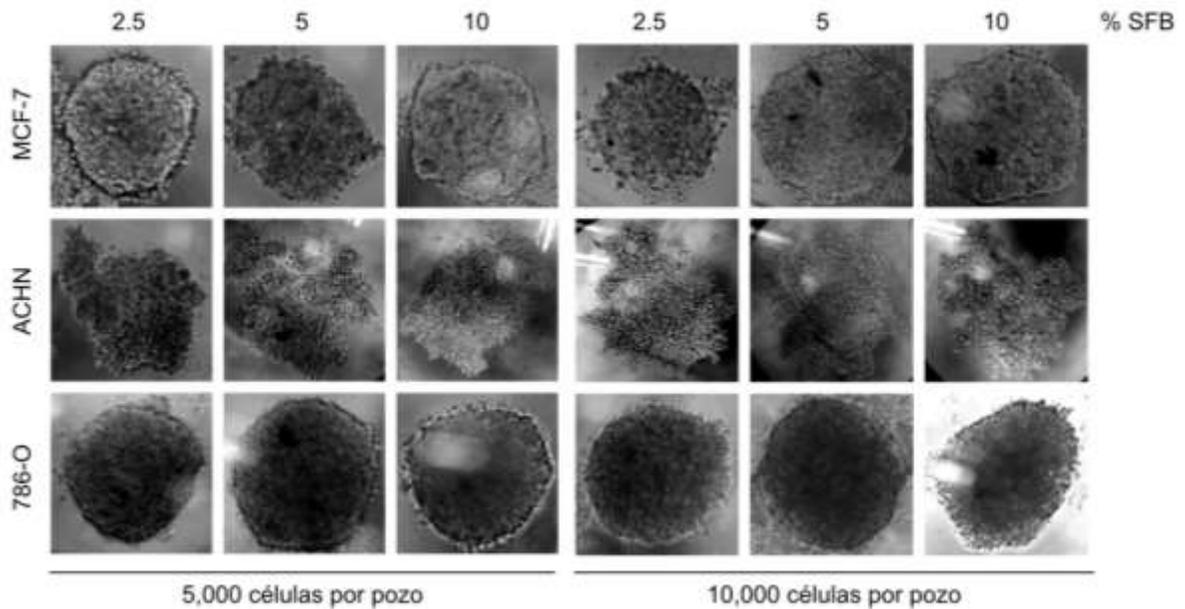
- Se logró implementar y estandarizar un modelo tumoral *in vitro* de adenocarcinoma renal con la línea celular 786-O, a través del principio anclaje dependiente y la adaptación de dos de sus técnicas; *liquid overlay* y agitación, obteniendo esferoides de tamaño homogéneo y producción constante.
- La caracterización morfológica o arquitectura 3D de los tumores *in vitro* de CRcc permitió identificar dos etapas en el modelo tumoral: formación y maduración. Considerando etapa de formación desde el sembrado de células hasta que se apreciaba un agregado celular y etapa de maduración a partir de las 48 h de tiempo de cultivo, donde fue posible observar las diferentes densidades celulares del modelo, capa proliferativa, zona quiescente y centro sugerente de necrosis.
- La inhibición farmacológica de Hsp90 con el inhibidor 17-DMAG impidió que los tumores *in vitro* alcanzaran la etapa de maduración, respaldando la dependencia de las proteínas Hsp90 en esta etapa de la tumorigénesis.
- Los niveles de proteínas de las isoformas de Hsp90, sugieren que la isoforma Hsp90 $\alpha$  es esencial para alcanzar el estado de maduración en esferoides de adenocarcinoma renal, mientras que la isoforma Hsp90 $\beta$  no logró asociarse a alguna etapa del modelo tumoral *in vitro*, que sus niveles se hayan mantenido constantes sugieren su participación en la viabilidad de las células formadoras de esferoides.

# Perspectivas

Como perspectiva del presente proyecto de investigación es necesario explorar el efecto de la sobreexpresión y sub-expresión de las isoformas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  durante las etapas de formación y maduración de los esferoides generados con la línea celular, 786-O. Lo anterior dará mayor claridad respecto al rol que desempeña cada una de las isoformas durante el proceso de tumorigénesis.

