



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Significancia clínica de las proteínas
Hsp90 α y Hsp90 β en carcinoma renal de
células claras y su asociación con el
estatus de las proteínas supresoras de
tumor PTEN/VHL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A

Zacgnihtte Guerrero Narvárez

DIRECTOR DE TESIS

DR. CARLO CESAR CORTÉS GONZÁLEZ

CO-ASESORA

DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

UNAM
CUAUTITLÁN

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautilán.**

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

Significancia clínica de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en carcinoma renal de células claras y su asociación con el estatus de las proteínas supresoras de tumor PTEN/VHL.

Que presenta la pasante: **Zacgnihte Guerrero Narváez**

Con número de cuenta: **316171803** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautilán Izcalli, Méx. a 18 de Septiembre de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dra. Heidi Joanna Amezcua Hempel	
1er. SUPLENTE	Dr. Samuel Álvarez Almazán	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado a través del Fondo de Ciencia Básica con número de proyecto, CB-243380; y a la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI), por el financiamiento recibido a través del proyecto SECTEI/276/2019. Ambos financiamientos a cargo del Dr. Carlo César Cortés González, como Responsable Técnico.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre estuvieron a mi lado en las buenas y en las malas, trabajando sin descanso para darme a mi y a mi hermano lo mejor. Gracias, padres, porque hoy por primera vez puedo decir que me siento orgullosa de la persona que soy. Gracias por su peculiar forma de demostrarme su amor infinito y creer en mí cuando ni yo lo hacía.

A mi hermano y mejor amigo, Gael. Por siempre apoyarme y soportarme. Sabes que eres mi inspiración y que cada día me esfuerzo para que te sientas orgulloso de mi y poder algún día ser al menos la mitad de lo brillante y fantástico que eres tú.

A mis abuelos porque desde pequeña me llenaron de amor y me dieron lo mejor de ellos mismos. Me siento muy afortunada de ser la nieta que más disfrutó de su tiempo, gracias por todas sus enseñanzas.

A Andrés. Nos encontramos desde que iniciamos la universidad y desde ese entonces no has dejado de creer ni un segundo en mí, siempre me has apoyado y has estado en momentos felices y no tan felices. Gracias por quererme como soy y hacerme tan feliz. Sigamos creciendo juntos mucho tiempo más.

A Carely, mi mejor amiga. Gracias por ser tan auténtica, noble y valiente. Me has enseñado tantas cosas y dado momentos muy felices, gracias por estar en mi vida.

- *Me encontraste en lo más bajo, en el camino disfrazado de atajo. Nada de lo que veía, nada de lo que creía importa en este día pues me encontraste. Ni de lo que lloraba, ni de lo que me quejaba. Mi carga quitaste cuando me encontraste. Ciencia de la lluvia – Enjambre.*
- *Hoy eres ausencia, eras mi materia. Desamparo de mi azar sombrío, no tienes remplazo. El vacío – Enjambre.*
- *Con un ser converso, de otro universo. Algún día te dejaré por siempre de buscar, lo digo porque sé nos vamos a encontrar. En un púrpura atardecer que no se apagará, todos van a ver un nuevo principio, un encuentro del tercer tipo. Tercer tipo – Enjambre.*

Índice

1. Abreviaturas.....	5
2. Introducción.....	6
3. Marco teórico.....	8
3.1 Cáncer renal.....	8
3.1.1. Carcinogénesis	10
3.1.2. Epidemiología, factores de riesgo, clasificación y diagnóstico.....	11
3.2. Terapéutica del CRcc.....	14
3.2.1. Biomarcadores en CRcc.....	15
3.3. Genética y biología molecular del CRcc.....	18
3.3.1. Gen von Hippel-Lindau (VHL).....	19
3.3.2. Vía de señalización VHL/HIF1 α /VEGF.....	21
3.3.3. Gen Homólogo de Fosfatasa y Tensina (PTEN)	22
3.3.4. Vía de señalización PTEN/AKT/mTOR.....	25
3.4. Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)	26
3.4.1. Generalidades y subfamilias de las HSP	26
3.4.2. Isoformas Hsp90 α y Hsp90 β	28
3.5. Hsp90 en cáncer.....	29
3.5.1. Hsp90 como terapia blanco en cáncer	30
3.5.2. Hsp90 como biomarcador en cáncer	31
3.5.3. Participación en vías de señalización y regulación de oncogenes y supresores de tumor importantes en CRcc	32
4. Antecedentes generales.....	34
5. Antecedentes directos.....	35
6. Planteamiento del problema.....	36
7. Pregunta de investigación.....	36
8. Hipótesis.....	37
9. Objetivos.....	37
9.1. Objetivo general.....	37
9.2. Objetivos particulares.....	37
10. Metodología.....	38
11. Resultados.....	42
12. Discusión.....	56
13. Conclusiones.....	61
14. Bibliografía.....	62
15. Anexos.....	67

1. Abreviaturas

- AKT: Proteína cinasa B
- BAP1: Proteína asociada a BRCA1
- BRCA1: *Breast cancer type 1 susceptibility protein*.
- CR: Cáncer renal
- CRcc: Carcinoma renal de células claras
- D.O.: Densidad Óptica
- EGF: *Epidermal Growth Factor* (Factor de Crecimiento Epidérmico)
- HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia alfa 1
- HSF: *Heat Shock Factor* (Factor de choque térmico)
- *HSP90AA1*: Gen que codifica a la proteína Hsp90 α
- *HSP90AB1*: Gen que codifica a la proteína Hsp90 β
- Hsp: Proteínas de choque térmico
- Hsp90: Proteínas de choque térmico de 90 kilodáltones
- IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer)
- KDM5C: Desmetilasa 5C específica de lisina
- mTOR: *mammalian Target of Rapamycin* (Diana de rapamicina en células de mamífero)
- PBRM1: Polibromo 1
- PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa
- PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensina
- pVHL: Proteína resultado de la traducción de VHL
- SETD2: Gen que codifica para una metiltransferasa selectiva de histona H3 nucleosomal que media la represión transcripcional.
- TC: Tejido tumoral
- TN: Tejido adyacente al tumor
- VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
- VHL: Gen de von-Hippel Lindau
- NCI: *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Cancerología de Estados Unidos)
- SEER: *The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program* (Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales).
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular)

2. Introducción

El carcinoma renal (CR) se encuentra entre las diez neoplasias malignas más prevalentes en el mundo. Los casos diagnosticados anualmente superan los 70,000 en los Estados Unidos y los 350,000 en todo el mundo (Jemal et al., 2011). Del total de los casos, 50 % cursan asintomáticos y el diagnóstico es incidental gracias a la amplia disponibilidad de estudios de imagenología. De manera menos frecuente, el diagnóstico también se puede realizar por “la triada clásica”, un conjunto de síntomas que incluyen hematuria macroscópica, dolor lumbar y una masa abdominal palpable (Zael et al., 2011). El creciente avance de los métodos de diagnóstico no invasivos ha traído consigo un incremento en las tasas de detección del cáncer renal en estadio localizado y aunque actualmente se detectan más tumores en estadios tempranos, la mortalidad del CR sigue siendo elevada (alrededor de 20 % a 25 %) (Zael et al., 2011).

Al momento del diagnóstico, hasta 30 % pueden tener enfermedad metastásica, 25 % se presentan con una enfermedad localmente avanzada y 45 % con enfermedad órgano-confinada. A pesar del tratamiento con nuevas terapias dirigidas e inmunitarias, los pacientes con CRcc metastásico aún tienen malos resultados con una mediana de supervivencia libre de progresión de 15.1 meses (Rini et al., 2019). El manejo del cáncer renal incluye vigilancia activa para pacientes mayores con comorbilidad, cirugía conservadora de nefronas o terapias ablativas para masas renales más pequeñas, nefrectomía radical para tumores más grandes y tratamiento sistémico con una combinación de inmunoterapias e inhibidores de tirosina cinasa para enfermedad metastásica (Janebdar et al., 2022).

El subtipo de CR de células claras (CRcc) constituye más del 70 % de los casos CR y presenta células tumorales con citoplasma claro cargado de lípidos. El desarrollo de CRcc está asociada a factores extrínsecos que incluyen tabaquismo, obesidad e hipertensión. Por parte de la genética molecular, las condiciones hereditarias como el síndrome de von Hippel-Lindau (VHL), la inactivación somática y esporádica del gen *VHL* y otros genes relacionados con la remodelación de la cromatina (*PBRM1*, *SETD2*), así como la sobre activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, se han asociado fuertemente con el CRcc (Brugarolas, 2014).

Por otro lado, las proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas y que participan en el plegamiento y correcto funcionamiento de más de 200 proteínas “cliente”. Existen cinco isoformas de Hsp90, pero solo dos de ellas son citosólicas, Hsp90 α y Hsp90 β (Li & Luo, 2022).

Hsp90 facilita las interacciones proteína-proteína y está involucrada en la señalización celular y respuesta al estrés. Las células cancerosas utilizan a la Hsp90 para proteger a las oncoproteínas mutadas de la degradación para asegurar su supervivencia y proliferación. Se ha visto que varias proteínas cliente de Hsp90 participan en vías de señalización importantes para la malignidad de varios tipos de cáncer (Li & Luo, 2022). En ausencia de supresores de tumor como VHL y PTEN, se sobre activa la vía PI3K/AKT/mTOR, aumentando la expresión de proteínas características del CRcc como HIF α (factor de transcripción) y AKT (proteína de señalización). Ambas son proteínas cliente de Hsp90 por lo que su papel en la célula cancerosa parecería ser el de proteger a aquellas proteínas que ayuden a su proliferación y supervivencia. En este estudio se explora la posibilidad de que los niveles de expresión de Hsp90 se relacionen con la expresión de las proteínas supresoras de tumor PTEN y VHL. Se consideró una cohorte de 94 pacientes diagnosticados con CRcc en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y a partir del tejido tumoral, obtenido por nefrectomía, se extrajeron proteínas totales y se obtuvieron los niveles de expresión de manera semi cuantitativa por Western Blot para su posterior correlación con variables clínicas (metástasis, progresión, sobrevida, tamaño tumoral y grado Fuhrman).

3. Marco teórico

3.1 Cáncer renal

El riñón es un órgano cuya función principal es filtrar y eliminar los desechos solubles en agua de la sangre en forma de orina y reabsorber agua, glucosa y electrolitos. El riñón es un órgano complejo que comprende una corteza renal externa y una médula renal interna. Las nefronas, las estructuras funcionales del riñón, abarcan la corteza y la médula. Una nefrona comprende anatómicamente el glomérulo, el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el conducto colector (Wallace, 1998).

El cáncer renal (CR) surge de diferentes partes de la nefrona y se clasifica según su morfología e histología. Cada subtipo histológico tiene características histopatológicas, genéticas y clínicas peculiares y cuya arquitectura va de benigna a maligna (**Tabla 1**):

Tabla 1. Clasificación histológica del carcinoma renal (Algaba et al., 2006; Quiroga Matamoros et al., 2016).

Tipo	Incidencia	Histología	Cambios de genética molecular asociados
Carcinoma de células caras	70 - 85 %	Citoplasma claro por el gran contenido en glucógeno y lípidos que se disuelven durante el procesamiento histológico. Ocasionalmente se pueden encontrar células con una mayor proporción de mitocondrias (aspecto eosinófilo o granular). Núcleos redondeados de características variadas según el grado de diferenciación. Origen: túbulo distal.	Identificados por la delección específica del cromosoma 3p y la mutación en el gen VHL. Otros cambios son la duplicación de la banda cromosómica 5q22 y la delección del cromosoma 6q, 8p, 9p y 14q.
Carcinoma renal papilar	7 - 15 %	Distribución de sus células alrededor de papilas en un 50 - 70 % del tumor. Los tipos celulares que recubren a las papilas son en un 73 % células basófilas (tipo 1), y un 42 % de células eosinófilas (tipo 2). Los de tipo 1 son muy poco agresivos, contrario a lo que ocurre en los de tipo 2 y las variantes sarcomatoides. El estroma puede ser fibroso o con aspecto edematoso, y se pueden hallar macrófagos espumosos, especialmente en tipo 1.	Las alteraciones genéticas más constantes son las trisomías de los cromosomas 3q, 7, 8, 12, 16, 17 y la pérdida del cromosoma Y.
Carcinoma renal de células cromóforas	5 - 10 %	Mayor tamaño celular, aspecto poliédrico con buena delimitación de la membrana citoplasmática (aspecto de célula vegetal) y abundante citoplasma reticular pálido por la presencia de vesículas que se tiñen con el hierro coloidal (tinción de Hale). Puede tener un citoplasma relativamente claro (subtipo de células claras) pero nunca tanto como el del CRcc o más eosinófilo (variante eosinófila), dependiendo de la cantidad de mitocondrias. Origen en célula intercalar de la nefrona distal.	La característica genética es una combinación de pérdida de los cromosomas 1, 2, 6, 10, 13 y 17.

Carcinoma de los conductos colectores de Bellini	<1 %	La OMS ha definido criterios para este subtipo. Criterios mayores: alto grado nuclear, citoplasma eosinófilo, patrón tubular acodado y presencia de células en "tachuela de bota", con marcada desmoplasia y en ausencia de carcinoma urotelial.	No reportados hasta ahora.
--	------	--	----------------------------

De manera adicional, se puede emplear el grado Fuhrman; un sistema utilizado para clasificar ciertos tipos de cáncer renal, incluidos el carcinoma renal de células claras y el carcinoma papilar. Se basa en las características microscópicas de las células tumorales, incluido el tamaño y forma de núcleo y la prominencia de los nucleolos. Por lo general, se espera un peor pronóstico en los pacientes con un grado Fuhrman alto (3 y 4) (**Tabla 2**) (Fuhrman et al., 1982).

Tabla 2. Clasificación del sistema de Fuhrman para el grado nuclear en CR (Fuhrman et al., 1982).

Grado	Tamaño del núcleo	Bordes del núcleo	Nucléolo
1	10 mm	Uniforme	Ausente incluso a 400x
2	15 mm	Irregular	Pequeños, visibles a 400x, pero no a 100x
3	20 mm	Irregular	Prominente a 100x
4	>20 mm	Multilobulado	Prominente, corpúsculos de cromatina

Como en cualquier cáncer, también se asigna una etapa clínica con base en los resultados de un examen físico, biopsia y estudios por imágenes (**Tabla 3**).

Tabla 3. Etapas clínicas del cáncer renal (sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)) (American Cancer Society, 2020).

Etapas	Agrupación por etapas	Descripción
I	T1 N0 M0	El tumor mide ≤ 7 cm de ancho y sólo se encuentra en el riñón (T1). Sin propagación a los ganglios linfáticos (N0) ni a otros órganos (M0).
	II	T2 N0 M0
T3 N0 M0		b) El tumor mide >10 cm de ancho, pero sigue limitado al riñón. No hay propagación a los ganglios linfáticos (N0) ni a órganos distantes (M0).
III	T1 a T3 N0 M0	El tumor principal puede ser de cualquier tamaño y puede estar en zonas adyacentes al riñón, pero sin afectar órganos adyacentes: a. El tumor sale hacia el tejido adiposo. b. Crece hacia la vena principal que sale del riñón.
	T4 N0 / N1 M0	El tumor crece fuera de la fascia Gerota y puede estar creciendo hacia la glándula suprarrenal encima del riñón (T4). Puede o no haber propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (N1 / N0). No hay propagación a los ganglios distantes ni a otros órganos (M0).
IV	T1 a T4 N0 / N1 M1	El tumor es de cualquier tamaño (cualquier T). Puede o no haberse propagado a los ganglios adyacentes (cualquier N). Hay propagación a los ganglios linfáticos distantes y/o a otros órganos (M1).

3.1.1. Carcinogénesis

El 91 % de los casos de Carcinoma Renal de células claras (CRcc) se debe a mutaciones somáticas, el 9 % restante de los casos son una consecuencia de una condición hereditaria llamada Síndrome de VHL. Las personas con este síndrome tienen una proteína supresora de tumor de VHL defectuosa. Estos defectos predisponen a padecer CRcc, hemangioblastomas del sistema nervioso central y feocromocitomas. El desarrollo tumoral es causado por la inactivación somática del alelo *wild type* restante en una célula susceptible en el 91 % de los casos de CRcc esporádico, mientras que la inactivación bialélica de VHL por hipermetilación se presenta del 5 – 10 % (Gossage et al., 2015).

Es bien sabido que la pérdida de heterocigosidad de *VHL* juega un papel fundamental en el desarrollo de CRcc pues se encuentra en el 98 % de los casos de CRcc (Gossage et al., 2015). Los análisis genómicos de muestras de tumores de múltiples regiones de pacientes con CRcc metastásico mostraron que la mutación de *VHL* y la pérdida de una copia de 3p eran omnipresentes en todas las regiones y tumores analizados. Aunque se sabe que en más del 90 % de los casos de CRcc esporádico se ha perdido al menos una copia de *VHL*, no es suficiente para la transformación maligna. Se han descrito muchas anomalías genómicas no aleatorias en el CRcc, como la amplificación del cromosoma 5q y la pérdida del 14q (Kim et al., 2021).

Además, el análisis de la secuencia genómica ha revelado una serie de genes que, de forma similar a *VHL*, mutan de forma recurrente en este tipo de cáncer, como lo son *PBRM1*, *SETD2* y *KDM5C*. Los genes *PBRM1* y *SETD2* se encuentran en el cromosoma 3p y, por lo tanto, se ven afectados en conjunto con *VHL* en los tumores que hayan sufrido grandes pérdidas del cromosoma 3p (Kim et al., 2021).

La pérdida de 3p como primer evento generalmente ocurre de 5 a 20 años antes del diagnóstico del tumor. Esto confiere la probabilidad de que la inactivación de *PBRM1* o *SETD2* también puedan ocurrir durante la tumorigénesis. En consecuencia, aunque *VHL* es el actor principal en la patobiología, es probable que estos grupos de supresores de tumor también estén involucrados (Kim et al., 2021).

3.1.2. Epidemiología, factores de riesgo, clasificación y diagnóstico

Epidemiología

En la última actualización del 2020, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) a través de su plataforma Globocan, reportó 431,288 nuevos casos de cáncer renal a nivel mundial, ocupando el 9° lugar en incidencia. La incidencia es mayor en Asia (36.3 % de los casos), seguido de Europa (32.1 %) y América del Norte (17.8 %). En México, se reporta una incidencia de 5,925 nuevos casos (Globocan, 2020). El CR tiene la tasa de mortalidad más alta de los cánceres urológicos (tasa de supervivencia global a 10 años del 50 %) pues se reportaron 179,368 muertes a nivel mundial, de las cuales, 3,083 corresponden a México (Globocan, 2020).

La tasa de supervivencia depende en gran medida del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Los pacientes diagnosticados en una etapa temprana de la enfermedad tienen una tasa de supervivencia a 5 años del 87 %, mientras que los pacientes diagnosticados con enfermedad en etapa tardía tienen una tasa de supervivencia del 12 % (Janebdar et al., 2022).

Factores de riesgo

Factores controlables (American Cancer Society, 2020).

- *Tabaquismo.*
- *Sobrepeso.*
- *Exposición a sustancias cancerígenas como el tricloroetileno.*
- *Consumo excesivo de medicamentos como el acetaminofeno.*

Factores no controlables (American Cancer Society, 2020).

- *Sexo:* mayor incidencia en hombres que en mujeres (2 : 1).
- *Raza:* los estadounidenses de raza negra presentan un índice levemente mayor de CRcc. Las razones se desconocen hasta ahora.
- *Enfermedad renal avanzada:* especialmente aquellas que requieren diálisis.
- *Condiciones hereditarias.* Entre el 2 % y el 4 % de los cánceres renales son hereditarios, a continuación, se mencionan algunos:

Enfermedad de von Hippel-Lindau: Enfermedad autosómica dominante causada por una mutación en el gen *VHL* (supresor de tumores) en el cromosoma 3. El 50 % de los pacientes con esta enfermedad, desarrollará CRcc, especialmente a una edad más temprana. También podrían presentar tumores benignos en ojos, cerebro, médula

espinal, páncreas, y otros órganos; así como un tipo de tumor de las glándulas suprarrenales llamado feocromocitoma (American Cancer Society, 2020).

Carcinoma renal papilar hereditario: Padecimiento autosómico dominante causado por mutaciones en el gen *MET* en el cromosoma 7 que produce una tendencia a desarrollar uno o más CR papilar, pero no hay desarrollo tumoral en otros sitios. Este gen codifica para una proteína MET, involucrada en la señalización y crecimiento celular. Cuando la proteína está defectuosa, se da la proliferación celular excesiva (American Cancer Society, 2020).

Carcinoma renal asociado a leiomiomatosis hereditaria: desarrollo de tumores de músculo liso (leiomiomas), de la piel y útero, y un mayor riesgo de desarrollar CR. Ha sido asociado con cambios en el gen *FH* (American Cancer Society, 2020).

Síndrome de Birt-Hogg-Dube (BHD): desarrollo de muchos tumores pequeños y benignos de la piel. Las personas que lo padecen presentan un mayor riesgo de diferentes tipos de tumores renales. Gen relacionado: *FLCN* (American Cancer Society, 2020).

Cáncer renal familiar: desarrollo de tumores llamados paragangliomas de la región de la cabeza y el cuello, y cánceres de tiroides. Estas personas también tienden a padecer cáncer de riñón bilateral antes de los 40 años. Este cáncer es causado por defectos en los genes *SDHB* y *SDHD* (American Cancer Society, 2020).

Síndrome de Cowden: alto riesgo de cáncer de seno, tiroides y riñón. Asociado con cambios en el gen *PTEN* (American Cancer Society, 2020).

