



**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP70 Y HSP90 EN  
LÍNEA CELULAR MES-OV TRATADA CON CISPLATINO**

**ANA MARÍA ÁVILA TORRES**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
INFORME FINAL- TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C. NOVIEMBRE DEL 2018**



**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP70 Y HSP90 EN  
LÍNEA CELULAR MES-OV TRATADA CON CISPLATINO**

**ANA MARÍA ÁVILA TORRES**

Asesor externo

**LUZ DARY GUTIÉRREZ CASTAÑEDA MSC – PHD**

Docente Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud – FUCS

Asesor interno

**RUTH MELIDA SÁNCHEZ MORA MSC – PHD**

Docente Facultad Ciencias de la Salud- UCMC

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ D.C**



*Este trabajo de grado está dedicado a mi madre por su sacrificio y esfuerzo por darme una carrera profesional, a mi hermano por brindarme su apoyo durante todo mi proceso académico; a ellos dos que creyeron en mis capacidades y que con sus palabras de aliento no me dejaron decaer para que siguiera adelante para culminar esta meta.*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la doctora Luz Dary Gutiérrez, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas, por la dirección, el rigor y por su amabilidad para facilitarme su tesis, su tiempo y sus ideas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a realizar esta investigación. A la Fundación Universitaria De Ciencias De La Salud – FUCS por patrocinar este proyecto de investigación en su totalidad.

Quiero agradecer a la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca, institución a la que pertenezco, por brindarme la oportunidad a través de la práctica formativa especializada, realizar el presente proyecto de grado. Asimismo, agradezco a la doctora Ruth Sánchez por su apoyo, orientación y atención a mis consultas sobre temas relacionados con metodología.

A mi mamá y a mi hermano, por el apoyo que me han ofrecido con mi proceso de formación profesional. A mis compañeros que de una u otra manera me escucharon y me dieron palabras de aliento para seguir adelante con mi carrera universitaria.

Sin su apoyo este trabajo nunca se habría realizado, por eso, este trabajo es también el suyo. A todos, muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
3.1. Cáncer de ovario .....	6
3.2. Generalidades de las proteínas de choque térmico.....	11
3.3. Proteínas de choque térmico en cáncer .....	14
3.4. Cisplatino	
3.4.1 Mecanismo de acción .....	16
3.4.2 Efectos colaterales del fármaco en la quimioterapia.....	18
<b>4. DISEÑO METODOLÓGICO.....</b>	<b>19</b>
4.1. Tipo de estudio .....	19
4.2. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	
4.2.1. Viabilidad celular con MTT .....	19
4.2.2. Determinación de dosis letales por método <i>probit</i> .....	21
4.2.3. Inmunofluorescencia directa.....	21
4.2.4. Detección de Apoptosis/Necrosis.....	23
4.2.5. TUNEL Alexa Fluor 647 .....	24
4.3. Estadística .....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Cultivo de línea celular MES-OV .....</b>	<b>26</b>
5.1. Ensayo de Viabilidad celular con MTT.....	26

5.2. Concentración de cisplatino utilizado para obtener dosis letales 25, 50 y 70.....	28
5.3 Determinación de proteínas de choque térmico mediante Inmunofluorescencia directa	
5.3.1. Determinación de Hsp70 al ser tratada con cisplatino .....	30
5.3.2. Determinación de Hsp90 al ser tratada con cisplatino .....	33
5.4. Identificación de señales de muerte de células MES-OV al ser tratadas con cisplatino.....	36
5.5. Cambios en la fragmentación del DNA de las células MES-OV (ATCC) al ser tratadas con cisplatino.....	38
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>8. SUGERENCIAS .....</b>	<b>42</b>

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **ANEXOS**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características clínicas y moleculares de los tipos más comunes de carcinomas ováricos...	10
<b>Figura 2.</b> Células de la línea MES-OV .....	28
<b>Figura 3.</b> Prueba de viabilidad con MTT .....	29
<b>Figura 4.</b> Células MES-OV (ATCC) al ser tratadas con cisplatino .....	31
<b>Figura 5.</b> Proteína de shock térmico Hsp70 intracelular... ..	33
<b>Figura 6.</b> Proteína de shock térmico Hsp70 periferia .....	34
<b>Figura 7.</b> Proteína de shock térmico Hsp90 intracelular... ..	36
<b>Figura 8.</b> Proteína de shock térmico Hsp90 periferia .....	37
<b>Figura 9.</b> Señales de muerte identificadas con kit <i>apoptosis/necrosis abcam</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Identificación de cambios en la fragmentación del DNA kit TUNEL 647 .....	41



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfica 1.</b> Concentraciones de cisplatino para obtener la DL25, DL50 y DL70 a las 24 horas.....	31
---	----