Conociendo que el uso del iHsp90, 17-DMAG impide que los esferoides alcancen un estado de maduración, es importante estudiar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre los niveles de proteínas "clave" para la formación de esferoides, como lo son integrinas y cadherinas, así como asociar estos patrones a la posible dependencia a alguna de las isoformas de Hsp90, Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$ , durante las etapas identificadas en los esferoides.

## Figuras suplementarias



**Figura 14. Optimización del modelo tumoral *in vitro*.** Panel fotografías obtenidas a las 48 horas de tiempo de cultivo, en la parte superior se indican las distintas concentraciones séricas utilizadas (2.5, 5 y 10% de SFB), mientras que las líneas celulares empleadas se muestran en la parte izquierda, iniciando con la línea celular de cáncer de mama MCF-7, seguida de las líneas celulares de adenocarcinoma renal ACHN y 786-O. La densidad celular sembrada en cada pozo se indica en la parte inferior de la figura, utilizando dos densidades distintas, 5,000 y 10,000 células, respectivamente.

# Bibliografía

- Anyika, M., McMullen, M., Forsberg, L. K., Dobrowsky, R. T., & Blagg, B. S. (2015). **Development of Noviomimetics as C-Terminal Hsp90 Inhibitors.** *ACS medicinal chemistry letters*, 7(1), 67–71.
- Brodaczewska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., & Czarnecka, A. M. (2016). **Choosing the right cell line for renal cell cancer research.** *Molecular cancer*, 15(1), 83.
- Carey, C. C., Gorman, K. F., & Rutherford, S. (2006). **Modularity and intrinsic evolvability of Hsp90-buffered change.** *PloS one*, 1(1), e76.
- Chiosis, G., & Neckers, L. (2006). **Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive.** *ACS chemical biology*, 1(5), 279–284.
- Chiosis, G., Huezo, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Whitesell, L., & Neckers, L. (2003). **17AAG: low target binding affinity and potent cell activity—finding an explanation.** *Molecular cancer therapeutics*, 2(2), 123–129.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). **The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research.** *Anticancer research*, 35(6), 3147–3154.
- 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 $\alpha$  and Hsp90 $\beta$  on eNOS ability to produce nitric oxide or superoxide anion in human embryonic kidney cells.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 26(4-5), 657–668.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., & Nardai, G. (1998). **The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review.** *Pharmacology & therapeutics*, 79(2), 129–168.
- Cui, X., Hartanto, Y., & Zhang, H. (2017). **Advances in multicellular spheroids formation.** *Journal of the Royal Society, Interface*, 14(127), 20160877.