Esclerosis tuberosa: desarrollo de muchos tumores, generalmente benignos, en diferentes partes del cuerpo como piel, cerebro, pulmones, ojos, riñones y corazón. Aunque los tumores de riñón suelen ser benignos, en ocasiones pueden ser CRcc. Causado por defectos en los genes *TSC1* y *TSC2* (American Cancer Society, 2020).

Tener un estilo de vida saludable, controlar el peso, la presión arterial y dejar de fumar puede contribuir a disminuir el riesgo de padecer cáncer renal. En el caso de los padecimientos hereditarios, se recomienda vigilancia periódica.

Diagnóstico

La gran mayoría del CR en etapas iniciales son asintomáticos, no palpables, y se detectan incidentalmente hasta las últimas fases de la enfermedad. La triada clásica (dolor en fosa renal, hematuria macroscópica y masa abdominal palpable), la cual se presenta en el 6 al 10 % de los casos, también puede ser útil en la orientación del diagnóstico (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013).

En caso de sospecha de CR, se recomienda realizar una radiografía simple de tórax, o tomografía axial computarizada (TAC) abdominal o torácica, resonancia magnética (RM) u otros estudios radiológicos considerando la posibilidad de envío a valoración por especialista en urología. El diagnóstico confirmatorio de CR es a través del estudio histopatológico de la pieza quirúrgica o por biopsia en casos seleccionados (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013).

Otras pruebas de laboratorio que deberán realizarse con fines de complementación diagnóstica, estadificación y plan de tratamiento son: biometría hemática, pruebas funcionales hepáticas, deshidrogenasa láctica (DHL), urianálisis, fosfatasa alcalina, calcio, magnesio, RM cerebral en casos clínicamente indicados, gammagrama óseo en casos de sospecha de metástasis óseas, depuración de creatinina en orina de 24h en casos seleccionados con sospecha o falla renal (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013).

Sobrevida global

La Sociedad Americana Contra el Cáncer obtiene la información de la base de datos del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER), mantenida por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), para proporcionar estadísticas de supervivencia. La base de datos del SEER lleva un registro de las tasas relativas de supervivencia a 5 años para el CR en los Estados Unidos, basándose en cuán lejos se ha propagado el cáncer (**Tabla 4**):

Tabla 4. Tasas relativas de supervivencia a 5 años de pacientes de CR (periodo 2009 a 2015) según SEER (American Cancer Society, 2021).

Etapa SEER	Características	Tasa relativa de supervivencia a 5 años
Localizado	No hay señal de que el cáncer se haya propagado fuera del riñón.	93 %
Regional	El cáncer se ha propagado fuera del riñón hacia las estructuras o los ganglios linfáticos que se encuentran en la proximidad.	70 %
Distante	El cáncer se ha propagado a partes del cuerpo distantes, como pulmones, cerebro, huesos.	12 %
Todas las etapas SEER combinadas		75 %

Seguimiento

Vigilancia con imagenología en forma seriada. Pacientes en etapa I a III que recibieron tratamiento quirúrgico parcial o radical se recomienda realizar lo siguiente a partir de los 3 meses posteriores al tratamiento inicial y durante 6 años:

- Estudios sanguíneos y perfil metabólico.
- Ultrasonido abdominal con enfoque renal, o tomografía computarizada.
- Radiografía de tórax.

Cita cada 6 meses con evaluación clínica y realización de pruebas de laboratorio y gabinete (Jiménez Ríos et al., 2010).

3.2. Terapéutica del CRcc

El tratamiento recomendado del CR depende de una variedad de factores tales como: tamaño y localización del tumor, diseminación, función renal, comorbilidades y estado funcional del paciente (**Tabla 5**). El tratamiento quirúrgico (nefrectomía parcial o total) es la única opción de tratamiento curativo.

Tabla 5. Tratamiento empleado en pacientes de cáncer renal, según el estadio clínico (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2013).

Etapas	Agrupación por etapas	Descripción
I	A. <4 cm limitado al riñón	Resección quirúrgica: nefrectomía parcial nefropreservadora. La nefrectomía radical será en casos de dificultad técnica o localización tumoral central. En pacientes no candidatos a cirugía, la ablación térmica está indicada. La suprarrenalectomía junto con nefrectomía se recomienda solo si hay un tumor grande en el polo superior y sea probable la invasión directa de la glándula suprarrenal o cuando no pueda descartarse una glándula suprarrenal normal. La linfadenectomía regional es opcional en enfermedad N0M0, considerar en pacientes N1M1.
	B. >4 cm, pero <7 cm limitado al riñón	Nefrectomía parcial o radical. No debe practicarse una nefrectomía radical laparoscópica en los pacientes con tumores T1 en los que está indicada una resección parcial.
II	A. (>7 cm, pero <10 cm)	La nefrectomía radical abierta o laparoscópica es la alternativa de elección, puede realizarse de forma segura en tumores grandes (mayores de 7 cm).
	B. (>10 cm)	
III	Tumores que ya no se limitan al riñón	La nefrectomía radical incluye una resección perifascial del riñón, resección de grasa perirrenal, linfadenectomía regional y adrenalectomía ipsilateral.
IV	Cualquier tamaño	-Tumor aislado potencialmente resecable con metástasis aislable: nefrectomía y metastasectomía quirúrgica.
	Cualquier N M1	-Tumor primario potencialmente resecable con múltiples metástasis: nefrectomía citoreductora en pacientes seleccionados antes de la terapia sistémica. -Tumor no resecable: quimioterapia según el tipo celular. La Asociación Europea de Urología emite las siguientes recomendaciones para la terapia sistémica en cáncer renal de células claras: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sunitinib en 1° línea en pacientes con riesgo bajo e intermedio ➤ Bevacizumab + IFN a en 1° línea en pacientes con riesgo bajo e intermedio

-
- Sorafenib como 2º línea posterior a falla a citocinas Pazopanib como 1º línea y en 2º línea posterior a falla a citocinas
 - Temsirolimus en 1º línea en pacientes con riesgo alto
Everolimus en 2º línea después de falla a inhibidores de tirosin cinasa
-

Terapias alternativas

Crioablación.

Indicado para:

- Pacientes con etapa 1.
- Lesiones de pacientes no candidatos a cirugía.
- Antes de las técnicas ablativas debe de contar con biopsia.

Las técnicas de ablación térmica están asociadas con alta tasa de recurrencia local en comparación con la cirugía convencional (Jiménez Ríos et al., 2010).

Radioterapia.

No existe evidencia de efecto favorable, sin embargo, puede ser utilizada como tratamiento paliativo en pacientes sintomáticos con metástasis cerebrales u óseas o en pacientes sintomáticos que no respondan a manejo sistémico. Usada para controlar hemorragia y dolor del tumor primario, aliviar los síntomas de las metástasis y control de las metástasis cerebrales (Jiménez Ríos et al., 2010).

3.2.1. Biomarcadores en CRcc

El Instituto Nacional de Cancerología (INCan), define biomarcador como: "una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es un signo de un proceso normal o anormal, o de una afección o enfermedad". Se puede usar un biomarcador para ver cómo responde el cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección, también llamado marcador molecular y "firma molecular".

En la investigación y la medicina del cáncer, los biomarcadores se utilizan de tres maneras principales:

- Diagnóstico de afecciones, como en el caso de la identificación de cánceres en etapa temprana.
- Pronóstico de cuán agresiva está siendo una afección.
- Predicción del cómo responderá un paciente al tratamiento.

Biomarcadores de imagen

Permiten identificar de manera no invasiva la histología de una masa renal y pueden ayudar a predecir posibles respuestas al tratamiento mediante la identificación de características moleculares.

Imágenes moleculares

Las técnicas de imagen de tomografía por emisión de positrones (PET) que utilizan varios trazadores se han estudiado como biomarcadores pronósticos y predictivos de CRcc. Los nuevos biomarcadores de imágenes moleculares aprovechan la sobreexpresión patológica de componentes celulares específicos de varios subtipos de CR y pueden permitir la caracterización no invasiva de estos subtipos y la diferenciación de masas renales benignas de malignas. Además, la PET se puede utilizar para predecir y controlar la respuesta a la terapia dirigida sistémica en pacientes con enfermedad avanzada. Uno de los biomarcadores de imágenes explorados más recientemente es la anhidrasa carbónica IX (CA-IX), una proteína que se sobre expresa en las vías mutadas de VHL, como CRcc, pero se expresa poco en el parénquima renal normal y no CRcc. Se puede detectar con yodo-124-cG250, un anticuerpo monoclonal que ha mostrado una sensibilidad promedio de 86.2 % y una especificidad promedio de 85.9 % en un ensayo REDECT (*Renal Masses: Pivotal Study to detect Clear Cell Renal Cell Carcinoma With Pre-Surgical PET/CT*) fase III (Farber et al., 2017).

Biomarcadores en orina

Dos biomarcadores urinarios que se han mostrado prometedores son las proteínas exosómicas acuaporina-1 (AQP-1) y perilipina-2 (PLIN2). En un estudio con 36 pacientes con CRcc / CRp, se encontró que, en comparación con los controles, presentan niveles 23 y 4 veces mayores de AQP1 y PLIN2, respectivamente. Estos niveles de AQP1 y PLIN2 disminuyeron en más del 80 % después de la nefrectomía, lo que sugiere que estos biomarcadores urinarios pueden tener relevancia diagnóstica en pacientes con CR (Farber et al., 2017; Morrissey et al., 2015).

Biomarcadores séricos

Las citocinas y factores angiogénicos (CAF) son un área de investigación prometedora con el potencial de identificar biomarcadores clínicamente significativos y fáciles de obtener. Los biomarcadores de biopsia líquida con ADN tumoral circulante (ctDNA) también son áreas de investigación activa. En un estudio donde se recolectaron ctDNA de 224 pacientes con CR metastásico, se encontró que los pacientes que recibieron terapia de segunda línea y que previamente recibieron terapia de primera línea dirigida a VEGF, tenían marcadas diferencias en p53 y mTOR en comparación con los

pacientes que solo recibieron tratamiento de primera línea, pudiendo ser una herramienta útil para detectar la respuesta a la terapia (Farber et al., 2017; Pal et al., 2017).

Otro biomarcador es VEGF, donde se espera una regulación positiva de ARNm debido a la desregulación de HIF1 α . Se ha visto que una sobre expresión de VEGF y HIF1 α se correlacionan con CRcc más agresivo y un mal pronóstico tanto en casos de cáncer localizado como metastásico (McGuire & Fitzpatrick, 2009).

La interleucina 6 (IL-6) es otro biomarcador prometedor, ya que existe evidencia de que es secretada por las células de CR en hipoxia. Mediante datos de estudios de fase II y III usando pazopanib como tratamiento de segunda línea, se hizo un análisis de biomarcadores prospectivos y se determinaron que los niveles séricos bajos del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-6 e IL-8, se correlacionan con una mayor reducción del tamaño del tumor (Farber et al., 2017; Tran et al., 2012).

Biomarcadores tisulares

La tinción de H&E permite la diferenciación entre subtipos histológicos de CR, además, se ha observado que la diferenciación sarcomatoide en los pacientes de CRcc ocurre en el 10 - 15 % de los casos y se asocia con un peor pronóstico (Farber et al., 2017). La inmunohistoquímica (IHQ) puede aportar información sobre el tumor más allá de la clasificación histológica. La mayoría de las neoplasias renales expresan factores de transcripción PAX8 y PAX2, por lo que pueden utilizarse como marcadores útiles para ayudar a identificar las lesiones metastásicas de origen renal. PAX2 ha demostrado ser menos sensible que PAX8, aunque es más específico (Shen et al., 2012). Otro marcador usado en IHQ es la vimentina, la tinción se usa más para lesiones mesenquimatosas, pero CRcc y CRp son algunos carcinomas que también la expresan, por lo que puede ayudar en la diferenciación de CRc y oncocitomas, que generalmente se tiñen negativamente (Farber et al., 2017; Shen et al., 2012).

Otro biomarcador tisular es la anhidrasa carbónica IX (CAIX), una proteína transmembrana regulada por HIF1 α asociada con el crecimiento tumoral en varios cánceres. Regula el pH intracelular y extracelular en respuesta a la hipoxia tumoral. Sin embargo, en CRcc, se encuentra sobre expresada por la inactivación de VHL que resulta en la acumulación de HIF1 α . Se ha demostrado que los niveles bajos de tinción por IHQ de CAIX son un indicador independiente de supervivencia pobre en pacientes metastásicos, y para los pacientes con lesiones localizadas de alto riesgo, una tinción baja de CAIX implicaba un peor pronóstico y una menor supervivencia específica de la enfermedad (McGuire & Fitzpatrick, 2009).

Biomarcadores moleculares y genéticos

Aunque la mayoría de los casos de CRcc es esporádico, es bien sabido que puede ser consecuencia del síndrome de VHL, por lo que las pruebas para detectar esta mutación son de rutina. La pérdida de la heterocigosidad del cromosoma 3p (entre 3p25 y 3p21) se ha observado en más del 90 % de los casos de CRcc. Como resultado, se tienen mutaciones en genes como *VHL*, *PBRM1*, *BAP1* y *SETD2*. Mientras que *VHL* se encuentra inactivado por mutaciones o metilación, los otros genes mencionados están mutados la mayoría de las veces. Estas mutaciones esporádicas han comenzado a estudiarse para encontrar las más frecuentes y poder implementar su identificación en la práctica clínica (Gossage et al., 2015).

3.3. Genética y biología molecular del CRcc

El consorcio de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) analizó más de 400 tumores de pacientes histológicamente confirmados con el objetivo de identificar los genes que se encuentran más frecuentemente mutados en CRcc (**Tabla 6**). Los cambios genéticos subyacentes al CRcc incluyen alteraciones en genes que controlan la detección de oxígeno celular (como *VHL*) y el mantenimiento de la cromatina (como *PBRM1*). Los elementos de la vía PI3K/AKT se encuentran mutados de forma recurrente en estos pacientes, por lo que parece un objetivo terapéutico potencial (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Tabla 6. Genes más frecuentemente mutados en CRcc, obtenidos de un estudio de elaborado por TCGA (Brugarolas, 2014).

Genes	% Tumores con mutación
VHL	52.3 %
PBRM1	32.9 %
SETD2	11.5 %
BAP1	10.1 %
KDM5C	6.7 %
MTOR	6.0 %
PTEN	4.3 %
PIK3CA	2.9 %
TP53	2.2 %
TCEB1	0.7 %

El gen de von Hippel-Lindau (*VHL*) encabeza la lista y suele estar inactivado por metilación o por mutación en más del 80 % de los casos de CRcc. *VHL* fue originalmente identificado como el gen responsable de un síndrome que predispone al paciente a desarrollar CRcc; el síndrome de von Hippel-Lindau. *VHL* es un gen supresor de tumor de dos hits y, típicamente, un alelo es inactivado a través de una mutación intragénica y el segundo es eliminado como parte de una deleción. El gen *VHL* se encuentra en el cromosoma 3p25.3 y deleciones en esta región, que en algunas ocasiones involucran la pérdida de todo el brazo corto del cromosoma 3, son observadas en aproximadamente el 90 % de los casos de CRcc. Algunas mutaciones de *VHL* se encuentran sin la deleción de 3p. Sin embargo, alguna deleción pudo ocurrir, acompañada de una duplicación de región cromosómica restante, resultando en la pérdida de la heterocigosidad (Brugarolas, 2014).

Los genes *PBRM1*, *SETD2* y *BAP1* también se ubican en 3p, por lo que era de esperarse que ocuparan del segundo al cuarto lugar de la lista. Estos tres genes están involucrados en el arreglo de la cromatina y se han relacionado las mutaciones en *BAP1* con mayor agresividad en comparación con los pacientes que presentan mutación en *PBRM1* (Brugarolas, 2014). En séptimo lugar, se encuentra el gen *PTEN*, un supresor de tumor que presenta mutaciones de pérdida de función, lo cual conlleva al aumento de los niveles de PIP3 y la activación de vías que favorecerían el desarrollo tumoral (Brugarolas, 2014). Debido a su posición en la lista elaborada por TCGA y a la relación entre los supresores de tumor *VHL* y *PTEN* en vías de señalización es que se propone su estudio en conjunto.

3.3.1. Gen von Hippel-Lindau (*VHL*)

Supresor de tumor ubicado en 3p25–26, este gen codifica para dos isoformas, una de 213 aminoácidos (30 kDa) nombrada pVHL30 y otra de 160 aminoácidos (19 kDa) nombrada pVHL19. Se ha demostrado que ambas isoformas tienen las mismas funciones (Gossage et al., 2015).

El síndrome de *VHL* es una enfermedad hereditaria autosómica dominante que se asocia con diferentes tumores, incluidos el CRcc. Los pacientes con este síndrome portan un alelo del gen *VHL* mutado y el desarrollo tumoral depende de la pérdida o la inactivación espontánea del alelo normal. Existe evidencia de que el gen *VHL* es un supresor de tumor gracias a que en diferentes estudios de pérdida de la heterocigosidad se demostró que la inactivación de ambos alelos de *VHL* es un evento crucial en el desarrollo de neoplasias tanto en el síndrome de *VHL* como en CRcc esporádico no hereditario (Gossage et al., 2015).

La proteína pVHL forma parte de un complejo con elongina C y B, así como la proteína RBX1, denominado complejo VCB-CR. El complejo es muy estable y resiste a la degradación proteasomal, a diferencia de los complejos formados con pVHL mutante que son degradados rápidamente. Tiene la función de poliubiquitar proteínas para su degradación proteasomal, principalmente al factor inducible por hipoxia alfa, el cual tiene dos subtipos expresados en riñón: HIF1 α y HIF2 α . El extremo carboxilo terminal de HIF α se une al dominio β de pVHL, es poliubiquitado y degradado vía proteasomal. Para que esta unión se lleve a cabo, se requiere que HIF α sea hidroxilado por las prolil hidroxilasas (PDH1, PDH2 y PDH3) en dos residuos conservados de prolina, este proceso es dependiente de oxígeno ya que estas enzimas lo emplean como co-sustrato. En condiciones de hipoxia o con pVHL mutado, HIF α se acumula en citoplasma, forma heterodímeros con HIF β y se transloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HREs). Actualmente, se conoce que los genes diana de HIF son >800, la mayoría involucrados con la adaptación a la hipoxia, promoviendo la tumorigénesis en casos de normoxia con pVHL mutado (Gossage et al., 2015).

Aunque la inactivación inicial de VHL conduce a la expresión y acumulación de HIF-1 α y HIF-2 α , con el tiempo, HIF-2 α es predominante y suprime HIF-1 α a nivel de proteína. De hecho, se ha visto que la formación de quistes y tumores renales se evita con la inactivación de HIF-1 α y HIF-2 α en ratones con deficiencia de VHL, lo que indica su participación compartida durante las etapas iniciales del desarrollo de CRcc, mientras que solo la isoforma HIF-1 α fue evidente en las células tubulares normales. Estos hallazgos sugieren que el inicio de la expresión de HIF-2 α se produce tras la pérdida de función de pVHL y actúa como desencadenante de la transformación de las células epiteliales tubulares. Un polimorfismo relacionado con HIF-2 α , de hecho, se identificó como un factor de riesgo de CRcc en un estudio de asociación del genoma completo (Mazumder et al., 2023).

En un estudio realizado en neuroblastoma, se demostró que la actividad de las isoformas de HIF- α es específica del contexto celular donde HIF-1 α se acumula y funciona durante la respuesta inicial (2 - 24 h) a la hipoxia aguda, que disminuye rápidamente con la exposición prolongada mientras que HIF-2 α predomina en condiciones hipóxicas crónicas (> 24 h), lo que resulta en un cambio de actividad de HIF-1 α a HIF-2 α . Un fenómeno similar tiene lugar durante la progresión de CRcc, donde HIF-2 α finalmente predomina sobre HIF-1 α para promover el crecimiento tumoral y la metástasis (Holmquist-Mengelbier et al., 2006).

El 91 % de los casos de CRcc se debe a mutaciones somáticas, de las cuáles, 55 % involucran un cambio en el marco de lectura o son mutaciones con cambio de sentido. Cerca de 250 mutaciones con cambio de sentido se han descrito en este tipo de cáncer. Es muy probable que las mutaciones de cambio en el marco de lectura y sin sentido den como resultado la pérdida de función de pVHL, mientras que las mutaciones de cambio de sentido tienen efectos diversos. (Gossage et al., 2015). Desde 1993 hasta 2010, *VHL* fue el único gen que se sabía que mutaba con frecuencia en CRcc por lo que su estudio como biomarcador parecía prometedor, sin embargo, hasta el momento no hay suficiente evidencia de que la presencia o ausencia de mutaciones de *VHL* influyan en el desenlace clínico del CRcc (Gossage et al., 2015). El conocimiento de la implicación de este gen en la carcinogénesis del CRcc ha permitido el tratamiento de pacientes metastásicos con fármacos contra elementos de la vía VHL/HIF/VEGF como los inhibidores de tirosina VEGF (sunitinib, sorafenib), inhibidores de la vía mTOR (temsirolimus, everolimus) y el anticuerpo monoclonal anti VEGF bevacizumab (Gossage et al., 2015).

3.3.2. Vía de señalización VHL/HIF1 α /VEGF

El principal sustrato de VHL es HIF α , el cual juega un papel fundamental en la respuesta celular a la hipoxia. Se identificó por primera vez como un factor de transcripción activado por hipoxia que se une al potenciador del gen de la eritropoyetina humana en condiciones de bajo nivel de oxígeno. Se trata de un heterodímero formado por una subunidad α y una β . Se han identificado tres subtipos: HIF1, HIF2 y HIF3. Los residuos de prolina (P402 y P564) de HIF1 α y HIF2 α son hidroxilados por las prolin hidroxilasas. Se requiere de O₂ como co-sustrato en este proceso, por lo que la hidroxilación ocurre bajo condiciones de normoxia. VHL forma parte del complejo ubiquitina ligasa, el cual tiene la capacidad de marcar proteínas, como HIF1 α hidroxilada, con ubiquitinas para ser degradada vía proteasoma 26S (Kim et al., 2021).