- Echeverría, P. C., Bernthaler, A., Dupuis, P., Mayer, B., & Picard, D. (2011). **An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine.** *PloS one*, 6(10), e26044.
- Eiseman, J. L., Lan, J., Lagattuta, T. F., Hamburger, D. R., Joseph, E., Covey, J. M., & Egorin, M. J. (2005). **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[2-dimethylamino)ethyl]amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts.** *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 55(1), 21–32.
- Eustace, B. K., Sakurai, T., Stewart, J. K., Yimlamai, D., Unger, C., Zehetmeier, C., Lain, B., Torella, C., Henning, S. W., Beste, G., Scroggins, B. T., Neckers, L., Ilag, L. L., & Jay, D. G. (2004). **Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness.** *Nature cell biology*, 6(6), 507–514.
- Fortunato, A., Boddy, A., Mallo, D., Aktipis, A., Maley, C. C., & Pepper, J. W. (2017). **Natural Selection in Cancer Biology: From Molecular Snowflakes to Trait Hallmarks.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(2), a029652.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. **Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting.** *FEBS J.* 2011 Jan;278(1):16-27.
- Gong, X., Lin, C., Cheng, J., Su, J., Zhao, H., Liu, T., Wen, X., & Zhao, P. (2015). **Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing.** *PloS one*, 10(6), e0130348.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R. H., Kvietikova, I., fhitelaw, M. L., Toftgård, R., Tora, L., Gassmann, M., & Poellinger, L. (1996). **Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor.** *Molecular and cellular biology*, 16(10), 5221–5231.
- Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2007). **Defining the role of mTOR in cancer.** *Cancer cell*, 12(1), 9–22.
- Haase, M., & Fitze, G. (2016). **HSP90AB1: Helping the good and the bad.** *Gene*, 575(2 Pt 1), 171–186.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, 144(5), 646–674.
- Heck, A. L., Mishra, S., Prenzel, T., Feulner, L., Achhammer, E., Särchen, V., Blagg, B., Schneider-Brachert, W., Schütze, S., & Fritsch, J. (2021). **Selective HSP90 $\beta$  inhibition results in TNF and TRAIL mediated HIF1 $\alpha$  degradation.** *Immunobiology*, 226(2), 152070.
- Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., Wright, W. E., & White, M. A. (1999). **Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes.** *Genes & development*, 13(7), 817–826.
- Hoter, A., El-Sabban, M. E., & Naim, H. Y. (2018). **The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease.** *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2560.
- Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V. **Renal cell carcinoma.** *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 9;3:17009.
- Hur, E., Kim, H. H., Choi, S. M., Kim, J. H., Yim, S., Kwon, H. J., Choi, Y., Kim, D. K., Lee, M. O., & Park, H. (2002). **Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol.** *Molecular pharmacology*, 62(5), 975–982.
- Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., Kaelin, W. G., Jr, & Goldberg, M. A. (1996). **Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10595–10599.
- Irby, R. B., & Yeatman, T. J. (2000). **Role of Src expression and activation in human cancer.** *Oncogene*, 19(49), 5636–5642.
- Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mimnaugh, E. G., Martinez, A., Cuttitta, F., & Neckers, L. M. (2002). **Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ -degradative pathway.** *The Journal of biological chemistry*, 277(33), 29936–29944.
- Ivanov, D. P., & Grabowska, A. M. (2017). **Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D.** *Scientific reports*, 7, 41160.

- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). **Small heat shock proteins are molecular chaperones.** *The Journal of biological chemistry*, 268(3), 1517–1520.
- Jhaveri, K., Taldone, T., Modi, S., & Chiosis, G. (2012). **Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers.** *Biochimica et biophysica acta*, 1823(3), 742–755.
- Kaelin W. G., Jr (2007). **The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(2 Pt 2), 680s–684s.
- Kaldany, A., Paulucci, D. J., Kannappan, M., Beksac, A. T., Anastos, H., Okhawere, K., Sfakianos, J. P., & Badani, K. K. (2019). **Clinicopathological and survival analysis of clinically advanced papillary and chromophobe renal cell carcinoma.** *Urologic oncology*, 37(10), 727–734.
- Kamal, A., Thao, L., Sensintaffar, J., Zhang, L., Boehm, M. F., Fritz, L. C., & Burrows, F. J. (2003). **A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors.** *Nature*, 425(6956), 407–410
- Kim, K., Lee, H. W., Lee, E. H., Park, M. I., Lee, J. S., Kim, M. S., Kim, K., Roh, M. S., Pak, M. G., Oh, J. E., Kim, K. M., Lee, J. W., Kim, T. G., & Nam, H. Y. (2019). **Differential expression of HSP90 isoforms and their correlations with clinicopathologic factors in patients with colorectal cancer.** *International journal of clinical and experimental pathology*, 12(3), 978–986.
- Kliche, S., & Waltenberger, J. (2001). **VEGF receptor signaling and endothelial function.** *IUBMB life*, 52(1-2), 61–66.
- Kondo, K., Kim, W. Y., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G., Jr (2003). **Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth.** *PLoS biology*, 1(3), E83.
- Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G., Jr (2002). **Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein.** *Cancer cell*, 1(3), 237–246.