En condiciones de hipoxia y de CRcc con VHL mutado, HIF1 α es estable, se acumula y se transloca al núcleo para unirse a elementos de respuesta a hipoxia del DNA. Finalmente, varios genes relacionados con el metabolismo energético celular y la angiogénesis son transcritos y expresados (**Figura 1**). Un ejemplo bien estudiado es el de VEGF, el cual está sobre expresado en CRcc, teniendo efectos pro-tumorigénicos y facilitando el desarrollo vascular de tumores al estimular la señalización de VEGFR-2/JAK2/STAT3 (Kim et al., 2021).

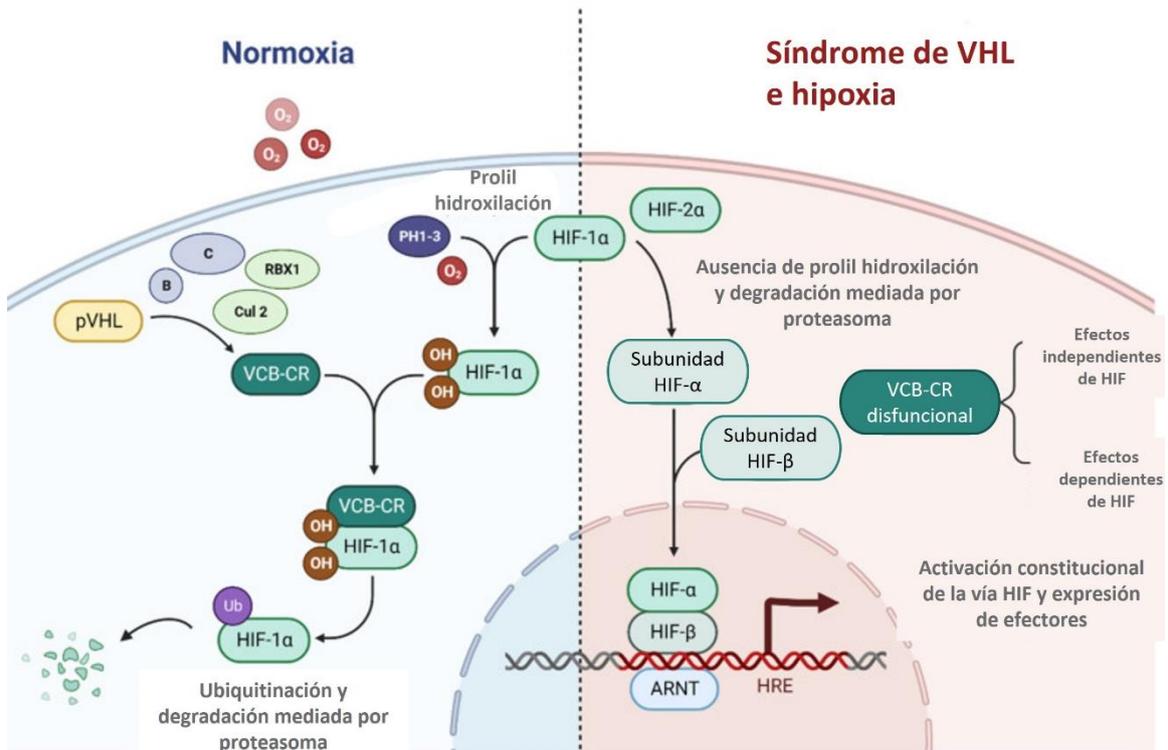


Figura 1. Vía VHL/HIF1 α /VEGF en normoxia, síndrome de VHL e hipoxia, adaptada de Cinque et al., 2022. VCB-CR: Complejo formado por las proteínas elongina B y C, RBX1 (*RING Box protein 1*), Cul 2 (*Cullin-2*) y VHL. PDH1-3: proil hidroxilasas.

Además de la regulación mediada por pVHL dependiente de oxígeno de las subunidades HIF- α , varios mecanismos independientes de pVHL y de oxígeno contribuyen al cambio de HIF. El receptor de la proteína cinasa C activada (RACK1) compite con la proteína de choque térmico de 90kDa (Hsp90) por unirse a HIF-1 α (que de otro modo lo estabiliza), promoviendo así su ubiquitinación y degradación al reclutar a Elongina C. El factor 2 similar a Kruppel (KLF2) también promueve la degradación de HIF-1 α independiente de p53 y pVHL, pero dependiente de proteasoma. No se ha demostrado que esto se deba a que compite con Hsp90 como es el caso de RACK1 (Mazumder et al., 2023).

3.3.3. Gen Homólogo de Fosfatasa y Tensina (PTEN)

PTEN está codificado en el cromosoma 10q23, una región donde la pérdida de la heterocigosidad ocurre con frecuencia en varios tipos de cáncer. La proteína codificada por *PTEN* contiene 403 aminoácidos en los que la región amino terminal comparte homología de secuencia con la proteína TENSIN y la proteína tirosina fosfatasa AUXILIN. Es una fosfatasa dual con actividad en el metabolismo de proteínas y lípidos (Chen et al., 2018).

Es un regulador negativo de una importante vía de señalización y crecimiento celular, la de PI3K/AKT. Como lípido fosfatasa se encarga de desfosforilar al fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en la posición 3' y lo vuelve a convertir en PIP2. Esta acción antagoniza la actividad de PI3K que agrega un grupo fosfato en la misma posición al PIP2. PIP3 se une al dominio de homología pleckstrina (PH) de las proteínas río abajo, proporciona un residuo lipídico y las recluta a la membrana plasmática. AKT es uno de los objetivos mejor caracterizados de PI3K. La acumulación de PIP3 permite el reclutamiento de AKT a la membrana a través de la interacción directa con su dominio PH, donde es fosforilada por las cinasas PDK1 y mTORC2 para su activación completa. AKT tiene muchos blancos río abajo que fosforila y que están implicados en el crecimiento, la supervivencia celular y el metabolismo (**Figura 2**) (Chen et al., 2018).

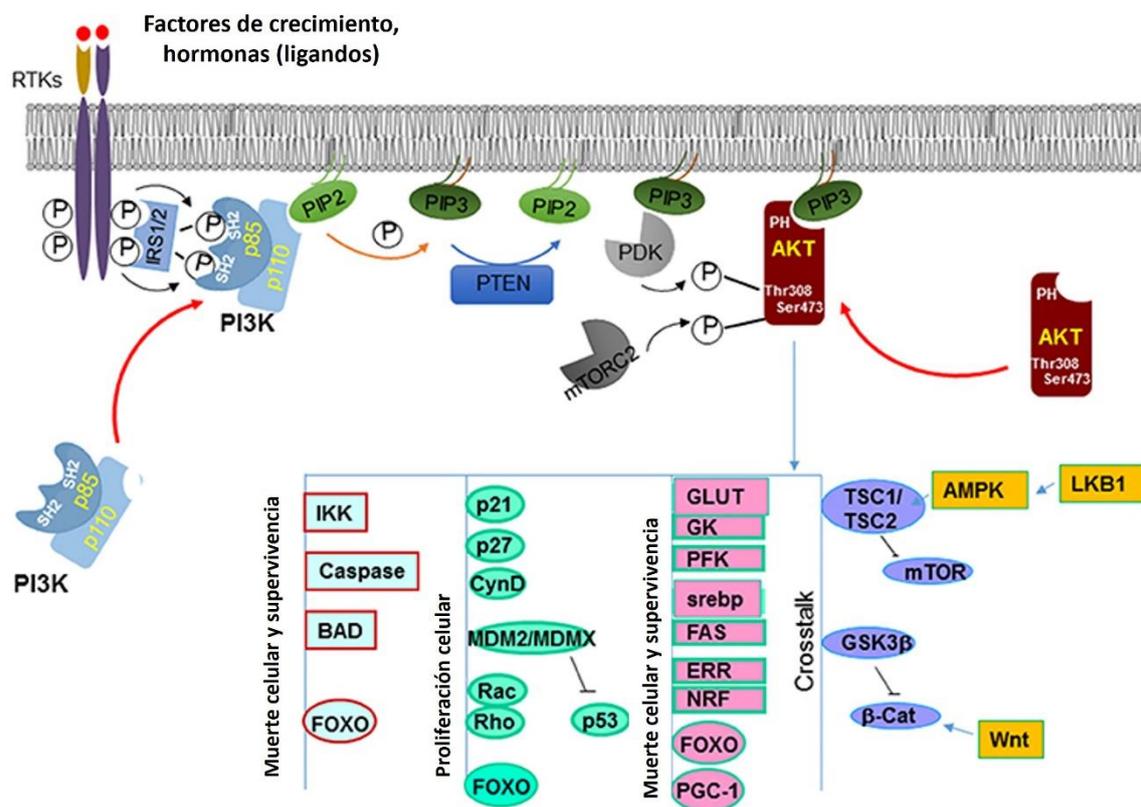


Figura 2: Señales canónicas reguladas por PTEN. Juntas, estas moléculas están implicadas en el crecimiento y la supervivencia celular, el metabolismo y la diáfonía con otras vías de señalización. Modificada de Chen et al., 2018.

La fosforilación por AKT regula la función de muchas moléculas que son importantes para múltiples procesos celulares, por ejemplo, la fosforilación de factores proapoptóticos BAD, caspasa 3 y caspasa 9 los vuelve inactivos y se promueve la supervivencia celular. La fosforilación de p21 conduce a su exclusión nuclear permitiendo la proliferación celular. Otro sustrato de AKT es el complejo de esclerosis tuberosa TSC1/2. El heterodímero de TSC1 y TSC2 es esencial para suprimir la

función de mTOR. La actividad de TSC2 se inhibe cuando AKT la fosforila, induciendo la actividad de mTOR, produciendo cambios metabólicos importantes y promoviendo la supervivencia celular (Chen et al., 2018).

Hasta hace poco tiempo se sabía que la localización de PTEN era citoplasmática gracias a una señal de localización en el extremo N del residuo 19 a 25, sin embargo, se han identificado mutaciones en estos residuos que conducen a una mayor localización nuclear. Estudios sugieren que la ubiquitinación controla el transporte de PTEN entre el citosol y el núcleo. Hasta ahora se ha propuesto que la monoubiquitinación conduce al transporte nuclear y la poliubiquitinación a su degradación, pero aún es controversial. Se ha visto que PTEN nuclear es más estable y capaz de inhibir a AKT, además de exhibir otras funciones importantes como contribuir en la estabilidad cromosómica, la reparación del DNA y la regulación del ciclo celular (Chen et al., 2018).

Según datos del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) hasta el 5 % de los pacientes con CRcc presentan mutaciones en PTEN. En un estudio, se encontró que los pacientes con CRcc con mutaciones en PTEN tienen un pronóstico significativamente peor en cuanto a supervivencia y recurrencia de la enfermedad (Fan et al., 2019).

La pérdida de PTEN se ha visto asociada con la resistencia a fármacos inhibidores de tirosina cinasas. La expresión negativa de PTEN en diferentes estudios, determinada por inmunohistoquímica, se correlaciona con una pobre supervivencia libre de progresión en pacientes metastásicos tratados con sunitinib (Sekino et al., 2020).

Por otro lado, el ensayo RECORD-3 (*REnal Cell cancer treatment with Oral with RAD001 given Daily*) es un ensayo aleatorizado de fase IIb que comparó los resultados al administrar everolimus y sunitinib como terapia de primera línea, y la secuencia de everolimus seguida de sunitinib en la progresión de pacientes de CR. En este ensayo se encontró que la expresión negativa de PTEN (IHQ) no está asociada con la respuesta al tratamiento cuando se trata de sunitinib. Es por ello que el valor predictivo de PTEN con respecto a la respuesta al tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa aún es controversial, sin embargo, parece ser un biomarcador y objetivo terapéutico prometedor en pacientes con CR metastásico (Sekino et al., 2020).

3.3.4. Vía de señalización PTEN/AKT/mTOR

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR (**Figura 3**) es clave para el control del crecimiento celular, la diferenciación, migración, supervivencia, angiogénesis y el metabolismo, y comúnmente está desregulada en varias neoplasias malignas, incluido el CRcc. La hiperactividad de la señalización de mTOR se observa con frecuencia en CRcc deficiente en VHL y se relaciona con un fenotipo tumoral agresivo y una supervivencia pobre (Mazumder et al., 2023).

Las fosfatidilinositol 3 cinasas (PI3K) son una familia de cinasas que fosforilan un componente de la membrana celular, el fosfatidilinositol. Los factores de crecimiento (como VEGF y EGF), las citocinas y las hormonas se unen a los receptores de tirosina cinasa (RTK) y a los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y activan a PI3K. En la membrana intracelular, PI3K fosforila al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), resultando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). El homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) funge como regulador negativo de PI3K al desfosforilar a PIP3 en PIP2. AKT es activada por dos procesos de fosforilación: la proteína cinasa dependiente de fosfoinositido 1 (PDK1) fosforila a AKT en la treonina 308, mientras que el complejo mTORC2 fosforila la serina 473 (Miricescu et al., 2021).

mTOR es un componente de la vía de señalización de AKT que promueve el crecimiento y proliferación celular. Se activa en diversos procesos patológicos como la formación de tumores y la angiogénesis, mostrándose sobreexpresada en CRcc. (**Figura 3**). Se trata de una serina treonina cinasa que pertenece a la familia de las cinasas PI3K. Existen dos complejos multiploteicos: mTORC1 y mTORC2. Fosfo-mTORC1, la forma activa de mTORC1, juega un papel fundamental en la traducción de proteínas y la síntesis de lípidos o nucleótidos mediante la activación de la cinasa S6 ribosomal p70 (p70S6K) y la proteína de unión al factor de iniciación eucariota (4EBP), las cuales regulan al alza a ciclina D1, VEGF, FGF y de manera interesante, a HIF-1 α , retroalimentando de manera positiva la vía (Miricescu et al., 2021).

La hiperactividad de mTOR puede ocurrir a través de mecanismos como la sobre activación de factores de crecimiento, mutaciones en la vía de señalización PI3K/AKT, disminución de la expresión de TSC1/2, supresión epigenética de PTEN y la inactivación del gen VHL. De acuerdo con los datos en CRcc que reporta *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA), el 28 % de los casos muestran alteraciones en esta vía. Las mutaciones de PTEN se presentan en un 6 % y la delección de PTEN un 5 %. Aunque la mutación de PTEN es rara en este subtipo de CR, la mayoría de los CRcc muestran una baja expresión. Su regulación a la baja está correlacionada con un grado tumoral mayor y mal pronóstico (Tumkur Sitaram et al., 2021).

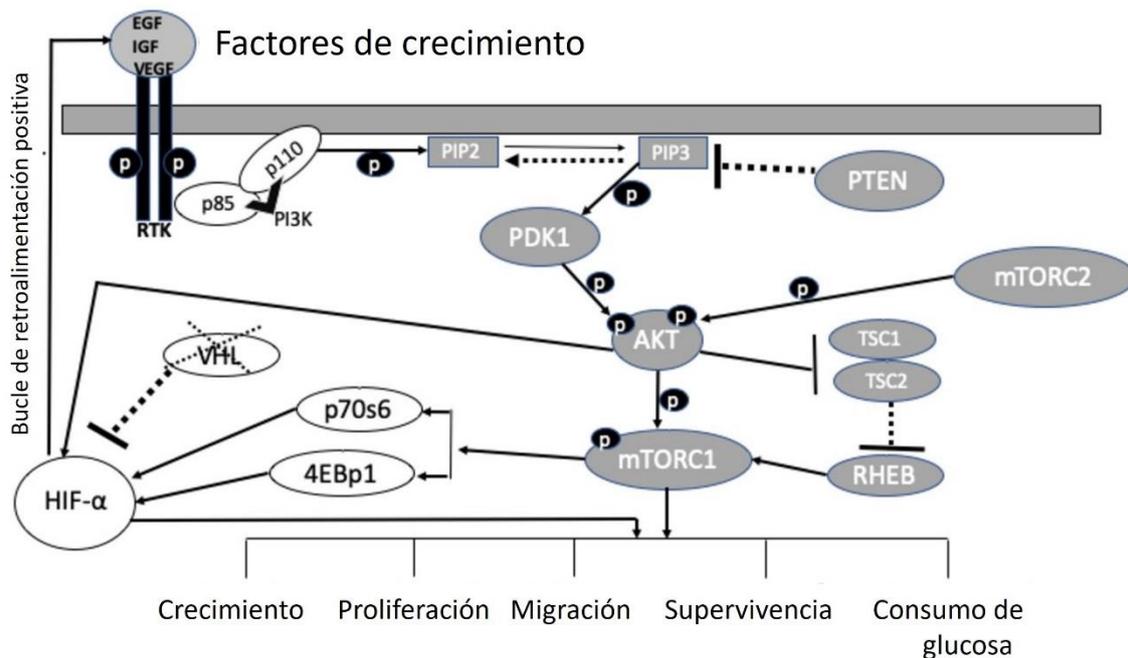


Figura 3. Vía de señalización PTEN/AKT/mTOR, tomada y modificada de Tumkur Sitaram et al., 2021.

3.4. Proteínas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90)

3.4.1. Generalidades y subfamilias de las HSP

Las proteínas de choque térmico (HSP), también llamadas chaperonas moleculares, son vitales para el funcionamiento y la supervivencia celular. Se trata de proteínas que interactúan con otras proteínas para estabilizarlas y ayudar en el plegamiento conformacional que les permite alcanzar su estado funcional, y si se trata de proteínas aberrantes, evitando el plegamiento y promoviendo su degradación (Dunker et al., 2008). Por lo tanto, la actividad y disponibilidad de las chaperonas sirve como un regulador crucial de la actividad de la proteína cliente y la función celular homeostática; la vigilancia constante por parte de las chaperonas es vital para garantizar la proteostasis dentro de la célula (Hartl et al., 2011).

Ayudan al correcto plegamiento de los polipéptidos recién formados y en la adquisición de la estructura terciaria de las proteínas, en la translocación y secreción proteica. Participan en la reparación de proteínas anormales o en su degradación vía proteasoma. Están relacionadas con el control del ciclo celular participando en algunas vías de señalización y brindan citoprotección en eventos proapoptóticos y de estrés celular. También están involucradas en la presentación de antígenos mediante la transferencia de péptidos antigénicos a las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (CMH-I). Algunas HSPs secretadas extracelularmente pueden

activar a células presentadoras de antígenos, como macrófagos (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019).

La estructura de las HSPs está representada por 4 regiones funcionales conservadas: la primera pertenece a un dominio N-terminal (llamado dominio J) característico de la familia de las HSPs, corresponde al sitio de regulación por la actividad del ATP. La segunda porción es una región desordenada rica en Glicina/Fenilalanina, responsable de la flexibilidad de las proteínas, está adyacente al dominio J. La tercera región es un dominio rico en cisteína con repeticiones CXXCXGXG (X puede ser cualquier otro aminoácido) de unión al sustrato, está en la región media o central. La cuarta región corresponde al extremo C-terminal, que permite la dimerización de las HSPs (**Figura 4**). Estas proteínas se unen a los segmentos hidrofóbicos de los péptidos para poder cumplir su actividad como chaperonas y su unión es dependiente de ATP (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019).

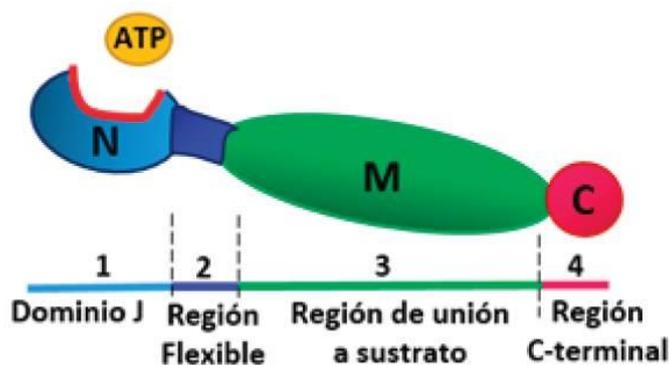


Figura 4. Estructura esquemática de las HSP. Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019.

Las HSPs conforman una gran familia de proteínas y se clasifican en grupos de acuerdo con su peso molecular, que varía entre 10 a 150 KDa (**Tabla 7**).

Tabla 7. Clasificación de las familias de las proteínas de choque térmico (HSPs) (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019).

Familia	Nombre	Localización celular	Función	Co-chaperona
Pequeñas HSPs	p20	Citoplasma	Vaso relajación	Ninguna
	Hsp22o $\alpha\beta$ -cristalina	Citoplasma/Núcleo	Estabilización del citoesqueleto	
	Hsp27	Citoplasma/Núcleo	Dinámica de la actina	
	Hsp40	Citoplasma	Chaperona	

Hsp40	Hsp47	Ret. Endoplásmico	Control de síntesis del colágeno	Ninguna
Hsp60	Hsp58	Mitocondrias	Chaperona	Hsp10
	Hsp60	Mitocondrias	Chaperona	
Hsp70	Hsc70	Citoplasma	Chaperona	Hsp40, GrpE, BAG, HSPBP1, Hip, Hop, CHIP
	Hsp70	Citoplasma/Núcleo	Chaperona	
	Hsp75	Mitocondrias	Chaperona	
	Grp78	Ret. Endoplásmico	Chaperona	
Hsp90	Hsp90 α	Citoplasma	Chaperona	p23, Hop, FKBP51, FKBP52, Cyp40, cdc37
	Hsp90 β	Citoplasma	Chaperona	
	Grp94	Ret. Endoplásmico	Chaperona	
Hsp110	Hsp105	Citoplasma	Chaperona citoprotectora	Ninguna
	Hs0110	Nucléolo/citoplasma	Chaperona citoprotectora	

3.4.2. Isoformas Hsp90 α y Hsp90 β

Hsp90 es una de las HSP más comunes, dependiente de ATP que sirve como chaperona molecular en las células eucariotas y está altamente conservada dentro de la evolución molecular. Hsp90 interactúa con una amplia gama de proteínas denominadas clientes; afectando a casi todos los elementos de la función y señalización celular. Como resultado, Hsp90 está implicada en una variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluida la regulación del desarrollo, el envejecimiento y la diferenciación celular (Calderwood & Gong, 2016).

Hsp90 se une a las proteínas cliente para formar un dímero en forma de anillo que estabiliza y facilita el plegamiento adecuado. Hsp90 se ha implicado en la regulación y preservación de la estabilidad de una serie de proteínas, incluidas las proteínas cinasas, los factores de transcripción y los receptores de hormonas esteroideas (Calderwood & Gong, 2016; Kaziales et al., 2020).

En la respuesta al estrés, la Hsp90 se une al receptor de esteroideas, estabilizándolo y preparándolo para la unión del ligando, lo que respalda la transducción de señales en respuesta a la liberación de hormonas esteroideas.

Hasta el momento, se han descrito cinco isoformas de Hsp90: Grp94, Hsp90N, TRAP1, Hsp90 α y Hsp90 β que se diferencian básicamente por su localización intracelular. La Hsp90 α y la Hsp90 β se encuentran en el citosol, a diferencia de las otras isoformas que se encuentran asociadas a organelos. Ambas isoformas citosólicas comprenden 80 % de esta subfamilia y son las encargadas de modular la mayoría de sus acciones intracelulares. La Hsp90 α y la Hsp90 β mantienen hasta 85 % de identidad a nivel de proteína. En condiciones fisiológicas, la proporción de Hsp90 α es menor en comparación con Hsp90 β , ya que mientras la primera constituye 40 % de la proteína total citosólica de Hsp90, la segunda conforma el 60 %. Ambas isoformas pueden encontrarse en forma monomérica, dimérica o heterodimérica. La Hsp90 α se encuentra en mayor proporción en forma dimérica, mientras que la Hsp90 β principalmente en forma monomérica. La conformación dimérica es la forma funcional. Hsp90 α se considera inducible y se ha visto que su alta expresión está relacionada con la progresión tumoral, la regulación del ciclo celular y evasión de la apoptosis (Bertram et al., 1996), mientras que la forma Hsp90 β es considerada constitutiva y se ha visto asociada a la resistencia a fármacos y en funciones celulares normales como el mantenimiento de la arquitectura celular, diferenciación y citoprotección (César Cortés-González et al., 2008).

3.5. Hsp90 en cáncer

Se sabe que varias chaperonas tienen un rol importante en la oncogénesis, estabilizando un gran número de proteínas cliente críticas para la viabilidad celular y contribuyendo a la proliferación incontrolada. La sobre expresión de Hsp90 es característica de algunos cánceres y es indicativo de un mal pronóstico. Esta sobre expresión se considera como una respuesta al estrés del microambiente tumoral. El mantenimiento de oncogenes por la estabilización de Hsp90 provoca que la proliferación de células cancerosas se vuelva independiente del control homeostático y que este sea protegido de procesos anti-oncogénicos celulares. Hsp90 también se ha visto implicada en otras *hallmarks* del cáncer como angiogénesis, invasión y metástasis gracias a la diversidad de proteínas que tiene como clientes (**Figura 5**) (Lacey & Lacey, 2021).

Se dice que las células cancerosas tienen una “adicción” a la Hsp90, pues se ha demostrado que su sobre expresión y regulación positiva tiene efectos amortiguadores para que las células cancerosas sobrevivan y proliferen. Esta chaperona se regula positivamente en estrés; el microambiente tumoral somete a las células a mucho estrés por el crecimiento constante del tumor, inestabilidad genética, mutaciones, hipoxia, incluso a la exposición de terapias citotóxicas (quimioterapia), dando como

resultado la sobre expresión de Hsp90 dentro de las células cancerosas para amortiguar las mutaciones resultantes de estas condiciones y estabilizar el plegamiento y la función de proteínas. En estas células, más del 90 % de Hsp90 se encuentra unida a una proteína cliente debido al genoma del cáncer altamente inestable y la constante actividad amortiguadora requerida para preservar el fenotipo maligno (Lacey & Lacey, 2021).

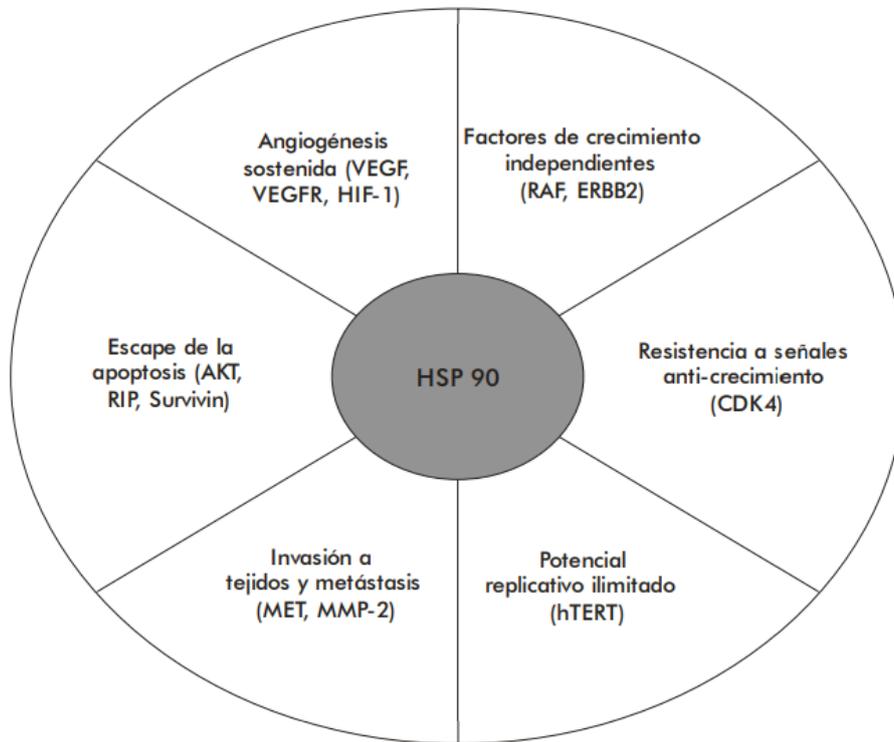


Figura 5. Contribución de la Hsp90 en los procesos evolutivos del cáncer. Tomada y modificada de Vallespí, 2008. VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular. HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1. RAF: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*. ERBB2: Gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2. CDK4: Cinasa dependiente de ciclina 4. hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana. MET: Transición epitelio mesénquima. MMP-2: Metaloproteasa de matriz 2. RIP: Proteína inactivadora de ribosomas.

3.5.1. Hsp90 como terapia blanco en cáncer

Comprender los diversos roles de Hsp90 puede ofrecer un blanco terapéutico novedoso y efectivo en el tratamiento del cáncer. Se han probado varios inhibidores de Hsp90 como tratamiento en cáncer con un éxito limitado debido a un efecto compensatorio de sobre expresión de otras HSP's como Hsp70 y Hsp27, sin embargo, las terapias combinadas han tenido más éxito en desencadenar la degradación de proteínas oncogénicas (Lacey & Lacey, 2021).

Como se ha descrito, HIF1 α y AKT son proteínas cliente de Hsp90, por lo que la inhibición de esta chaperona parece ser prometedora para regular negativamente la vía PI3K/AKT/mTOR. Diversos estudios se han dedicado a analizar el comportamiento

que tienen algunas proteínas en esta vía tras la inhibición de Hsp90. Un estudio reciente encontró que la geldanamicina y tanespimicina (17-AAG), ambos inhibidores de Hsp90, pueden interrumpir la asociación de esta con HIF1 α , promoviendo la ubiquitinación y degradación de HIF1 α mediada por proteasoma de manera independiente de oxígeno y de VHL en líneas celulares de CR que carecen de VHL funcional (Isaacs et al., 2002).

La geldanamicina (GA) es un antibiótico con propiedades antitumorales que se une al extremo amino terminal de Hsp90, sitio donde se lleva a cabo la actividad ATPasa. La disociación de Hsp90 con sus proteínas cliente mediada por GA, da como resultado la degradación proteasomal de estas. Como ya se ha mencionado, HIF1 α tiene un papel crucial en la progresión tumoral y se ha visto sobre expresado en una gran variedad de cánceres. Los tumores como los de CRcc donde VHL se encuentra inactivado, se caracterizan por estar muy vascularizados y producir un exceso de factores angiogénicos como VEGF, una de las citocinas angiogénicas más potentes y que está regulada transcripcionalmente en gran medida por HIF1 α , lo que sugiere que la capacidad de regular a la baja su expresión con el uso de inhibidores de Hsp90, tendría un efecto positivo en el control del cáncer (Isaacs et al., 2002).

La GA tiene efectos tóxicos en hígado con elevaciones de transaminasas como efecto predominante. Por esta razón se han desarrollado análogos de GA menos tóxicos, como el 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina mejor conocido como 17-AAG. Esta molécula se encuentra actualmente en diversos estudios clínicos (Isaacs et al., 2002).

3.5.2. Hsp90 como biomarcador en cáncer

La detección de Hsp90 en muestras biológicas, como tejidos tumorales o fluidos corporales, puede proporcionar información útil en el diagnóstico del cáncer. Se ha observado en varios estudios una correlación entre la sobre expresión de esta chaperona y la presencia de tumores malignos en varios tipos de cáncer, como cáncer de mama, pulmón, colorrectal y próstata. Su detección puede realizarse mediante técnicas inmunohistoquímicas, análisis de expresión génica o técnicas de inmunoprecipitación (Lacey & Lacey, 2021).

La expresión de Hsp90 también se ha asociado con el pronóstico de algunos tipos de cáncer: niveles elevados parecen estar relacionados con un peor pronóstico y menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama, pulmón y otros. Además, la respuesta al tratamiento puede variar dependiendo de los niveles de Hsp90, lo que sugiere que podría ser un marcador predictivo de respuesta a terapia (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonseca, 2019).

La detección de Hsp90 en biopsias líquidas es una forma novedosa y no invasiva que permite dar un mejor seguimiento al paciente oncológico. Aunque los estudios en este campo apenas son exploratorios, se tienen hallazgos que confirman que su uso puede ser parte de la práctica clínica en el futuro. Como ejemplo, se ha demostrado la presencia de Hsp90 circulante y su actividad en la progresión tumoral en cáncer de próstata resistente a la castración y también que esta liberación de Hsp90 de las células parece estar relacionada con el fenotipo secretor asociado a la resistencia a la castración, por lo que su monitoreo permitirá dar una terapia blanco más adecuada y un control que permita identificar metástasis tempranas (Lacey & Lacey, 2021).

Dado que Hsp90 juega un papel crítico en la estabilidad de proteínas clave en el cáncer, su nivel de expresión puede utilizarse para evaluar la eficacia de la terapia dirigida contra esas proteínas. La disminución de los niveles de Hsp90 después del tratamiento pueden indicar una respuesta terapéutica positiva, mientras que los niveles elevados pueden sugerir resistencia a la terapia (Lacey & Lacey, 2021).

Hsp90 ha surgido como un biomarcador prometedor en el campo del cáncer. Su detección y análisis pueden proporcionar información relevante para el diagnóstico, pronóstico, monitoreo de la enfermedad, así como para la elección de terapias blanco. Sin embargo, es importante destacar que la investigación en este campo continúa y se requieren más estudios clínicos para validar su utilidad (Lacey & Lacey, 2021).

3.5.3. Participación en vías de señalización y regulación de oncogenes y supresores de tumor importantes en CRcc

Una de las proteínas cliente importantes de Hsp90 es AKT, una serina/treonina cinasa activada por PI3K y que activa a mTOR. La vía AKT/mTOR desempeña diversas funciones en el proceso oncogénico normal, conduciendo a la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Beck et al., 2014).

AKT está asociada en un complejo con Hsp90 y Cdc37. AKT en este complejo es activa y estimulable por factores de crecimiento extracelulares. Se requiere la asociación con Hsp90 funcional para la estabilidad de AKT, pero no para su actividad. La inhibición de Hsp90 no altera su asociación con AKT, pero la desestabiliza. En células tratadas con inhibidores de Hsp90, AKT se ubiquitina y se dirige a proteasoma para su degradación. Los inhibidores de Hsp90 regulan a la baja la vía PI3K/AKT en parte al causar una disminución en la expresión de la proteína AKT (Basso et al., 2002).

Además, se sabe que HIF1 α y HIF2 α son proteínas cliente de Hsp90, asociándose con procesos angiogénicos y con el incremento en la radioresistencia en varios tipos de neoplasias, como cáncer pulmonar, mama y estómago. En células A549 de cáncer de

pulmón sometidas a radiación, el mecanismo de la expresión de HIF1 α implica la síntesis *de novo* de HIF1 α a través de la vía PI3K/AKT/mTOR y su estabilización mediante la interacción con Hsp90, que se da exclusivamente en células resistentes a la radiación. Al emplear el inhibidor de Hsp90, 17AAG, se disminuye la expresión de HIF1 α y la interacción entre estas dos proteínas, lo cual lleva a una disminución en la supervivencia celular y disminución de la producción de factores angiogénicos (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonseca, 2019).

En células de cáncer de páncreas humano HPAF-II y L3.6pl se analizaron cambios en la activación de las vías Erk/AKT/HIF1 α relacionadas con Hsp90, y se mostró que al inhibir a Hsp90 con 17-AAG disminuye la fosforilación del receptor de crecimiento similar a la insulina IGF-IR, lo cual conduce a la inhibición de la actividad de HIF1 α y de STAT3/STAT5, disminuyendo VEGF (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonseca, 2019).

4. Antecedentes generales

El estudio de las HSP como biomarcadores es reciente, pero en general su sobre expresión se ha asociado con un mal pronóstico en una amplia gama de neoplasias como el cáncer de estómago, pulmón, hígado, endometrio, ovario, mama, osteosarcoma, próstata y vejiga. Aunque los niveles de HSP no proporcionan información a nivel diagnóstico pueden ser útiles para establecer el grado de agresividad y el estado del proceso oncogénico. Varias HSPs han sido implicadas en el pronóstico de tumores específicos, como la Hsp27, cuya sobre expresión se asocia con un mal pronóstico en cáncer de mama, estómago y de hígado (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019).

La Hsp70 y Hsp90 también se correlacionan con un mal pronóstico en cáncer de mama, endometrio, colorrectal, cuello uterino y leucemias. Se ha reportado que la secreción de Hsp90 en células de cáncer de colon HCT-8 y su asociación con un incremento en el proceso invasivo ante la privación de suero. Mediante ensayos de ligación por proximidad se demostró la unión de Hsp90 con proteínas como Neu (también conocida como HER2) y CD91 α . Estos complejos inducen vías de señalización de Erk, PI3K/Akt, NF κ B y p65, que terminan provocando la expresión de una integrina que se ha asociado con un aumento de la invasividad tumoral tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019).

Aunque se sabe que la implicación de cada isoforma de Hsp90 en el proceso oncogénico es diferente, los estudios diferenciales entre isoformas Hsp90 α y Hsp90 β son limitados. Se ha probado que el *knockdown* de Hsp90 α resulta en la degradación de proteínas cliente oncogénicas, sugiriendo que la administración de un inhibidor selectivo de Hsp90 α puede exhibir una actividad anticancerígena contra aquellos cánceres dependientes de Hsp90 α . De manera adicional, Hsp90 α también es secretada al espacio extracelular, lo cual promueve la cicatrización de heridas, adhesión celular e inflamación. De hecho, los cánceres altamente invasivos secretan niveles significativos de Hsp90 α para activar la metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2) para inducir la expresión de MMP-3, que promueve la invasión tumoral. La Hsp90 α extracelular también contribuye a un microambiente inflamatorio que favorece la progresión del cáncer de próstata (Mishra et al., 2021).

5. Antecedentes directos

En estudios preliminares del laboratorio de carcinogénesis del INCan, en donde se analizó la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β en muestras de tejido renal de pacientes diagnosticados con CRcc, se encontró que los niveles de expresión de la proteína Hsp90 α identifica a un subgrupo de pacientes con menor sobrevida, teniendo una asociación directa en el perfil de expresión y activación de la vía de proliferación celular Akt/mTOR/HIF-1 α , mientras que la isoforma Hsp90 β se asoció a un mayor tamaño del tumor (Romero Mandujano. En proceso de publicación).

Se analizó la participación de las isoformas durante el efecto pro apoptótico del inhibidor 17-DMAG en la línea celular 786-O de células de CR con genotipo VHL-/-, PTEN-/- . Se observó que la inhibición de Hsp90 en células con este genotipo mejora el efecto pro apoptótico del 17-DMAG. Debido a la pérdida de función de PTEN, hay una sobre expresión de AKT que conduce a la inducción de HIF-1 α , el cual tampoco puede ser degradado por pVHL, provocando su translocación nuclear y la transcripción de genes que favorecen la progresión tumoral. Hsp90 desempeña su función como chaperona mediante la regulación de la actividad de HIF-1 α en normoxia, por lo que es de esperarse que su inhibición regule a la baja la vía de PI3K/AKT y el efecto pro apoptótico sea mayor (Córdoba Nájera, 2016).

También se evaluó la inhibición de Hsp90 α y Hsp90 β y esta fue diferencial y dependiente de la concentración de 17-DMAG, esto debido a que mientras que Hsp90 β previene la fosforilación de AKT, Hsp90 α permite su activación, por lo que una disminución selectiva de la isoforma Hsp90 α podría favorecer la sensibilidad de la célula ante el tratamiento con 17-DMAG, potenciando su efecto pro apoptótico. La ausencia de PTEN también parece tener utilidad como marcador pronóstico ante el tratamiento con un inhibidor de Hsp90 (Córdoba Nájera, 2016).

Posteriormente, se encontró que hay una correlación positiva y significativa entre la disminución de mRNA del gen *HSP90AA1* y las variables clínicas de metástasis al momento del diagnóstico y progresión. En cuanto al mRNA del gen *HSP90AB1*, no hubo asociación con ninguna variable clínica: en la isoforma constitutiva no se esperan cambios en la expresión (Calvo Hernández, 2018).

Se asoció un aumento en la expresión de Hsp90 α con la progresión; considerando que la elevación en la síntesis proteica puede estar dada por un aumento en la traducción del mRNA y de acuerdo con la asociación de la disminución de mRNA de *HSP90AA1* con la metástasis y progresión, se propuso que esta relación inversa se debe a la respuesta adaptativa al estrés. Durante esta respuesta, los niveles de mensajero

aumentan en el tejido adyacente pues si bien no es considerado tumoral, tampoco tiene las condiciones fisiológicas del tejido normal. Una vez que se lleva a cabo esta adaptación, los niveles de mRNA acumulados durante esta etapa deben ser traducidos para que Hsp90 cumpla con su función y favorezca la progresión del cáncer (Calvo Hernández, 2018).

En otro estudio, se analizó en conjunto el mRNA de las isoformas de Hsp90 y la expresión a nivel de proteína y se encontró una asociación significativa entre la sobre expresión de *HSP90AA1* con metástasis, grado Fuhrman 3 y 4 y peor supervivencia evaluada a 24 meses. Este análisis se realizó comparando la relación $[HSP90AA1TC / HSP90AB1TC] / [HSP90AA1TN / HSP90AB1TN]$ con cada una de las variables clínicas mencionadas (Mancio Cárdenas, 2021).

Por la evidencia antes mencionada encontrada por nuestro grupo de investigación es que resulta de interés estudiar en conjunto los perfiles de expresión de las isoformas de Hsp90 con supresores de tumor importantes en el desarrollo de CRcc como VHL y PTEN y buscar si existe una asociación con las características clínicas e histopatológicas de los pacientes.

6. Planteamiento del problema

En ausencia de supresores de tumor como VHL y PTEN, se sobre activa la vía PI3K/AKT/mTOR, aumentando la expresión de proteínas características del CRcc como HIF α y AKT, ambas clientes de Hsp90. A pesar de que se conoce esta relación entre isoformas de Hsp90 y supresores de tumor de esta vía, no se han estudiado en conjunto. La obtención de los niveles de expresión de Hsp90 α , Hsp90 β , VHL y PTEN y su relación con las variables clínicas e histopatológicas de los pacientes de CRcc, permitirá el establecimiento de patrones de expresión y su asociación con la progresión de la enfermedad, ayudando a que el seguimiento y tratamiento de los pacientes sea más adecuado.

7. Pregunta de investigación

¿Cuál será la implicación clínica de los patrones de expresión de las proteínas Hsp90 α , Hsp90 β , VHL y PTEN en los pacientes de CRcc?

8. Hipótesis

La ausencia o disminución de la expresión de los supresores de tumor VHL y PTEN en conjunto con el aumento de la expresión de la isoforma inducible, Hsp90 α , se asociará con las variables clínicas de peor pronóstico: progresión, metástasis, menor supervivencia, grado Fuhrman 3 y 4, así como un mayor tamaño tumoral. Mientras que la expresión de la isoforma constitutiva, Hsp90 β , se espera constante independientemente de las variables clínicas ya mencionadas.