- Kosinsky, R. L., Helms, M., Zerche, M., Wohn, L., Dyas, A., Prokakis, E., Kazerouni, Z. B., Bedi, U., Wegwitz, F., & Johnsen, S. A. (2019). ***USP22-dependent HSP90AB1 expression promotes resistance to HSP90 inhibition in mammary and colorectal cancer.*** *Cell death & disease*, 10(12), 911.
- Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). ***Three-dimensional cell culture matrices: state of the art.*** *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 14(1), 61–86.
- Li, C. F., Huang, W. W., Wu, J. M., Yu, S. C., Hu, T. H., Uen, Y. H., Tian, Y. F., Lin, C. N., Lu, D., Fang, F. M., & Huang, H. Y. (2008). ***Heat shock protein 90 overexpression independently predicts inferior disease-free survival with differential expression of the alpha and beta isoforms in gastrointestinal stromal tumors.*** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(23), 7822–7831.
- Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). ***Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research.*** *Biotechnology journal*, 3(9-10), 1172–1184.
- Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P., & Adema, G. J. (2013). ***The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells.*** *Immunology*, 138(2), 105–115.
- Liu, L., Qian, J., Singh, H., Meiers, I., Zhou, X., & Bostwick, D. G. (2007). ***Immunohistochemical analysis of chromophobe renal cell carcinoma, renal oncocytoma, and clear cell carcinoma: an optimal and practical panel for differential diagnosis.*** *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(8), 1290–1297.
- Lorenzo, C., Frongia, C., Jorand, R., Fehrenbach, J., Weiss, P., Maandhui, A., Gay, G., Ducommun, B., & Lobjois, V. (2011). ***Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy.*** *Cell division*, 6, 22.
- Lund, P.A. (2001). *Molecular chaperones in the cell.* Oxford University Press, Oxford.
- Mabweesh, N. J., Post, D. E., Willard, M. T., Kaur, B., Van Meir, E. G., Simons, J. W., & Zhong, H. (2002). ***Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells.*** *Cancer research*, 62(9), 2478–2482.

- Mandriota, S. J., Turner, K. J., Davies, D. R., Murray, P. G., Morgan, N. V., Sowter, H. M., Wykoff, C. C., Maher, E. R., Harris, A. L., Ratcliffe, P. J., & Maxwell, P. H. (2002). **HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron.** *Cancer cell*, 1(5), 459–468.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.** *Nature reviews. Immunology*, 11(8), 519–531.
- Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M., & Klausner, R. D. (2002). **The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma.** *Cancer cell*, 1(3), 247–255.
- Marusić, M., Bajzer, Z., Freyer, J. P., & Vuk-Pavlović, S. (1994). **Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models.** *Cell proliferation*, 27(2), 73–94.
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). **HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.** *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 5(5), 378–389.
- Marzec, M., Eletto, D., & Argon, Y. (2012). **GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum.** *Biochimica et biophysica acta*, 1823(3), 774–787.
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). **Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 164(2), 192–204.
- Melstrom, L. G., Salabat, M. R., Ding, X. Z., Strouch, M. J., Grippo, P. J., Mirzoeva, S., Pelling, J. C., & Bentrem, D. J. (2011). **Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells.** *The Journal of surgical research*, 167(2), 173–181.
- Metchat, A., Akerfelt, M., Bierkamp, C., Delsinne, V., Sistonen, L., Alexandre, H., & Christians, E. S. (2009). **Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression.** *The Journal of biological chemistry*, 284(14), 9521–9528.

- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J., & Michiels, C. (1999). ***Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction.*** *FEBS letters*, 460(2), 251–256.
- Misselwitz, B., Staeck, O. & Rapoport, TA (1998). ***Proteínas J catalíticamente activan moléculas de Hsp70 para atrapar una amplia gama de secuencias de péptidos.*** *Cell Mol*, 2, 593-603.
- Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T., & Giles, F. J. (2008). ***Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics.*** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(16), 5000–5005.
- Miyata Y. (2005). ***Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents.*** *Current pharmaceutical design*, 11(9), 1131–1138.
- Moasser M. M. (2007). ***The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis.*** *Oncogene*, 26(45), 6469–6487.
- Mueller-Klieser W. (1997). ***Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications.*** *The American journal of physiology*, 273(4), C1109–C1123.
- Na, J. C., Kim, J. H., Kim, S. Y., Gu, Y. R., Jun, D. Y., Lee, H. H., Yoon, Y. E., Choi, K. H., Hong, S. J., & Han, W. K. (2020). ***Establishment of patient-derived three-dimensional organoid culture in renal cell carcinoma.*** *Investigative and clinical urology*, 61(2), 216–223.
- Nagaraju, G. P., Long, T. E., Park, W., Landry, J. C., Taliaferro-Smith, L., Farris, A. B., Diaz, R., & El-Rayes, B. F. (2015). ***Heat shock protein 90 promotes epithelial to mesenchymal transition, invasion, and migration in colorectal cancer.*** *Molecular carcinogenesis*, 54(10), 1147–1158.
- Nakajima, A., Endo, H., Okuyama, H., Kiyohara, Y., Kimura, T., Kamiura, S., Hiraoka, M., & Inoue, M. (2015). ***Radiation sensitivity assay with a panel of patient-derived spheroids of small cell carcinoma of the cervix.***

- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). **Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model.** *Pharmacology & therapeutics*, 163, 94–108
- Nathan, D. F., Vos, M. H., & Lindquist, S. (1997). **In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 12949–12956.
- Neckers, L., Schulte, T. W., & Mimnaugh, E. (1999). **Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity.** *Investigational new drugs*, 17(4), 361–373.
- Osada, M., Imaoka, S., & Funae, Y. (2004). **Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein.** *FEBS letters*, 575(1-3), 59–63.
- Pacey, S., Wilson, R. H., Walton, M., Eatock, M. M., Hardcastle, A., Zetterlund, A., Arkenau, H. T., Moreno-Farre, J., Banerji, U., Roels, B., Peachey, H., Aherne, W., de Bono, J. S., Raynaud, F., Workman, P., & Judson, I. (2011). **A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6), 1561–1570.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. (2007). **The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 839–845.
- Pan, T., Fong, E. L., Martinez, M., Harrington, D. A., Lin, S. H., Farach-Carson, M. C., & Satcher, R. L. (2015). **Three-dimensional (3D) culture of bone-derived human 786-O renal cell carcinoma retains relevant clinical characteristics of bone metastases.** *Cancer letters*, 365(1), 89–95.
- Parmiani, G., Testori, A., Maio, M., Castelli, C., Rivoltini, L., Pilla, L., Belli, F., Mazzaferro, V., Coppa, J., Patuzzo, R., Sertoli, M. R., Hoos, A., Srivastava, P. K., & Santinami, M. (2004). **Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(24), 8142–8146.
- Pearl L. H. (2016). **Review: The HSP90 molecular chaperone-an enigmatic ATPase.** *Biopolymers*, 105(8), 594–607.

- Perotti, C., Liu, R., Parusel, C. T., Böcher, N., Schultz, J., Bork, P., Pfitzner, E., Groner, B., & Shemanko, C. S. (2008). **Heat shock protein-90-alpha, a prolactin-STAT5 target gene identified in breast cancer cells, is involved in apoptosis regulation.** *Breast cancer research : BCR*, 10(6), R94.
- Petejova, N., & Martinek, A. (2016). **Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors.** *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 160(2), 183–194.
- Posadas EM, Limvorasak S, Figlin RA. **Targeted therapies for renal cell carcinoma.** *Nat Rev Nephrol*. 2017 Aug;13(8):496-511.
- Pratt W. B. (1998). **The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 217(4), 420–434
- Prodromou C. (2016). **Mechanisms of Hsp90 regulation.** *The Biochemical journal*, 473(16), 2439–2452.
- Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., & Ansieau, S. (2006). **A twist for survival and cancer progression.** *British journal of cancer*, 94(1), 13–17.
- Qie, S., & Diehl, J. A. (2016). **Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment.** *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(12), 1313–1326.
- Quintás-Cardama, A., & Cortes, J. (2009). **Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia.** *Blood*, 113(8), 1619–1630.
- Rae, C., & Mairs, R. J. (2017). **Evaluation of the radiosensitizing potency of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells.** *International journal of radiation biology*, 93(2), 194–203.
- Rini, B. I., Campbell, S. C., & Escudier, B. (2009). **Renal cell carcinoma.** *Lancet (London, England)*, 373(9669), 1119–1132.