9. Objetivos

9.1. Objetivo general

Determinar la asociación entre la expresión de las proteínas Hsp90 α y Hsp90 β y los supresores de tumor VHL y PTEN y su relevancia clínica en los pacientes de carcinoma renal de células claras (CRcc).

9.2. Objetivos particulares

- Establecer una cohorte retrospectiva de pacientes diagnosticados con carcinoma renal de células claras, tomando en cuenta las características clínicas e histopatológicas.
- Determinar los niveles de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β en tejido tumoral de pacientes de CRcc.
- Determinar la asociación entre los niveles de expresión de las isoformas Hsp90 α y Hsp90 β con las características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CRcc.
- Determinar los niveles de expresión de las proteínas supresoras de tumor VHL y PTEN en tejido tumoral de pacientes de CRcc.
- Determinar la asociación entre los niveles de expresión de las proteínas supresoras de tumor VHL y PTEN con las características clínicas e histopatológicas de los pacientes con CRcc.

10. Metodología

Establecimiento de la cohorte

Este estudio se llevó a cabo a través de un protocolo clínico aprobado por el comité de ética e investigación del Instituto Nacional de Cancerología (Clave: INCAN/CI/322/16 e INCAN/CEI/388/16). Las muestras fueron recolectadas en el periodo 2012-2018 de pacientes diagnosticados con CR y que fueron tratados con nefrectomía. La cohorte está conformada por 152 pacientes, de los cuales, se excluyeron a aquellos que padecían un subtipo histológico diferente al de células claras, dejando disponibles para el estudio solo a 94 pacientes. Las variables clínicas que se consideraron para este estudio fueron metástasis, progresión, tamaño tumoral, grado Fuhrman y sobrevida.

Procesamiento de muestras

Inmediato a la nefrectomía, la pieza quirúrgica fue analizada por el departamento de patología del INCan para confirmar el diagnóstico de CRcc. Se proporcionó al laboratorio de carcinogénesis tanto tejido tumoral (TC) como tejido adyacente al tumor (TN), sin embargo, en este estudio solo se consideró TC. En un tiempo no mayor a 30 min y siguiendo un Procedimiento Operativo Estandarizado (POE) registrado en el Protocolo Clínico, los tejidos fueron seleccionados, lavados con PBS a 4°C y criopreservados en nitrógeno líquido a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción y cuantificación de proteínas totales

La extracción requiere de la completa disrupción del tejido en un buffer que garantice la conservación de las proteínas presentes en el tejido. Para este trabajo, se utilizó el homogeneizador de tejido TissueRuptor II (QIAGEN) a 30,000 rpm durante 30 s con 400 µL de Buffer RIPA 1X (ThermoFisher Scientific, #Cat 89900) con inhibidor de proteasas y fosfatasas 1X. El homogeneizado se conservó en agitación constante durante 2 h a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 4°C a 13,000 rpm por 20 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo etiquetado para su almacenamiento a -20°C. Para la cuantificación de proteínas, se utilizó el método espectrofotométrico de Lowry, realizando una curva de calibración de albúmina para cada ensayo.

Inmunodetección de proteínas por Western Blot.

Para comprobar que los extractos cuantificados se encontraran íntegros, se prepararon las muestras con 20 µg de cada extracto y se realizó la electroforesis en gel SDS-PAGE al 10 % que posteriormente fue teñido con azul de Coomassie.

El primer Western Blot se realizó con muestras de pacientes con características clínicas diferentes entre sí para identificar posibles patrones de expresión asociados a una variable clínica. Gracias a esto fue posible identificar 3 grupos de pacientes: el Grupo 1 conformado por pacientes que no habían presentado metástasis al momento del diagnóstico ni progresaron (evaluado <18 meses post nefrectomía; n = 54); el Grupo 2 conformado por pacientes que no presentaron metástasis al momento del diagnóstico pero que progresaron antes de los 18 meses post nefrectomía (n = 9); y el Grupo 3 conformado por pacientes que tuvieron metástasis al momento del diagnóstico y por lo tanto también progresaron (n = 31). Los siguientes ensayos de Western Blot fueron realizados cargando según los grupos establecidos.

Se prepararon geles de acrilamida al 10% y las muestras con PBS y buffer de Laemli 2X. Se cargaron 40 µg de cada extracto. La electroforesis se realizó 30 min a 60V y 150 min a 120 V. La transferencia fue semiseca y se realizó por 3 h a 18 V. Se utilizó una membrana de fluoruro de polivinilideno o PVDF (Millipore, #Cat IPVH00010).

El bloqueo posterior a la transferencia se realizó por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante utilizando solución de bloqueo al 5 % (BioRad, #Cat 1706404). Posterior al bloqueo, la membrana se cortó en 3 fragmentos diferentes de acuerdo con el marcador de peso molecular empleado:

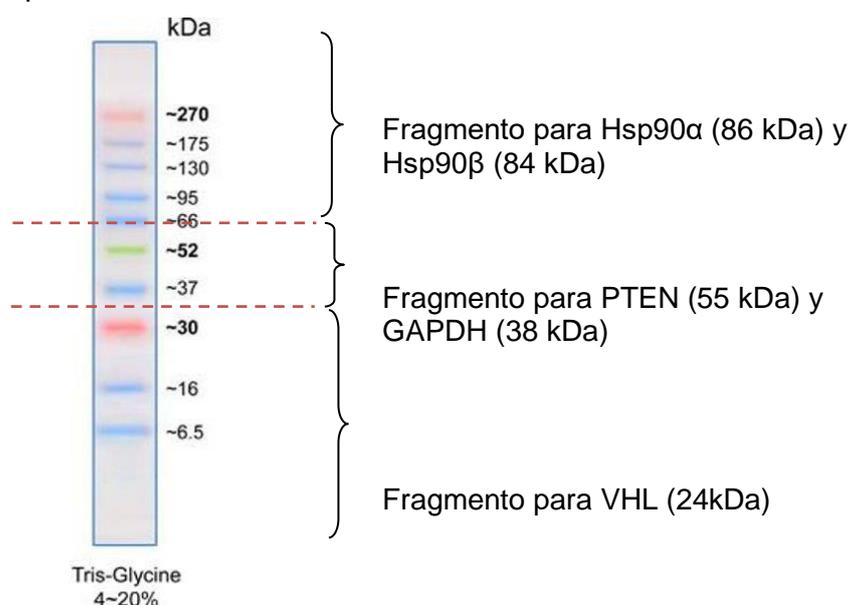


Figura 6. Marcador de peso molecular empleado: *BLUltra Prestained Protein Ladder*, #Cat. ABIN2868518.

Se realizaron dos lavados de 8 min cada uno con TBS-T 1X. Posteriormente, se incubó el anticuerpo primario toda la noche a 4°C con agitación constante. Primero se incubaron los anticuerpos Hsp90α, GAPDH y VHL (**Tabla 8**) y posterior a su revelado en placas, se les sometió a *stripping* para obtener la inmunoexpresión de Hsp90β y PTEN (**Tabla 8**). Este procedimiento consiste en hacer 2 lavados de 30 min para las

proteínas *housekeeping* (GAPDH) y 1 lavado de 30 min a temperatura ambiente para el resto de las proteínas, con buffer TRIS-HCl 50 mM pH 2. Se lavan las membranas dos veces por 5 min en cada lavado con TBS-T 1X y se bloquean por 10 min a temperatura ambiente. Se repitieron los dos lavados con TBS-T 1X y se continuó con el protocolo, dejando incubar el anticuerpo primario toda la noche.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados.

	Anticuerpo	Marca	#Cat.	Dilución	Hecho en
Anticuerpos Primarios	Hsp90 α	Santa Cruz	sc-515081	1:1000	Ratón
	Hsp90 β	Sigma Aldrich	SAB4300541	1:1000	Conejo
	GAPDH	Santa Cruz	Sc47724	1:2500	Ratón
	PTEN	BD Pharmingen	559600	1:500	Ratón
	VHL	BD Bioscience	BDB564183	1:200	Ratón
Anticuerpos Secundarios	Goat anti-Rabbit	Millipore	AP132P	1:10000	Cabra
	Rabbit anti-Mouse	Millipore	AP160P	1:10000	Conejo

Posterior a la incubación del anticuerpo primario, (tanto en primer ensayo como posterior a *stripping*), se realizaron 5 lavados de 8 min cada uno con TBS-T 1X. Se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario por 1 h 30 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Se repitió el proceso de lavado de membranas. Para la reacción de quimioluminiscencia se utilizó el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific #Cat. 34580) y se obtuvieron los niveles de inmunodetección por autoradiografía. Las placas se escanearon con un densitómetro para su análisis (**Figura 7**).

Análisis densitométrico y análisis estadístico

Se obtuvo la densitometría de cada proteína en el programa *ImageJ* de todos los pacientes de nuestra cohorte incluyendo una proteína *housekeeping* (GAPDH). Este programa calcula la densidad de píxeles de cada una de las bandas obtenidas en el Western Blot, considerando el fondo de la placa también. Se obtuvo el promedio de las densidades de píxeles obtenidas para cada uno de los triplicados de cada proteína para cada muestra y se calculó la densidad óptica (D.O.) dividiendo el promedio de densidad de píxeles de cada proteína problema entre el promedio de la densidad de píxeles de GAPDH. Para la obtención de las relaciones con las variables clínicas se utilizó este valor normalizado con GAPDH.

El análisis estadístico se realizó con el programa *GraphPad*. Se realizó una prueba de normalidad y los datos resultaron no tener una distribución normal, por lo que las pruebas estadísticas utilizadas fueron alternativas no paramétricas de ANOVA y t de Student; Kruskal-Wallis y Mann-Whitney respectivamente.

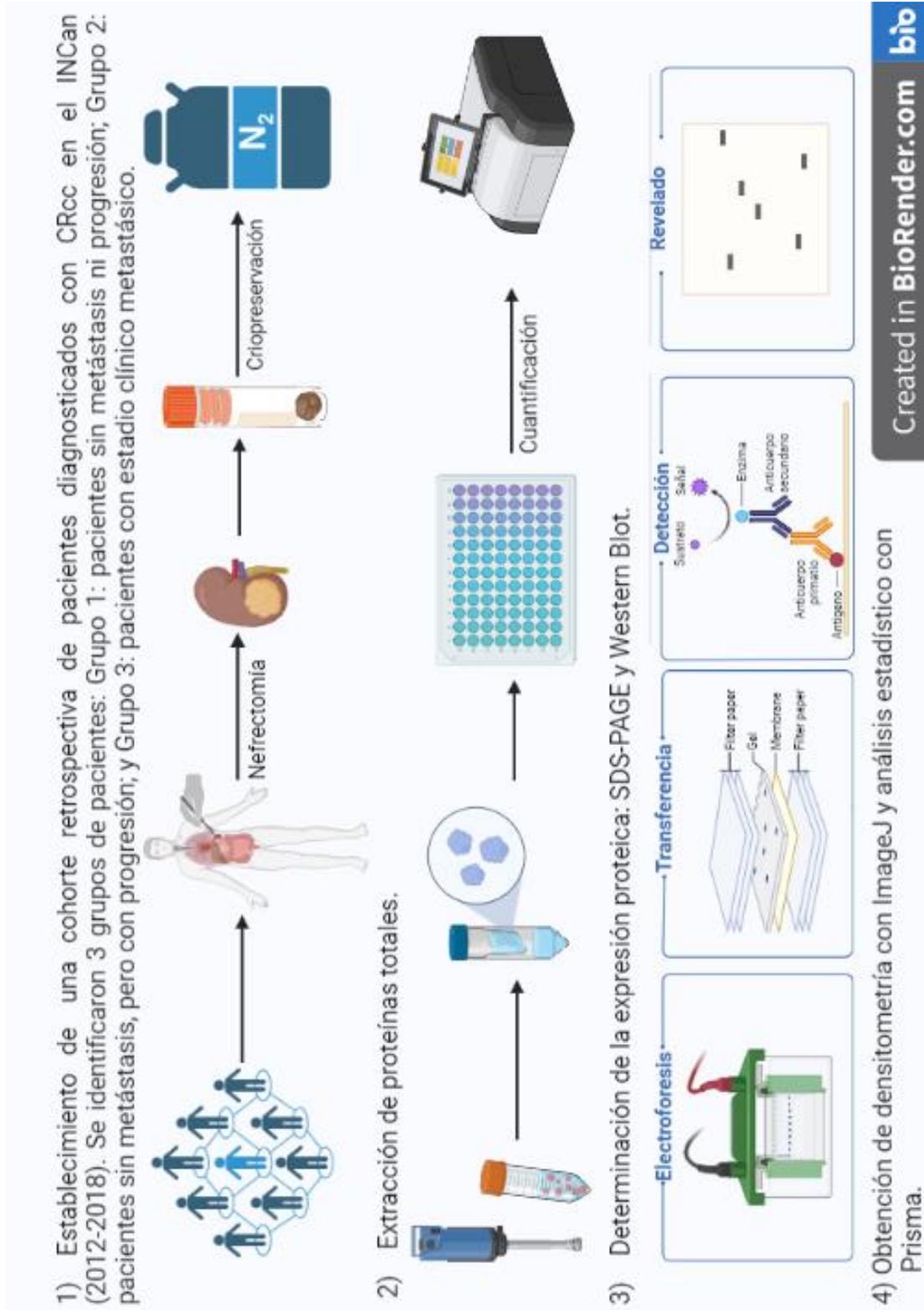


Figura 7. Metodología resumida

11. Resultados

Se incluyó un total de 94 pacientes y de manera adicional, a 2 pacientes diagnosticados con Síndrome de VHL con el objetivo de observar si el patrón de expresión para VHL era diferente. La cohorte considerada para este estudio mostró que hay una mayor incidencia de CRcc en hombres en comparación con las mujeres (relación 1.5 : 1). La edad promedio de los pacientes fue de 54 años. El 32 % de los pacientes presentaron metástasis al momento del diagnóstico. Estos datos concuerdan con lo reportado por el Globocan.

Tabla 9. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes de CRcc incluidos en la cohorte.

Variable clínica		Número de pacientes (n = 94)	%
Edad 54 ± 18.75	≤ 54 años	50	53.2
	> 54 años	44	46.8
Sexo	Masculino	56	59.6
	Femenino	38	40.4
Metástasis	M0	63	67
	M1	31	33
Grado Fuhrman	1 y 2	23	24.5
	3 y 4	69	73.4
	No se reportó	2	2.1
Progresión (<18 meses post nefrectomía)	P0	54	57.4
	P1	40	42.6
Tamaño tumoral	1 y 2	48	51
	3 y 4	41	43.6
	No se reportó	5	5.4
Sobrevida	> 24 meses	59	62.7
	≤ 24 meses	35	37.3
	≥ 60 meses	40	42.5
	< 60 meses	54	57.5

M0: Sin metástasis, M1: Metástasis, P0: Sin progresión, P1: Progresión.

Expresión de Hsp90α y Hsp90β de pacientes de CRcc

Se hizo un primer ensayo de Western Blot con muestras de pacientes con características clínicas diferentes entre sí para identificar posibles patrones de expresión tanto de Hsp90α como de Hsp90β asociados a una variable clínica (**Figura 8a y 8b; Figura 9a y 9b**).

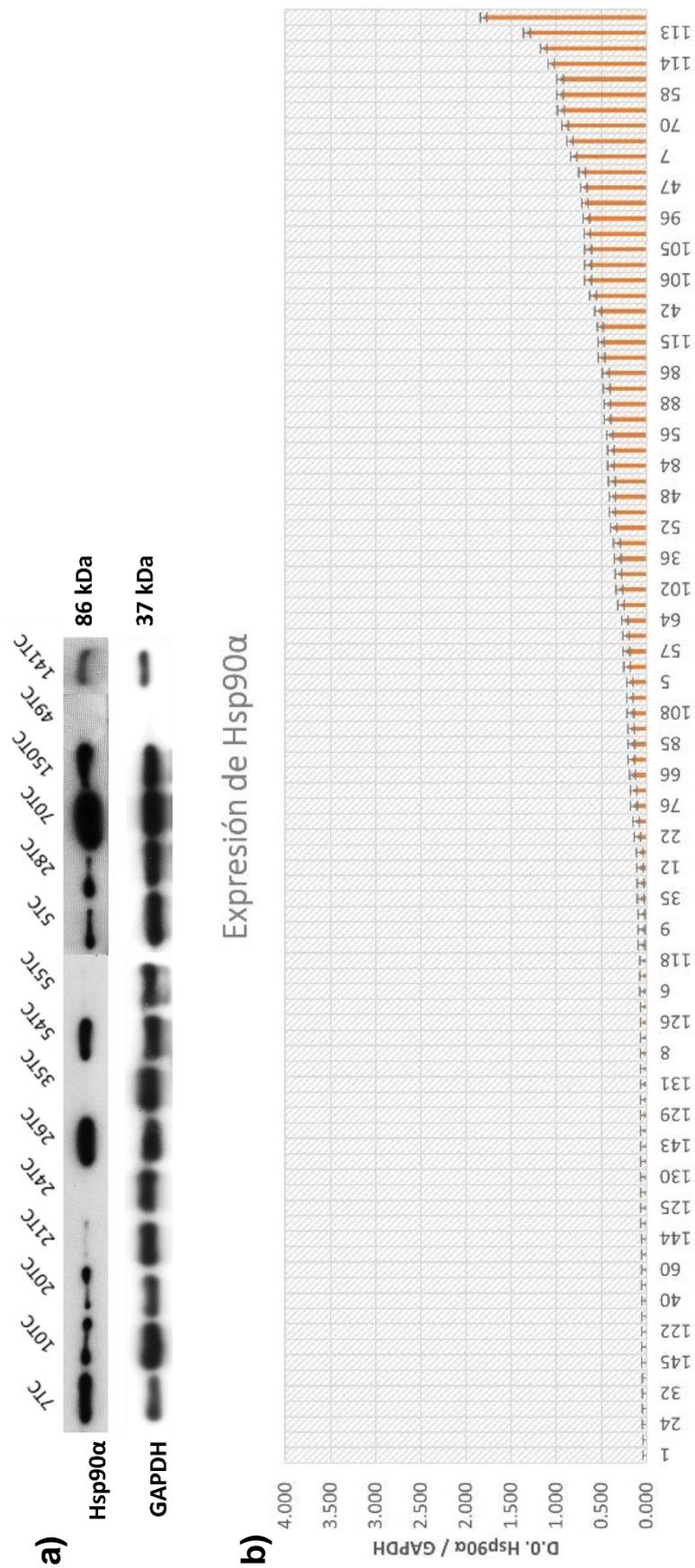


Figura 8: **a)** Primer ensayo de Western Blot de Hsp90α, se incluyen pacientes con diferentes características clínicas. Los dos últimos pacientes, 49TC y 141TC, pertenecen a los únicos dos pacientes reportados con síndrome de VHL. **b)** Se muestran las D.O. para Hsp90α de cada una de las 94 muestras obtenidas ordenadas de manera ascendente. TC: Tejido tumoral.

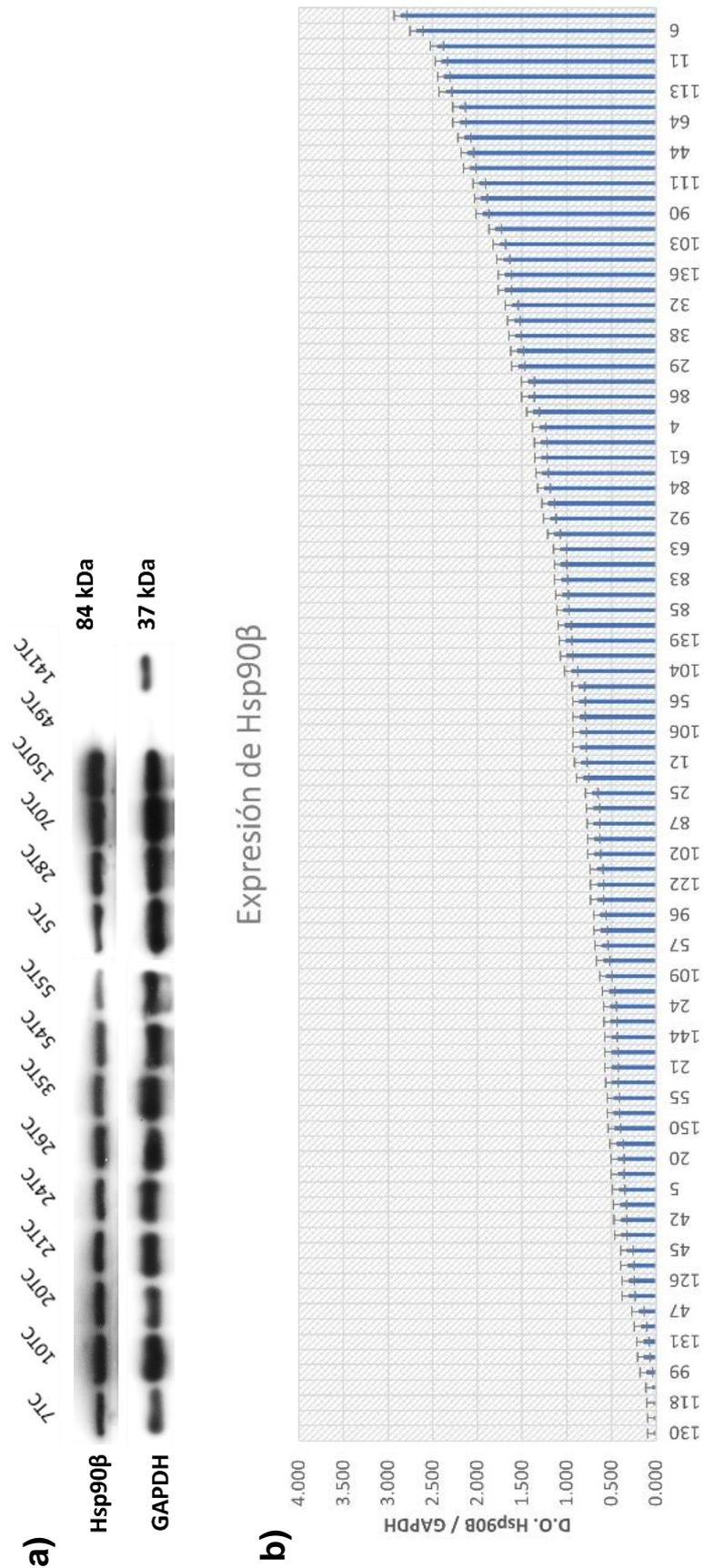


Figura 9: a) Primer ensayo de Western Blot de Hsp90β. Se incluyen pacientes con diferentes características clínicas. Los dos últimos pacientes, 49TC y 141TC pertenecen a los únicos pacientes reportados con síndrome de VHL. **b)** Expresión de Hsp90β de todos los pacientes incluidos en la cohorte, organizados de menor a mayor densidad óptica. TC: Tejido tumoral.

El patrón de bandeo en el caso de Hsp90 β parece ser constante en la mayoría de las muestras, a diferencia de la isoforma Hsp90 α en donde hay pacientes, como el 21, 24, 35 y 55, donde es prácticamente nula su expresión. De manera interesante, estas muestras corresponden a pacientes con mejor pronóstico (sin metástasis al momento del diagnóstico ni progresión evaluada en <18 meses post nefrectomía). Las muestras que expresaban Hsp90 α , independientemente de la intensidad de la banda, con excepción de 20TC, 26TC y 150TC, compartían metástasis o progresión.

Expresión de las proteínas supresoras de tumor PTEN y VHL de pacientes de CRcc

En el primer ensayo de Western Blot realizado, también se incluyeron las proteínas supresoras de tumor con los mismos pacientes empleados para la obtención del perfil de expresión de las isoformas de Hsp90 (**Figura 10a y 10b; Figura 11a y 11b**).

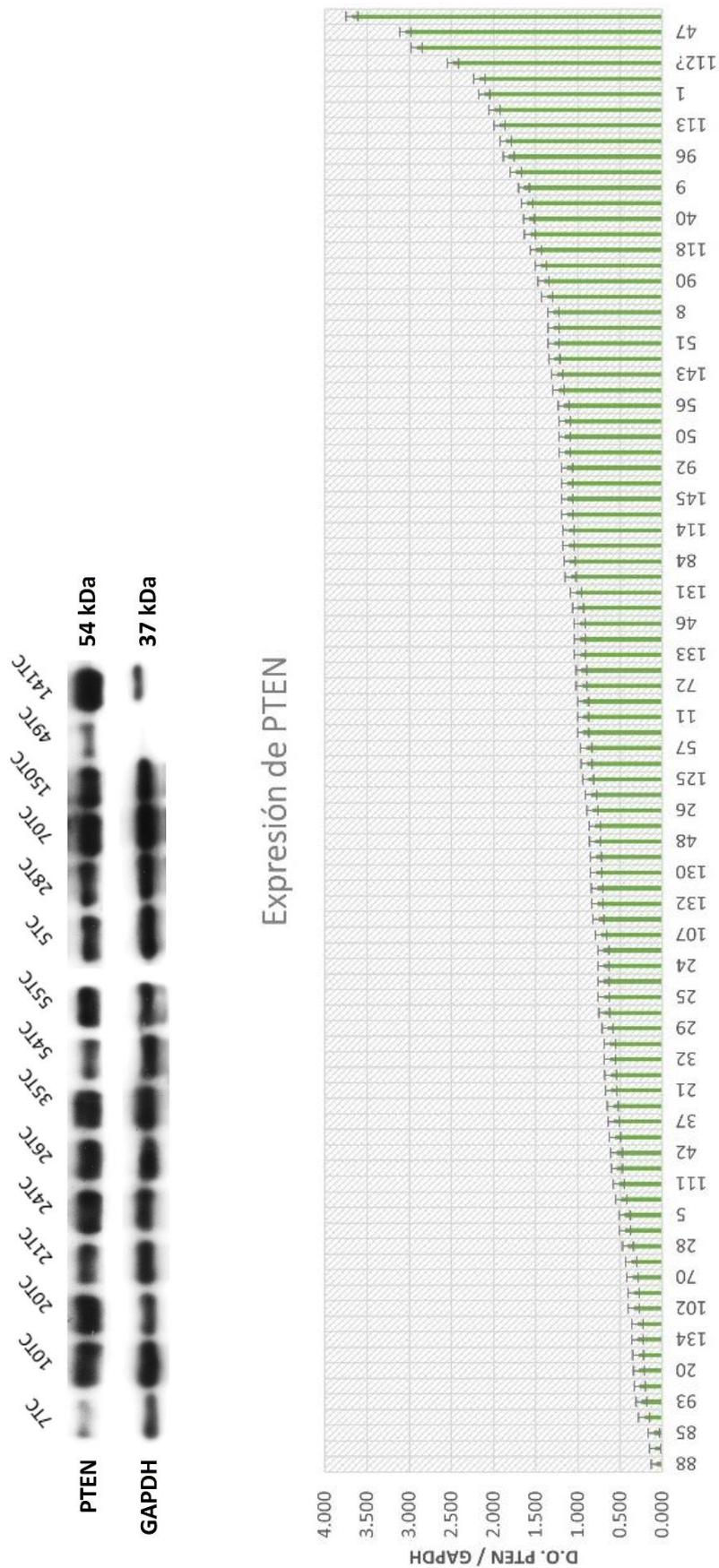


Figura 10: a) Primer ensayo de Western Blot de PTEN. Se incluyen pacientes con diferentes características clínicas. Los dos últimos pacientes, 49TC y 141TC pertenecen a los únicos pacientes reportados con síndrome de VHL. **b)** Expresión de PTEN de todos los pacientes incluidos en la cohorte, organizados de menor a mayor densidad óptica. TC: Tejido tumoral.

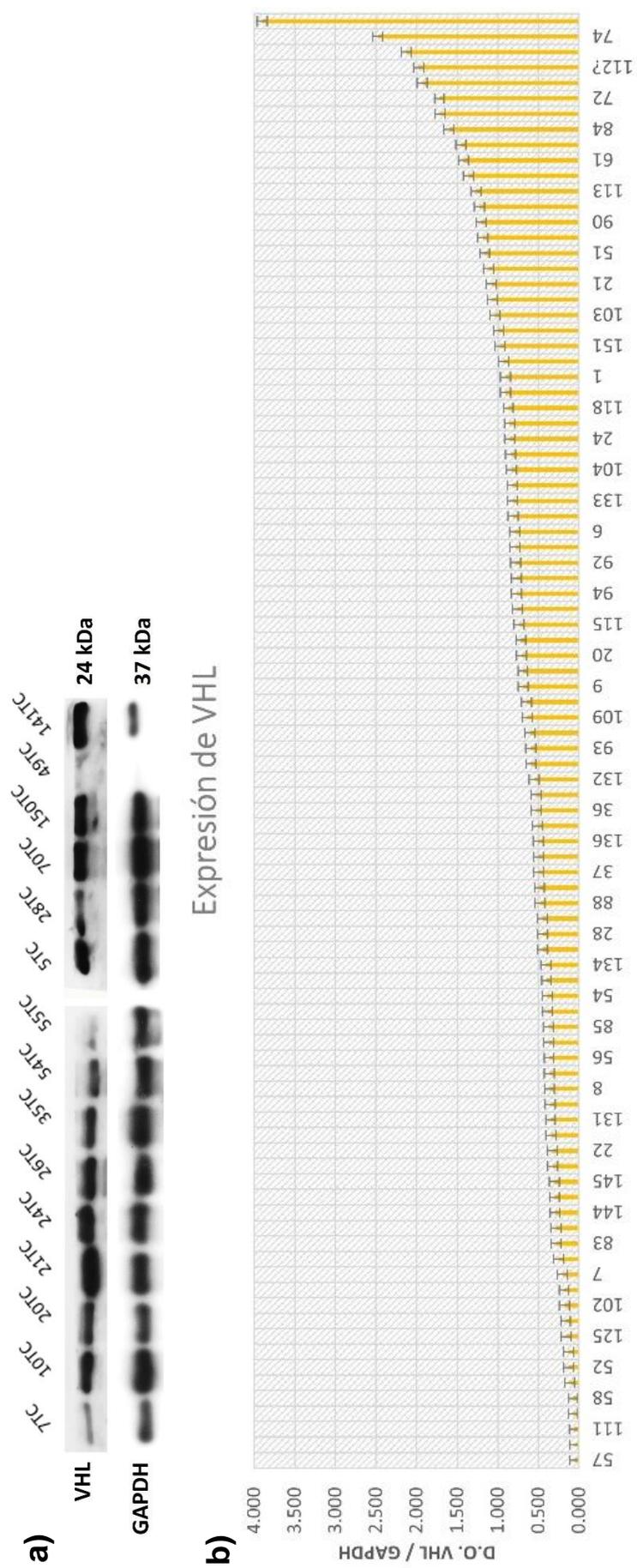


Figura 11: a) Primer ensayo de Western Blot de VHL. Se incluyen pacientes con diferentes características clínicas. Los dos últimos pacientes, 49TC y 141TC pertenecen a los únicos pacientes reportados con síndrome de VHL. **b)** Expresión de VHL de todos los pacientes incluidos en la cohorte, organizados de menor a mayor densidad óptica. TC: Tejido tumoral.

En el caso de las proteínas supresoras de tumor, los patrones de VHL no permitieron la identificación de grupos de pacientes, pero los de PTEN sí. Se puede observar que las bandas más intensas de PTEN corresponden a las muestras de los pacientes 10TC, 20TC, 24TC, 26TC, 35TC, 55TC y 70TC. De estas, con excepción de 10TC y 70TC, pertenecen a pacientes que tienen en común la ausencia de metástasis al momento del diagnóstico y de progresión. Las muestras de los pacientes 21TC, 5TC, 28TC y 150TC presentan una intensidad de banda intermedia pero no parecen compartir ninguna característica clínica, solo 5TC y 28TC que son de pacientes que presentaron progresión en menos de 18 meses, pero no presentaban metástasis al momento del diagnóstico. Los pacientes 7TC y 54TC son los que tienen la banda de PTEN más tenue. Al revisar su expediente, resultaron ser pacientes con enfermedad metastásica. Gracias al análisis en conjunto de los patrones de expresión tanto de isoformas de Hsp90 como de proteínas supresoras de tumor, fue posible identificar 3 grupos de pacientes: el grupo 1 conformado por pacientes que no habían presentado metástasis al momento del diagnóstico ni progresaron (evaluado <18 meses post nefrectomía); el grupo 2 conformado por pacientes que no presentaron metástasis al momento del diagnóstico pero que progresaron antes de los 18 meses post nefrectomía; y el grupo 3 conformado por pacientes que tuvieron metástasis al momento del diagnóstico y por lo tanto también progresaron.

Las muestras 49TC y 141TC no se incluyeron para el análisis, sin embargo, al ser los únicos pacientes diagnosticados con Síndrome de VHL de la cohorte, resultó de interés obtener el perfil de expresión en especial de VHL. En el caso de la muestra 49TC parece no estar íntegra pues incluso no hay banda de GAPDH. En el caso de 141TC, a diferencia de la mayoría de los pacientes, parece no expresar Hsp90 β , pero sí destaca la banda de PTEN y VHL donde pareciera que estos supresores de tumor están sobre expresados.

Análisis de asociación de los niveles de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β con los grupos de pacientes de CRcc establecidos

Con el objetivo de comprobar si los niveles de las isoformas de Hsp90 variaban entre grupos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA para datos no paramétricos). El grupo 1 y 3 expresan de manera muy similar Hsp90 α , mientras que en el grupo 2 se observa un incremento de esta expresión. Este patrón se conserva para la expresión de Hsp90 β a pesar de que los niveles proteicos de esta isoforma son mayores. Aunque existen variaciones en la expresión entre grupos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

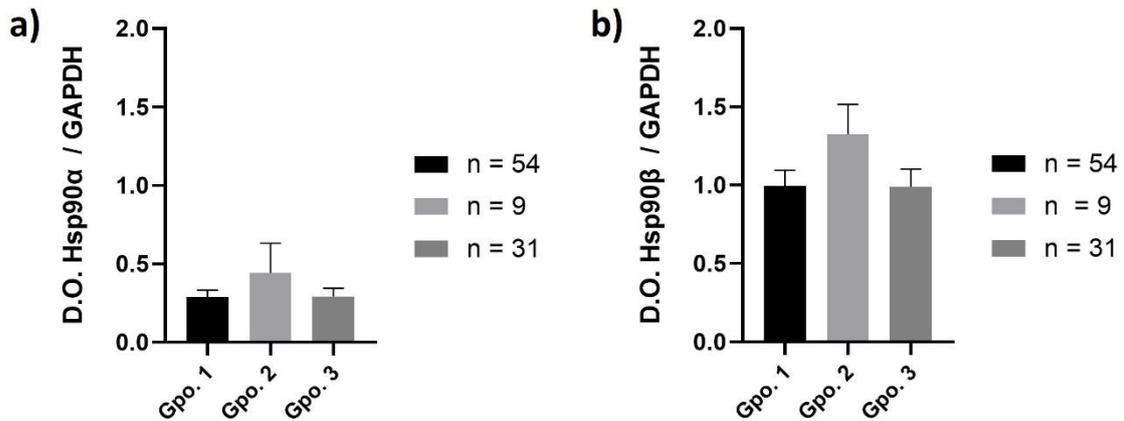


Figura 12. Niveles proteicos de **a)** Hsp90α y **b)** Hsp90β comparados entre grupos de pacientes de CRcc. Gpo. 1: Pacientes sin metástasis al momento del diagnóstico y sin progresión (<18 meses) post nefrectomía. Gpo. 2: Pacientes sin metástasis al momento del diagnóstico que progresaron <18 meses post nefrectomía. Gpo. 3: Pacientes con metástasis al momento del diagnóstico, todos los pacientes progresaron.

Análisis de asociación entre la expresión de Hsp90α y Hsp90β y las variables clínicas e histopatológicas de los pacientes de CRcc

Para determinar si había otras variables clínicas que pudieran correlacionarse con los niveles de las isoformas de Hsp90 más allá de las analizadas por grupos de pacientes, se realizaron pruebas de Mann-Whitney (t de Student para datos no paramétricos). Para esta prueba estadística se formaron dos grupos para cada variable clínica analizada: 1) presencia / ausencia de metástasis al momento del diagnóstico, 2) grado Fuhrman 1 y 2 / 3 y 4, 3) presencia / ausencia de progresión a los 18 meses posteriores a la nefrectomía, 4) tamaño tumoral 1 y 2 / 3 y 4, y 5) supervivencia (vivo / fallecido) evaluado a 24 meses post nefrectomía. Los valores de D.O. de cada grupo por variable se sometieron a la prueba de Mann-Whitney para saber si había diferencia entre los valores de un grupo y otro. Una diferencia estadísticamente significativa nos hablaría de una correlación entre la D.O. de la proteína con la variable clínica analizada.

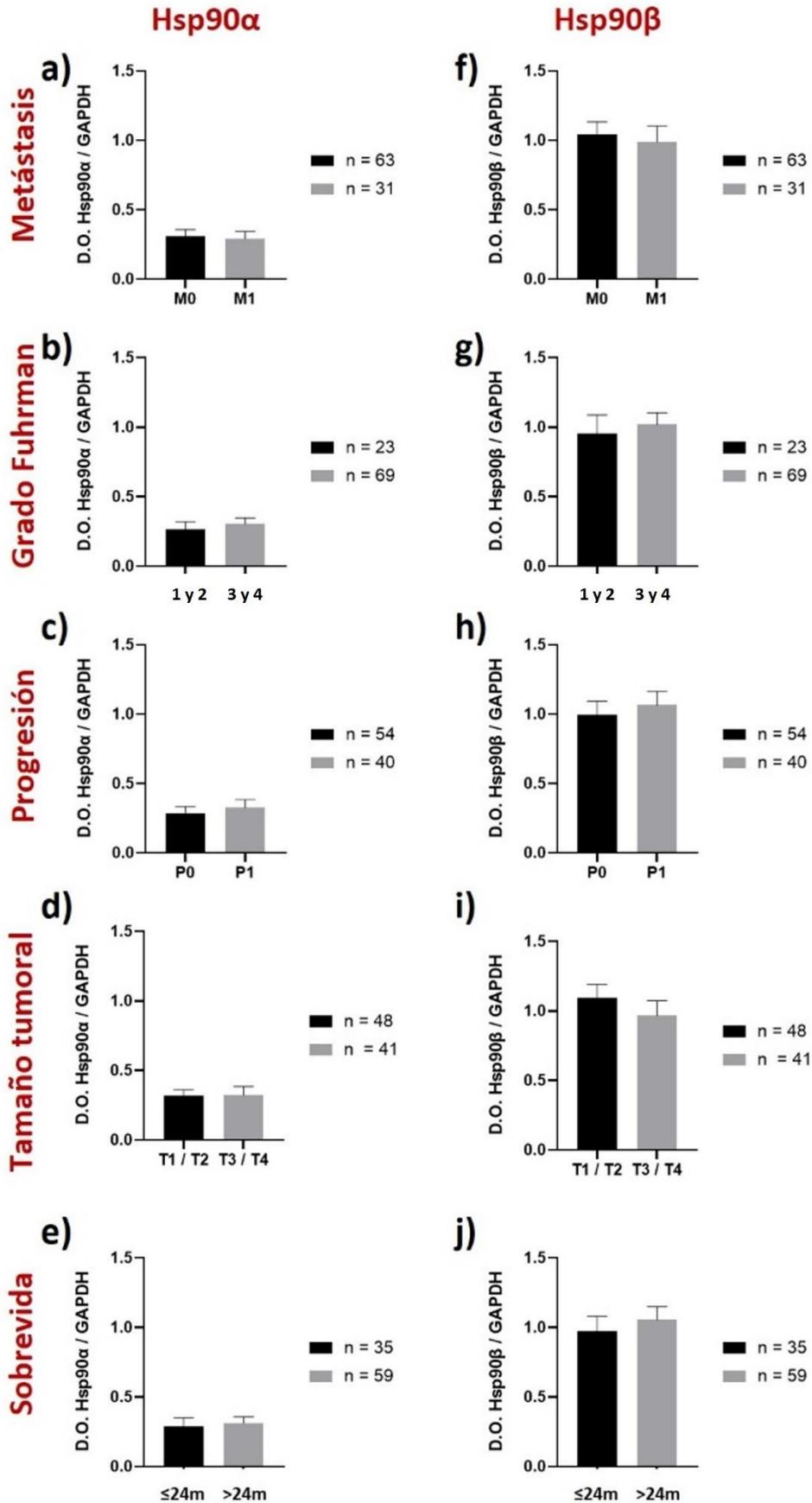


Figura 13. Niveles proteicos de Hsp90α y Hsp90β y su asociación a diferentes variables clínicas. M0: Sin metástasis, M1: Metástasis, P0: Sin progresión, P1: Progresión.

Los niveles de expresión de ambas isoformas no presentaron una diferencia estadísticamente significativa al presentar o no cada una de las variables clínicas tomadas en cuenta.

Análisis de asociación de los niveles de expresión de los supresores de tumor PTEN y VHL con los grupos de pacientes de CRcc establecidos

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para la expresión de los supresores de tumor evaluados entre grupos. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de PTEN en los pacientes del grupo 1 comparados de manera independiente con los grupos 2 y 3. Para el caso de VHL solo se obtuvo esa diferencia entre los niveles de expresión del grupo 1 contra el grupo 2. La expresión de ambos supresores de tumor es mayor en el grupo 1, estos niveles caen drásticamente en el grupo 2, volviendo a aumentar en el grupo 3 pero no lo suficiente para alcanzar al grupo 1.

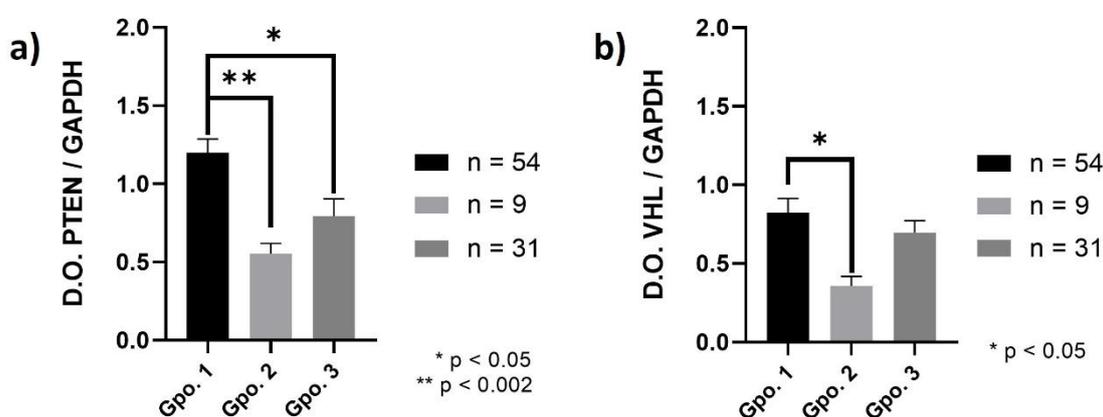


Figura 14. Niveles proteicos de a) PTEN y b) VHL comparados entre grupos de pacientes de CRcc. Gpo. 1: Pacientes sin metástasis al momento del diagnóstico y sin progresión (<18 meses) post nefrectomía. Gpo. 2: Pacientes sin metástasis al momento del diagnóstico que progresaron <18 meses post nefrectomía. Gpo. 3: Pacientes con metástasis al momento del diagnóstico, todos los pacientes progresaron.