- Rutherford S. L. (2003). **Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability.** *Nature reviews. Genetics*, 4(4), 263–274.
- Sanchez, J., Carter, T. R., Cohen, M. S., & Blagg, B. (2020). **Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone.** *Current cancer drug targets*, 20(4), 253–270.
- Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). **The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery.** *Drug discovery today. Technologies*, 23, 27–36.
- Satelli, A., & Li, S. (2011). **Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(18), 3033–3046.
- Sekino, Y., Hagura, T., Han, X., Babasaki, T., Goto, K., Inoue, S., Hayashi, T., Teishima, J., Shigeta, M., Taniyama, D., Kuraoka, K., Sentani, K., Yasui, W., & Matsubara, A. (2020). **PTEN Is Involved in Sunitinib and Sorafenib Resistance in Renal Cell Carcinoma.** *Anticancer research*, 40(4), 1943–1951.
- Sharp, S., & Workman, P. (2006). **Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status.** *Advances in cancer research*, 95, 323–348.
- Shiao, S. L., Ganesan, A. P., Rugo, H. S., & Coussens, L. M. (2011). **Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy.** *Genes & development*, 25(24), 2559–2572.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2012). **Cancer statistics, CA Cancer J Clin.** 62(1): 10–29.
- Sreedhar, A. S., Kalmár, E., Csermely, P., & Shen, Y. F. (2004). **Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance.** *FEBS letters*, 562(1-3), 11–15.
- Taherian, A., Krone, P. H., & Ovsenek, N. (2008). **A comparison of Hsp90alpha and Hsp90beta interactions with cochaperones and substrates.** *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 86(1), 37–45.
- Taipale, M., Jarosz, D. F., & Lindquist, S. (2010). **HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights.** *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(7), 515–528.

- Tiburcio, P. D., Choi, H., & Huang, L. E. (2014). **Complex role of HIF in cancer: the known, the unknown, and the unexpected.** *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 2, 59–70.
- Verveer, P. J., Swoger, J., Pampaloni, F., Greger, K., Marcello, M., & Stelzer, E. H. (2007). **High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy.** *Nature methods*, 4(4), 311–313.
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., & Poulsen, H. S. (1997). **Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 8(12), 1197–1206.
- Wang, H., Lu, M., Yao, M., & Zhu, W. (2016). **Effects of treatment with an Hsp90 inhibitor in tumors based on 15 phase II clinical trials.** *Molecular and clinical oncology*, 5(3), 326–334.
- Wang, J., Cui, S., Zhang, X., Wu, Y., & Tang, H. (2013). **High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer.** *PloS one*, 8(4), e62876.
- Wang, X., Song, X., Zhuo, W., Fu, Y., Shi, H., Liang, Y., Tong, M., Chang, G., & Luo, Y. (2009). **The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21288–21293.
- Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). **Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets.** *Nature medicine*, 17(11), 1359–1370.
- Whitesell, L., & Lindquist, S. L. (2005). **HSP90 and the chaperoning of cancer.** *Nature reviews. Cancer*, 5(10), 761–772.
- Whitesell, L., Bagatell, R., & Falsey, R. (2003). **The stress response: implications for the clinical development of hsp90 inhibitors.** *Current cancer drug targets*, 3(5), 349–358.
- Wolf, M. M., Kimryn Rathmell, W., & Beckermann, K. E. (2020). **Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications.** *Oncogene*, 39(17), 3413–3426.

- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). ***NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers.*** *Cancer immunology research*, 2(9), 823–830.
- Xie, C., Schwarz, E. M., Sampson, E. R., Dhillon, R. S., Li, D., O'Keefe, R. J., & Tyler, W. (2012). ***Unique angiogenic and vasculogenic properties of renal cell carcinoma in a xenograft model of bone metastasis are associated with high levels of vegf-a and decreased ang-1 expression.*** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(2), 325–333.
- Xie, Y., Chen, L., Ma, X., Li, H., Gu, L., Gao, Y., Fan, Y., Zhang, Y., & Zhang, X. (2017). ***Prognostic and clinicopathological role of high Ki-67 expression in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis.*** *Scientific reports*, 7, 44281.
- Xu, W., & Neckers, L. (2007). ***Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 provides a multifaceted effect on diverse cell signaling pathways of cancer cells.*** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(6), 1625–1629.
- Yoeli-Lerner, M., & Toker, A. (2006). ***Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion.*** *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(6), 603–605.
- Zhang, S. L., Yu, J., Cheng, X. K., Ding, L., Heng, F. Y., Wu, N. H., & Shen, Y. F. (1999). ***Regulation of human hsp90alpha gene expression.*** *FEBS letters*, 444(1), 130–135.
- Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y. C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A. B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., Boone, C., Emili, A., & Houry, W. A. (2005). ***Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone.*** *Cell*, 120(5), 715–727.