Análisis de asociación entre la expresión de los supresores de tumor PTEN y VHL y las variables clínicas e histopatológicas de los pacientes de CRcc

Se realizaron pruebas de Mann-Whitney para averiguar si existía alguna asociación entre los niveles proteicos de PTEN y VHL y las cinco variables clínicas que se tomaron en cuenta también para el análisis de asociación de isoformas.

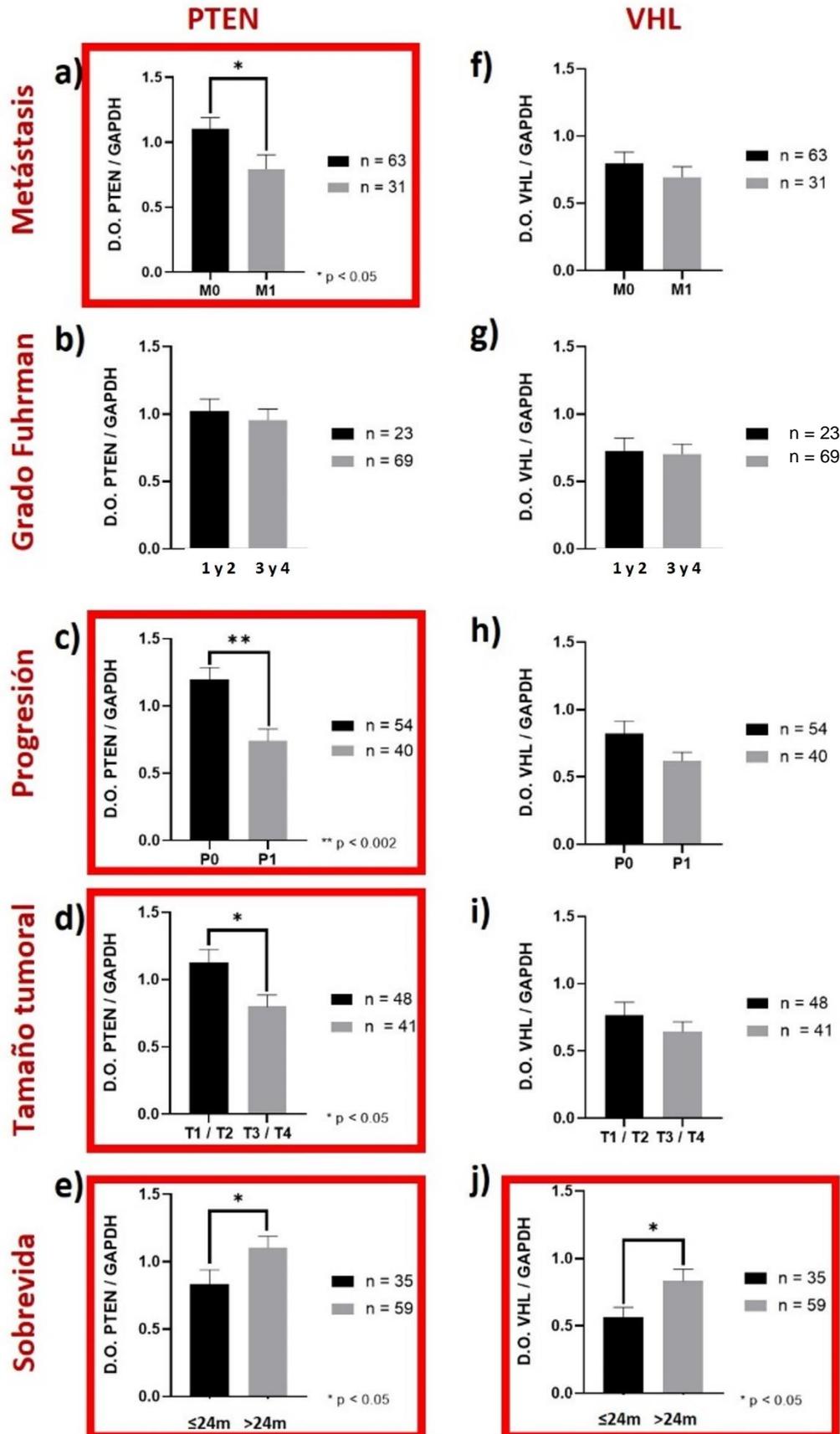


Figura 15. Niveles proteicos de los supresores de tumor PTEN y VHL y su asociación a diferentes variables clínicas. M0: Sin metástasis, M1: Metástasis, P0: Sin progresión, P1: Progresión.

Los niveles proteicos de PTEN fueron significativamente mayores en aquellos pacientes con mejor pronóstico en cuatro de las cinco variables clínicas analizadas, es decir, en aquellos pacientes que no presentaron metástasis al momento del diagnóstico, los que no progresaron, los que tuvieron un tamaño tumoral menor y los que vivieron más de 24 meses post nefrectomía. En el caso de los niveles de VHL, solo fueron significativamente mayores en aquellos pacientes con mejor pronóstico en la variable de sobrevida.

Análisis de asociación de la relación isoforma de Hsp90 / supresor de tumor con las variables clínicas e histopatológicas de los pacientes de CRcc

Se obtuvieron los cocientes de las densidades ópticas de isoforma entre isoforma (Hsp90 α / Hsp90 β y Hsp90 β / Hsp90 α) para averiguar si era posible asociarla a alguna variable clínica como se ha reportado en la literatura, sin embargo, no se obtuvo ninguna asociación.

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los niveles tanto de PTEN como VHL para predecir un peor o mejor pronóstico, se obtuvieron los cocientes isoforma entre supresor de tumor, o bien, supresor de tumor entre supresor de tumor.

Solo los valores de los cocientes de Hsp90 β / PTEN y PTEN / VHL tuvieron una asociación a la variable metástasis, sin embargo, no lograron mejorar el valor de *p* que se tenía al solo evaluar los niveles proteicos de PTEN (Figura 16).

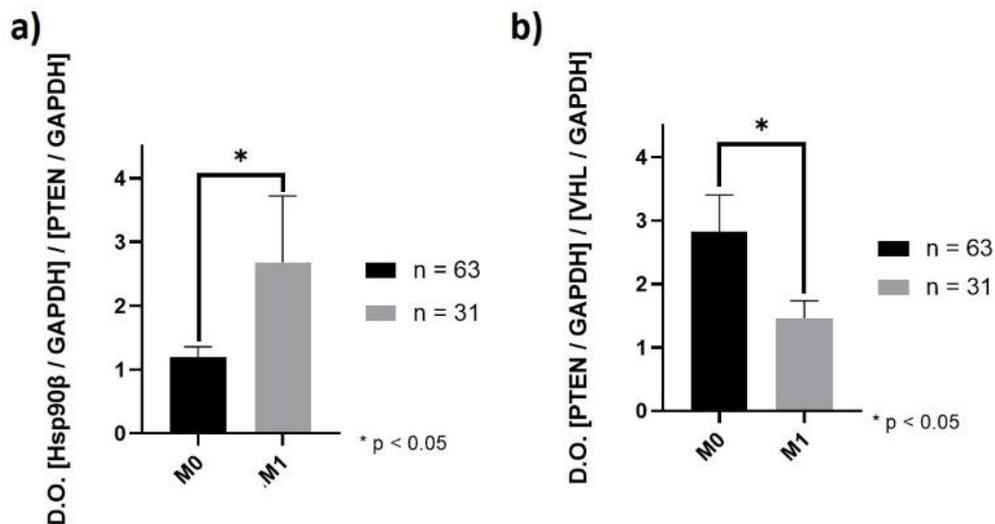


Figura 16. Radios a) Hsp90 β / PTEN y b) PTEN / VHL y su asociación con metástasis.

En el caso de la variable progresión, de manera similar a los cocientes obtenidos en metástasis, no se logra mejorar el valor de p , con excepción de Hsp90 β / PTEN donde el valor es <0.002 (**Figura 17**). Sin embargo, esto se debe a que los niveles de PTEN por sí mismos ya daban una diferencia muy significativa (<0.0001) entre los pacientes que si presentaban progresión y los que no.

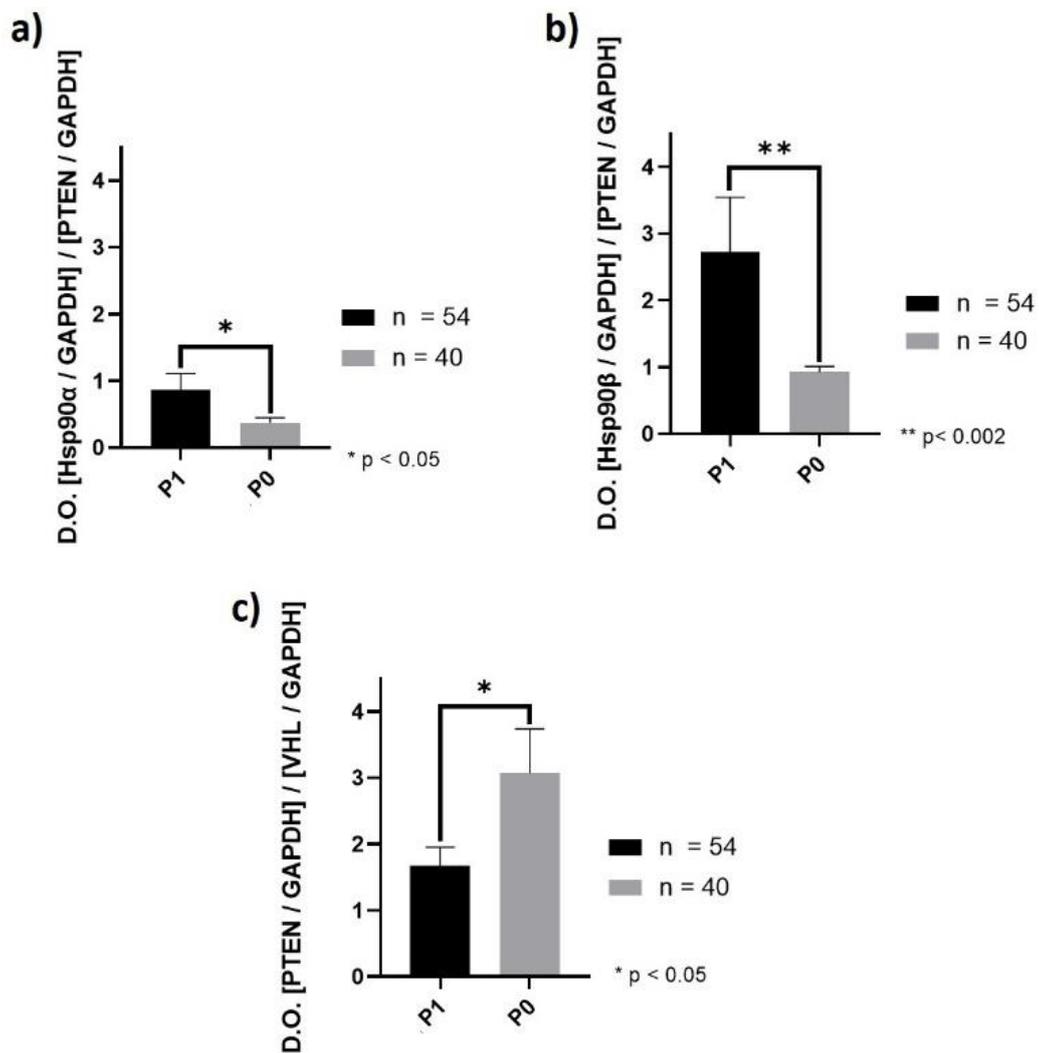


Figura 17. Ratios **a)** Hsp90 α / PTEN, **b)** Hsp90 β / PTEN y **c)** PTEN / VHL y su asociación con progresión.

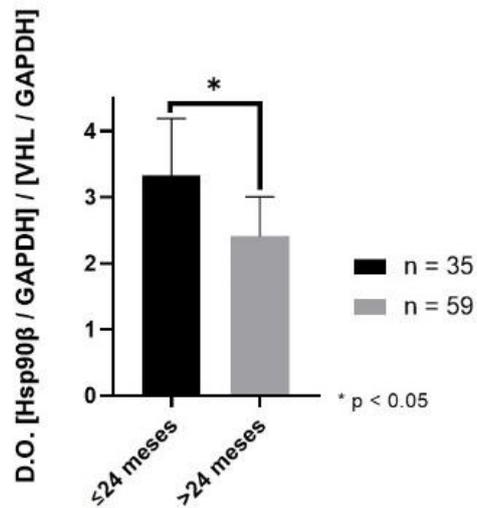


Figura 18. Radio Hsp90β / VHL y su correlación con el tiempo de supervivencia.

Ningún cociente se asoció a las variables tamaño tumoral y grado Fuhrman, pero a sobrevida evaluada a 24 meses sí (**Figura 18**). En este caso tampoco se logra mejorar el valor p , por lo que podría concluirse que el uso de los niveles de expresión de PTEN y VHL por si solos tienen un valor pronóstico para el paciente.

12. Discusión

En la tabla 9 se encuentran las características clínicas de interés de los pacientes considerados en este trabajo y se observa que el CRcc se conserva en una proporción 1.5 : 1 entre hombres y mujeres. El primer ensayo de Western Blot incluyó muestras de pacientes con diferentes características clínicas y se realizó de esta manera con el propósito de identificar patrones de expresión que permitieran cargar el resto de las muestras siguiendo un orden específico y ver si ese patrón se conservaba entre grupos y si se podía asociar a una variable clínica. También se incluyeron dos muestras, 49TC y 141TC, pertenecientes a pacientes con CRcc familiar, es decir que padecían síndrome de VHL, para ver si la expresión, en especial de VHL, era distintiva de este síndrome.

Gracias al análisis en conjunto de los patrones de expresión tanto de isoformas de Hsp90 como de proteínas supresoras de tumor, fue posible identificar 3 grupos de pacientes: el grupo 1 conformado por pacientes que no habían presentado metástasis al momento del diagnóstico ni progresaron (evaluado <18 meses post nefrectomía); el grupo 2 conformado por pacientes que no presentaron metástasis al momento del diagnóstico pero que progresaron antes de los 18 meses post nefrectomía; y el grupo 3 conformado por pacientes que tuvieron metástasis al momento del diagnóstico y por lo tanto también progresaron. Las muestras 49TC y 141TC no se incluyeron para el análisis, pero se concluyó que la muestra 49TC no se encontraba íntegra, pues no expresa más que un poco de PTEN, pero no el resto de las proteínas incluyendo la proteína GAPDH. En el caso de 141TC, a diferencia de la mayoría de los pacientes, parece no expresar Hsp90 β , pero sí destaca la banda de PTEN y VHL donde pareciera que estos supresores de tumor están sobre expresados, sin embargo, es importante recordar que el hecho de que estén sobre expresadas no significa que estas proteínas sean funcionales y suelen estar mutadas muy frecuentemente en este histotipo de CR.

De acuerdo con la identificación de los tres grupos de pacientes ya descritos, se cargaron el resto de las muestras y se realizó el análisis estadístico correspondiente para ver si había diferencias entre grupos en la expresión de Hsp90 α , Hsp90 β , PTEN y VHL.

En el caso de la expresión de las isoformas de Hsp90, al igual que lo reportado en la literatura, se encontró que el perfil de expresión de Hsp90 β se mantiene constante en la mayoría de las muestras, mientras que el de Hsp90 α parece ser muy variable, pero bajo en comparación con Hsp90 β , esto se debe a que Hsp90 α es la isoforma inducible mientras que Hsp90 β es constitutiva (Sreedhar et al., 2004). En el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, sin embargo, se identificó

que tanto el grupo 1 como el 3 expresaban niveles muy similares en ambas isoformas (**Figura 12**). Este hallazgo es interesante debido a que el grupo 1 contiene a los pacientes con mejor pronóstico y sobrevida (solo 7 de los 54 pacientes en este grupo fallecieron a los 24 meses o antes), mientras que el grupo 3 contiene a los pacientes en estadio metastásico y con peor sobrevida (21 de los 31 pacientes de este grupo fallecieron a los 24 meses o antes), por lo que parecería que los niveles de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β no son diferenciales para estos grupos a pesar de tener condiciones tan opuestas. Adicionalmente se encontró que la expresión de ambas isoformas aumenta para el grupo 2, aunque no lo suficiente para establecer una diferencia estadísticamente significativa. Niveles elevados de Hsp90 se han visto en diferentes tipos de cáncer y se ha establecido su relación con peor pronóstico y pobre supervivencia, sin embargo, su estudio a lo largo de la evolución del cáncer es algo que aún no se conoce (Lacey & Lacey, 2021).

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β , pero esta vez de acuerdo con la presencia o ausencia de una de las siguientes variables clínicas: metástasis, grado Fuhrman, progresión evaluada a 18 meses, tamaño tumoral y sobrevida evaluada a 24 meses. Al igual que en el análisis de grupos, no se encontró una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de ninguna de las cinco variables clínicas tomadas en cuenta, de hecho, los niveles de expresión son muy similares, no hay alguno que destaque como en el análisis de grupos (**Figura 13**). Estudios realizados previamente en el laboratorio de carcinogénesis del INCan donde se obtuvieron los niveles de mRNA y de proteína para ambas isoformas en CRcc, mostraron que la sobre expresión de *HSP90AA1* (mRNA de Hsp90 α) se asociaba a metástasis, grado Fuhrman 3 y 4 y peor sobrevida (<24 meses), demostrando que podría ser un indicador de estadio avanzado o marcador de peor pronóstico (Mancio Cárdenas, 2021). Sin embargo, también se encontró que los niveles de mRNA no se correlacionaban con los niveles de proteína obtenidas por Western Blot debido posiblemente a las modificaciones post transcripcionales que sufre el mensajero (Mancio Cárdenas, 2021), por lo que era de esperarse que los niveles proteicos de las isoformas de Hsp90 no se relacionaran con alguna de las variables estudiadas.

En el caso del estudio de los niveles de expresión de las proteínas supresoras de tumor entre grupos, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo 1 contra el grupo 2 ($p < 0.002$) y el grupo 1 contra el grupo 3 ($p < 0.05$) para PTEN (**Figura 14a**) y entre la expresión del grupo 1 contra el grupo 2 ($p < 0.05$) para VHL (**Figura 14b**). La expresión de ambos supresores de tumor es mayor en el grupo 1, estos niveles caen drásticamente en el grupo 2, volviendo a aumentar en el grupo 3 pero no lo suficiente para alcanzar al grupo 1.

Al igual que con las isoformas de Hsp90, se buscó una asociación entre la presencia o ausencia de las cinco variables clínicas establecidas y los niveles de expresión de las proteínas supresoras de tumor. En el caso de PTEN, todas las variables con excepción del grado Fuhrman mostraron una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión. Los pacientes con metástasis (**Figura 15a**), con tamaño tumoral 3 y 4 (**Figura 15d**) y aquellos que tuvieron una sobrevida menor a 24 meses (**Figura 15e**) presentaron niveles de PTEN significativamente más bajos comparados con aquellos pacientes libres de metástasis, tamaño tumoral 1 y 2 y sobrevida mayor a 24 meses ($p<0.05$). También los pacientes que no progresaron dentro de los primeros 18 meses post nefrectomía presentaron niveles de PTEN de casi el doble comparados con los pacientes que si progresaron ($p<0.002$) (**Figura 15c**).

El estudio de los niveles proteicos de PTEN en CRcc es limitado pues la mayoría se centran en las mutaciones que este gen pueda tener. Aun así, hay evidencia que respalda los resultados obtenidos en este estudio. Recientemente se obtuvieron los niveles proteicos de PTEN mediante Western Blot a partir del tejido tumoral de cinco niños con CR y se compararon con los niveles proteicos de tumores benignos de riñón en diez niños. Se encontró que los niveles de PTEN eran significativamente menores en los casos de CR en comparación con los tumores benignos ($p<0.05$) (Lu et al., 2018). En otro estudio realizado donde se analizaron 67 muestras de pacientes de CR mediante IHQ, se encontró que había una correlación estadísticamente significativa entre la expresión baja de PTEN con un estadio mayor (Shin Lee et al., 2003).

La regulación de PTEN parece ser un componente muy significativo en la progresión del cáncer pues se ha visto que la mayoría de los tumores de CRcc presentan una baja expresión de esta proteína supresora de tumor (Shin Lee et al., 2003). PTEN controla negativamente la cascada PI3K/AKT e influye en múltiples procesos biológicos como apoptosis, metabolismo, proliferación y crecimiento celular en CR por lo que su sobre expresión según la literatura y los resultados encontrados en este estudio, parecería ser un marcador de mejor pronóstico o un indicador de estadio temprano prometedor (Chen et al., 2018).

Es bien sabido que el eje VHL/HIF1 α /VEGF está involucrado en el desarrollo y progresión del CRcc por lo que muchas investigaciones se han centrado en la identificación de mutaciones del gen VHL y su posible asociación con la progresión del cáncer (Frew et al., 2008), mientras que el estudio de sus niveles de expresión como proteína no han sido muy explorados, razón por la cual resultó de interés para este trabajo.

Se encontró que aquellos pacientes con una supervivencia superior a 24 meses expresaban niveles mayores de VHL en comparación con aquellos que habían fallecido antes de ese periodo ($p < 0.05$) (**Figura 15j**). En un estudio reciente se compararon los niveles de mRNA y de proteína tanto de VHL como de otras proteínas del eje a partir de tejido tumoral y normal de 36 pacientes de CRcc y se buscó una asociación entre los niveles de la proteína VHL con diversas variables clínico-histopatológicas (sexo, edad, progresión, tamaño tumoral y supervivencia). Sin embargo, no se encontró ninguna incluso al comparar los niveles de expresión en tejido normal contra tejido tumoral (Wierzbicki et al., 2019). Estos resultados podrían atribuirse a que, como los autores mencionan, el número de pacientes incluidos en su estudio es limitado e invitan a ampliar su investigación. Los resultados del presente estudio demuestran que los niveles de VHL podrían ser utilizados como un marcador de pronóstico, pero es necesario seguir investigando.

En el caso de las otras variables clínicas analizadas, aunque no se asociaron significativamente con los niveles de VHL, se puede observar un patrón donde los pacientes con mejor pronóstico (sin metástasis, grado Fuhrman 1 y 2 y sin progresión) presentan mayor expresión de VHL que aquellos pacientes con peor pronóstico (**Figura 15f, 15g, 15h, 15i**). En el mismo estudio realizado por Wierzbicki y colaboradores, se observó que los niveles de mRNA fueron hasta 30% menores en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal ($p < 0.05$). Este decremento se registró en 20 de 36 pacientes analizados (56 %). Además, al comparar los niveles de mRNA del grado Fuhrman 1 y 2 contra el 3 y 4, se encontró que, a pesar de no existir una diferencia estadísticamente significativa, los pacientes con grado Fuhrman menor expresaron mayores niveles de VHL. Un comportamiento similar se observó con el tamaño tumoral. Estos resultados concuerdan con los resultados observados en este trabajo con la diferencia de que el hallazgo fue encontrado en niveles de mRNA, mientras que en este trabajo se utilizaron niveles de proteína.

Resultados previos obtenidos por el laboratorio de carcinogénesis del INCan, demostraron que los niveles de mRNA del gen *HSP90AA1*, correspondiente a la isoforma Hsp90 α , por sí mismos no tienen relevancia a nivel clínico. Sin embargo, al hacer el análisis estadístico con la relación *HSP90AA1* / *HSP90AB1*, se encontró que un valor mayor a 1, donde la expresión de *HSP90AA1* es mayor que la de *HSP90AB1*, se asocia de manera significativa ($p < 0.05$) a metástasis, grado Fuhrman 3 y 4, así como progresión evaluada a 18 meses (Mancio Cárdenas, 2021). Debido a esto, se obtuvo la relación de las densidades ópticas de Hsp90 α / Hsp90 β para averiguar si era posible asociarla a alguna variable clínica, sin embargo, no se obtuvo ninguna asociación (**Anexo 1**). Es importante recordar que este mismo estudio no encontró una

correspondencia entre los niveles de mRNA con los de proteína, por lo que este resultado está totalmente justificado.

Con el objetivo de averiguar si era posible mejorar la sensibilidad de los niveles de las proteínas supresoras de tumor PTEN y VHL para predecir el pronóstico de los pacientes de CRcc, se obtuvo la relación isoforma / supresor de tumor y supresor de tumor / supresor de tumor. Solo los valores de los cocientes de Hsp90 β / PTEN (**Figura 16a**) y PTEN / VHL (**Figura 16b**) tuvieron una asociación a la variable metástasis ($p < 0.05$), sin embargo, no lograron mejorar el valor de p que se tenía al evaluar solo los niveles proteicos de PTEN.

En los cocientes obtenidos para la variable progresión tampoco se logra mejorar el valor de p , con excepción de Hsp90 β / PTEN (**Figura 17b**) donde el valor es $p < 0.002$, sin embargo, esto se debe a que los niveles de PTEN por sí mismos ya daban una diferencia muy significativa ($p < 0.0001$) entre los pacientes que presentaban progresión y los que no.

Ningún cociente se asoció a las variables tamaño tumoral y grado Fuhrman, pero la sobrevida evaluada a 24 meses sí (**Figura 18**). De manera similar a los casos anteriores, el valor de p no es mejorado con el uso de cocientes por lo que los niveles de expresión tanto de PTEN como VHL por si solos pudiesen tener valor pronóstico para el paciente.

13. Conclusiones

En este estudio se analizó la implicación clínica que los niveles de las isoformas de Hsp90, Hsp90 α y Hsp90 β , y de las proteínas supresoras de tumor PTEN y VHL tienen en los pacientes de CRcc. Los resultados mostraron que las isoformas de Hsp90 no estaban correlacionadas con ninguna variable clínica de manera independiente. El análisis dependiente, a través de la obtención del cociente de la densidad óptica de Hsp90 α / Hsp90 β tampoco se asoció a ninguna de las cinco variables clínicas tomadas en cuenta para este estudio. Análisis previos realizados por nuestro grupo de investigación, encontraron que la abundancia de las isoformas de Hsp90 sí se pueden asociar a variables de peor pronóstico, siempre y cuando se obtengan los niveles de mRNA, más no de proteína, pues la expresión de los genes *HSP90AA1* y *HSP90AB1* no corresponden al nivel de expresión de Hsp90 α y Hsp90 β .

Por otra parte, los niveles de expresión de las proteínas supresores de tumor si pudieron asociarse a variables clínicas. Se encontró que los niveles de expresión bajos de PTEN están asociados a variables que indicarían un estadio avanzado de la enfermedad y peor pronóstico como metástasis, progresión, mayor tamaño tumoral y menor supervivencia. Estos valores de expresión bajos podrían ser de utilidad para identificar a aquellos pacientes que requieren de un seguimiento más estricto y poder detectar de manera oportuna la progresión de la enfermedad y metástasis, si es que aún no la tienen al momento del diagnóstico. Tras la detección y tratamiento oportunos, se podrían disminuir los decesos a causa del CRcc en estadio avanzado.

En el caso de la proteína supresora de tumor VHL, se demostró que a pesar de que la mutación de su gen precursor se reconoce como un evento oncogénico temprano en CRcc, esta se sigue expresando en tejido tumoral, sin significar que la proteína sea funcional. Se encontró que la caída de los niveles de VHL es característica de aquellos pacientes con una supervivencia menor o igual a 24 meses. Estos valores también podrían identificar a un grupo de pacientes con un pronóstico pobre y en conjunto con otras pruebas de laboratorio, determinar el mejor tratamiento o seguimiento.

También se realizó un análisis dependiente donde se obtuvieron los cocientes isoforma de Hsp90 / proteína supresora de tumor y proteína supresora de tumor / proteína supresora de tumor y se buscó la asociación entre estos cocientes y las variables clínicas estudiadas, sin embargo, no se mejoró la sensibilidad de la prueba.

Tras estos hallazgos, se puede concluir que el uso de los niveles de expresión tanto de PTEN como de VHL son suficientes y poseen un valor pronóstico para los pacientes de CRcc. Es necesario seguir explorando y averiguar si es posible que su uso en la clínica sea una realidad de la que los pacientes de CRcc puedan beneficiarse en el futuro.

14. Bibliografía

- Algaba, F., Arce, Y., Trias, I., Santaularia, J. M., & Antonio Rosales, A. (2006). Aplicación clínica de las actuales clasificaciones del cáncer renal. *Actas Urológicas Españolas*, 30(4), 372–385. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062006000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- American Cancer Society. (2020a). *Factores de riesgo para el cáncer de riñón*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-rinon/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
- American Cancer Society. (2020b, febrero 1). *Etapas del cáncer de riñón*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-rinon/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html>
- American Cancer Society. (2021). *Tasas de supervivencia del cáncer de riñón*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-rinon/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/tasas-de-supervivencia.html>
- Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tschlis, P., & Rosen, N. (2002). Akt Forms an Intracellular Complex with Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and Is Destabilized by Inhibitors of Hsp90 Function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39858–39866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206322200>
- Beck, J. T., Ismail, A., & Tolomeo, C. (2014). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: An emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 40(8), 980–989. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.06.006>
- Bertram, J., Palfner, K., Hiddemann, W., & Kneba, M. (1996). Increase of P-glycoprotein-mediated drug resistance by hsp 90 beta. *Anti-cancer drugs*, 7(8), 838–845. <https://doi.org/10.1097/00001813-199611000-00004>
- Brugarolas, J. (2014). Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 32(18), 1968–1976. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2003>
- Calderwood, S. K., & Gong, J. (2016). Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4), 311–323. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2016.01.003>
- Calvo Hernández, B. L. (2018). *Expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en pacientes con carcinoma renal de células claras y su implicación clínica* [Pregrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán]. <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0780008/Index.html>
- Chen, C.-Y., Chen, J., He, L., & Stiles, B. L. (2018). PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00338>
- Cinque, A., Minnei, R., Floris, M., & Trevisani, F. (2022). The Clinical and Molecular Features in the VHL Renal Cancers; Close or Distant Relatives with Sporadic Clear Cell Renal Cell Carcinoma? *Cancers*, 14(21), 5352. <https://doi.org/10.3390/cancers14215352>
- Córdoba Nájera, M. L. (2016). *Participación de Hsp90a y Hsp90b durante el efecto pro-apoptótico del inhibidor 17-DMAG en células de cáncer renal VHL-/-, PTEN-/-* [Pre-grado, Universidad Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2016/agosto/0749140/Index.html>

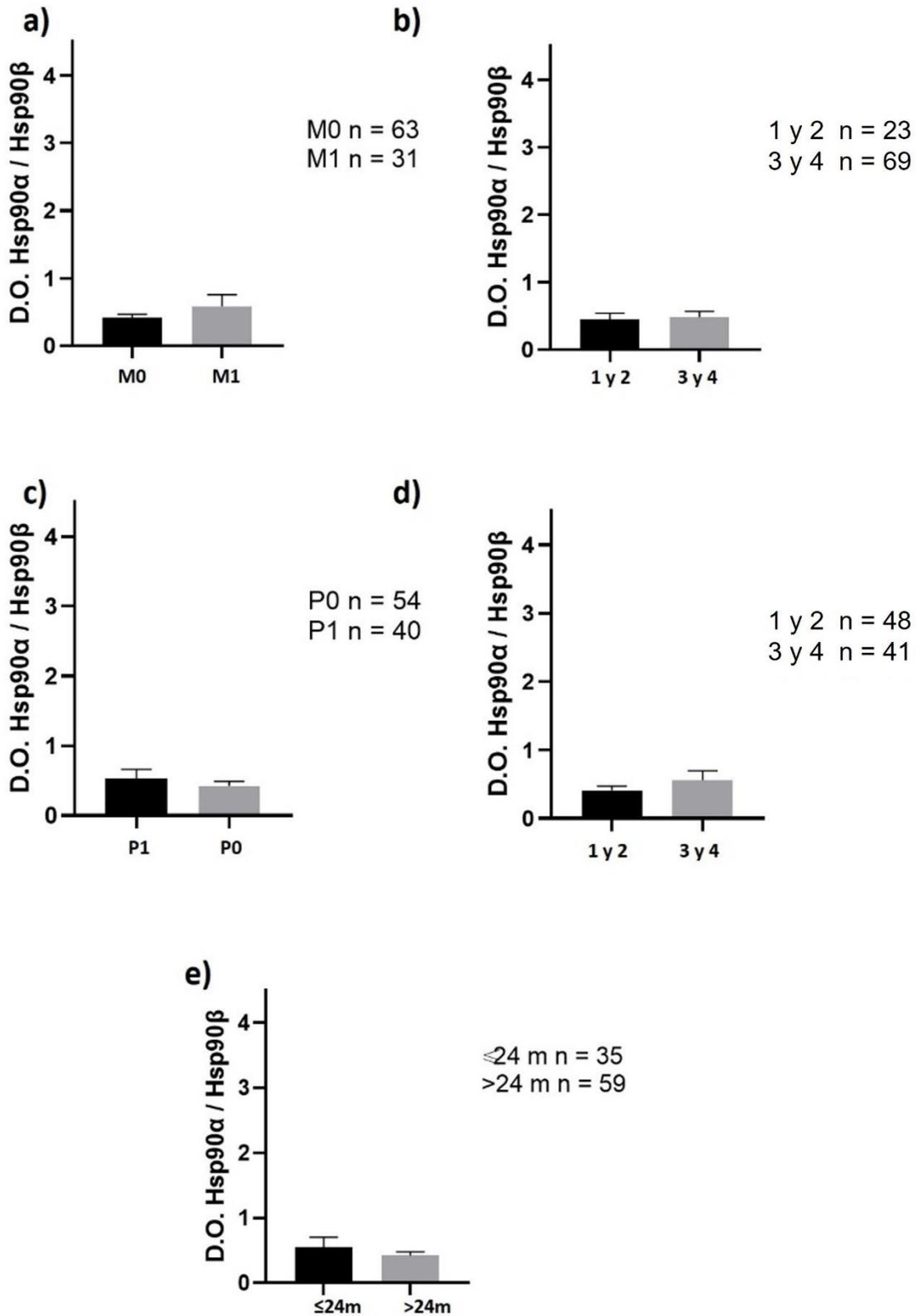
- Dunker, A. K., Silman, I., Uversky, V. N., & Sussman, J. L. (2008). Function and structure of inherently disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6), 756–764. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2008.10.002>
- Fan, C., Zhao, C., Wang, F., Li, S., & Wang, J. (2019). Significance of PTEN Mutation in Cellular Process, Prognosis, and Drug Selection in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00357>
- Farber, N. J., Kim, C. J., Modi, P. K., Hon, J. D., Sadimin, E. T., & Singer, E. A. (2017). Renal cell carcinoma: the search for a reliable biomarker. *Translational Cancer Research*, 6(3), 620–632. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.05.19>
- Frew, I. J., Thoma, C. R., Georgiev, S., Minola, A., Hitz, M., Montani, M., Moch, H., & Krek, W. (2008). pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *The EMBO Journal*, 27(12), 1747–1757. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2008.96>
- Fuhrman, S. A., Lasky, L. C., & Limas, C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 6(7), 655–664. <https://doi.org/10.1097/00000478-198210000-00007>
- Globocan. (2020). *Kidney*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf>
- Gossage, L., Eisen, T., & Maher, E. R. (2015). VHL, the story of a tumour suppressor gene. En *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Número 1, pp. 55–64). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3844>
- Guerrero-Rojas, R., & Guerrero-Fonseca, C. (2019). Molecular mechanisms of heat shock proteins (HSPs) involved in neoplasm development. *Salud Uninorte*, 34(2), 455–474. <https://doi.org/10.14482/sun.34.2.616.98>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 2011 475:7356, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., Gradin, K., Poellinger, L., & Pahlman, S. (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.026>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2013). *Diagnóstico y tratamiento del cáncer renal en el adulto*. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/607GRR.pdf>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204733200>
- Janebदार, H., Fernandes, M., & Manson-Bahr, D. (2022). Renal cancer. *Surgery (Oxford)*, 40(10), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2022.08.001>
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jiménez Ríos, MA., Solares Sánchez, M., Martínez Cervera, P., Aguilar Ponce, JL., Martínez Cedillo, J., Hinojosa Gómez, J., Zamora Moreno, J., & Rivera Rubí, L. (2010). *Oncología: Cáncer renal*.

- Kaziales, A., Barkovits, K., Marcus, K., & Richter, K. (2020). Glucocorticoid receptor complexes form cooperatively with the Hsp90 co-chaperones Pp5 and FKBP5. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67645-8>
- Kim, H., Shim, B. Y., Lee, S.-J., Lee, J. Y., Lee, H.-J., & Kim, I.-H. (2021). Loss of Von Hippel–Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene Function: VHL–HIF Pathway and Advances in Treatments for Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9795. <https://doi.org/10.3390/ijms22189795>
- Lacey, T., & Lacey, H. (2021). Linking hsp90's role as an evolutionary capacitor to the development of cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*, 28, 100400. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100400>
- Li, Z.-N., & Luo, Y. (2022). HSP90 inhibitors and cancer: Prospects for use in targeted therapies (Review). *Oncology Reports*, 49(1), 6. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8443>
- Lu, H., Tan, Y., & Chen, L. (2018). A clinical study on the expression of PTEN in renal cell carcinoma in children. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9571>
- Mancio Cárdenas, A. A. (2021). *Análisis de expresión de los genes HSP90AA1 y HSP90AB1 en pacientes con cáncer renal* [Pre-grado, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2021/mayo/0812010/Index.html>
- Mazumder, S., Higgins, P. J., & Samarakoon, R. (2023). Downstream Targets of VHL/HIF- α Signaling in Renal Clear Cell Carcinoma Progression: Mechanisms and Therapeutic Relevance. *Cancers*, 15(4), 1316. <https://doi.org/10.3390/cancers15041316>
- McGuire, B. B., & Fitzpatrick, J. M. (2009). Biomarkers in renal cell carcinoma. *Current Opinion in Urology*, 19(5), 441–446. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e32832f0c68>
- Miricescu, D., Balan, D., Tulin, A., Stiru, O., Vacaroiu, I., Mihai, D., Popa, C., Papacocea, R., Enyedi, M., Sorin, N., Vatachki, G., Georgescu, D., Nica, A., & Stefani, C. (2021). PI3K/AKT/mTOR signalling pathway involvement in renal cell carcinoma pathogenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(5), 540. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9972>
- Mishra, S. J., Khandelwal, A., Banerjee, M., Balch, M., Peng, S., Davis, R. E., Merfeld, T., Munthali, V., Deng, J., Matts, R. L., & Blagg, B. S. J. (2021). Selective Inhibition of the Hsp90 α Isoform. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 60(19), 10547–10551. <https://doi.org/10.1002/ANIE.202015422>
- Morrissey, J. J., Mellnick, V. M., Luo, J., Siegel, M. J., Figenshau, R. S., Bhayani, S., & Kharasch, E. D. (2015). Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncology*, 1(2), 204. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0213>
- Pal, S. K., Sonpavde, G., Agarwal, N., Vogelzang, N. J., Srinivas, S., Haas, N. B., Signoretti, S., McGregor, B. A., Jones, J., Lanman, R. B., Banks, K. C., & Choueiri, T. K. (2017). Evolution of Circulating Tumor DNA Profile from First-line to Subsequent Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 72(4), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.03.046>
- Quiroga Matamoros, W., Fernandez, F., Citarella Otero, D., Rangel, J., Estrada Guerrero, A., & Patiño, I. D. (2016). Guía de manejo del carcinoma de células

- renales. *Urología Colombiana*, 25(2), 169–189. <https://doi.org/10.1016/j.uroco.2016.03.002>
- Rini, B. I., Plimack, E. R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., Pouliot, F., Alekseev, B., Soulières, D., Melichar, B., Vynnychenko, I., Kryzhanivska, A., Bondarenko, I., Azevedo, S. J., Borchiellini, D., Szczylik, C., Markus, M., McDermott, R. S., Bedke, J., ... Powles, T. (2019). Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1116–1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1816714>
- 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. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14149>
- Shen, S. S., Truong, L. D., Scarpelli, M., & Lopez-Beltran, A. (2012). Role of Immunohistochemistry in Diagnosing Renal Neoplasms: When Is It Really Useful? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(4), 410–417. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0472-RA>
- Shin Lee, J., Seok Kim, H., Bok Kim, Y., Cheol Lee, M., & Soo Park, C. (2003). Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *Journal of Surgical Oncology*, 84(3), 166–172. <https://doi.org/10.1002/jso.10302>
- Sreedhar, A. S., Kalmár, É., Csermely, P., & Shen, Y. F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS letters*, 562(1–3), 11–15. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00229-7)
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*, 499(7456), 43–49. <https://doi.org/10.1038/nature12222>
- Tran, H. T., Liu, Y., Zurita, A. J., Lin, Y., Baker-Neblett, K. L., Martin, A.-M., Figlin, R. A., Hutson, T. E., Sternberg, C. N., Amado, R. G., Pandite, L. N., & Heymach, J. V. (2012). Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *The Lancet Oncology*, 13(8), 827–837. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70241-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70241-3)
- Tumkur Sitaram, R., Landström, M., Roos, G., & Ljungberg, B. (2021). Significance of PI3K signalling pathway in clear cell renal cell carcinoma in relation to VHL and HIF status. *Journal of Clinical Pathology*, 74(4), 216–222. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206693>
- Vallespí, M. G.; G. I. (2008). Las proteínas de estrés térmico en la inflamación y el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 25, 199–207. <https://biblat.unam.mx/pt/revista/biotecnologia-aplicada/articulo/las-proteinas-de-estres-termico-en-la-inflamacion-y-el-cancer>
- Wallace, M. A. (1998). Anatomy and Physiology of the Kidney. *AORN Journal*, 68(5), 799–820. [https://doi.org/10.1016/S0001-2092\(06\)62377-6](https://doi.org/10.1016/S0001-2092(06)62377-6)
- Wierzbicki, P., Klacz, J., Kotulak-Chrzaszcz, A., Wronska, A., Stanislawowski, M., Rybarczyk, A., Ludziejewska, A., Kmiec, Z., & Matuszewski, M. (2019). Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4830>

Zael, S.-R., Santiago, F.-G., Pérez-Becerra, R., Alejandro, U.-O., Claudio, M.-C., Víctor, H.-C., Dorian, S.-B., Gustavo, S.-T., Fernández-Noyola, G., Samuel, A.-T., Ángel, M., Alberto, C.-C., Erik, M.-I., Francisco, G.-S., Cantellano-Orozco, M., Morales-Montor, G., & Pacheco-Gahbler, C. (2011). Estadificación del cáncer de células renales; historia, evolución y perspectivas actuales. *Revista Mexicana de Urología*, 71(5), 296–302. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=31802#.Y8xSBmCBEgo.mendeley>

15. Anexos



Anexo 1. Ratio Hsp90 α / Hsp90 β y su correlación con **a)** metástasis, **b)** grado Fuhrman, **c)** progresión, **d)** tamaño tumoral y **e)** sobrevida.