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación por etapas del cáncer de ovario, trompas de Falopio, y peritoneo.....	12
<b>Tabla 2.</b> Determinación de proteína de shock térmico Hsp70 .....	32
<b>Tabla 3.</b> Determinación de proteína de shock térmico Hsp90 .....	36

## GLOSARIO

**HSP's:** Proteínas de choque térmico

**CDDP:** Cisplatino

**DL:** Dosis letal

**AECC:** Asociación Española Contra el Cáncer

**DMSO:** Dimetil sulfoxido

**PE:** Ficoeritrina

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**ER:** Retículo endoplásmico

**7-AAD:** 7- aminoactinomicina D

## RESUMEN

El cáncer de ovario es la séptima neoplasia maligna en Colombia y en el mundo, con un incremento en el porcentaje de muertes en mujeres de 45 a 50 años de acuerdo con el último reporte registrado por el sistema de información de cáncer - SICC (1). El diagnóstico de cáncer de ovario es uno de los más difíciles debido a que las mujeres con cáncer en estadios I y II de la escala FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) no presentan ningún síntoma, razón por la cual, el diagnóstico de esta patología se realiza en estadios III y IV.

El tratamiento en los estadios III y IV incluye una terapia combinada basada en compuestos platinos y taxanos. Sin embargo, aproximadamente del 10 al 15% de los pacientes hacen resistencia a esta quimioterapia (2). A partir del sexto al doceavo mes las pacientes hacen resistencia al cisplatino, lo que conduce a la muerte.

La literatura internacional ha sugerido a las proteínas de choque térmico (HSP's) como posibles causantes de la refractariedad a los fármacos. Las HSP's son una familia de proteínas que cumplen funciones de chaperonas moleculares en la mayoría de procesos químicos y moleculares que realiza la célula (2).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue identificar si las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 cambian su expresión intracelular y en la membrana celular de la línea celular MES-OV de cáncer de ovario y de origen humano al ser tratada a diferentes concentraciones de cisplatino.

Para esto se usó epi-inmunofluorescencia directa y se identificó la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90. Se encontró que al tratar la línea celular MES-OV con concentraciones de 111.4 $\mu$ M, 148.6  $\mu$ M, 185.8  $\mu$ M de cisplatino la proteína

Hsp70 intracelular aumenta del 61.9% al 100% y del 37% al 98% en membrana celular, también se encontró que la Hsp90 intracelular aumenta de 91.2% al 99.5%, sin embargo, en membrana se encontró que pasa de 59.5% a 8% al ser tratada con 111.4  $\mu\text{M}$ , a 17.6% al ser tratada con 148.6  $\mu\text{M}$  y a 63.2% al ser tratada con 185.8  $\mu\text{M}$  de cisplatino.

Este hallazgo sugiere que las proteínas de choque térmico están involucradas en el mecanismo de adaptación y resistencia de las células tumorales al cisplatino.

**Palabras clave:** proteínas de choque térmico, cáncer de ovario, cisplatino.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial. El riesgo que tienen las mujeres de padecer esta neoplasia es de 1 en 78 con una probabilidad de muerte de aproximadamente 1 en 108 (3).

Este tipo de cáncer es diagnosticado principalmente en mujeres entre los 45 a los 75 años de edad (1). Esta neoplasia maligna puede causar diferentes signos y síntomas que tienden a ser persistentes que suelen ser graves y presentarse con mayor frecuencia, donde se destaca el cansancio, dolor de espalda, dolor durante las relaciones sexuales, cambios en el período menstrual, que incluyen sangrado profuso o sangrado irregular e hinchazón abdominal con pérdida de peso (3). No obstante, en la actualidad no existe ningún método eficaz que facilite el diagnóstico temprano de esta neoplasia maligna, por lo cual el 75% de los casos se diagnostican en fases avanzadas (3).

En Colombia, el diagnóstico de cáncer de ovario consta del examen físico mediante ecografía, medición sérica de marcadores tumorales como el CA125 y posteriormente la intervención quirúrgica por laparotomía exploratoria para confirmar el diagnóstico (4). En los últimos años, las mujeres que padecen de este tipo de cáncer hacen resistencia al cisplatino, la cual se observa a partir del sexto o doceavo mes de administración del fármaco y como consecuencia un porcentaje de respuesta al cisplatino inferior o igual del 10%(4).

Es de interés conocer el efecto del cisplatino sobre la expresión de la proteína de choque térmico 70 y 90 (Hsp70 y Hsp90) en la línea celular de cáncer de ovario MES-OV, de esta

forma se podrían postular como proteínas que participan en el mecanismo de adaptación y resistencia de la célula tumoral a este quimioterapéutico.

El mal funcionamiento de las chaperonas moleculares puede deberse a modificaciones post-traduccionales patológicas como oxidación, fosforilación, acetilación o glicación que causa pérdida o ganancia de la función. En algunas neoplasias, las proteínas de choque térmico o chaperonas moleculares pueden favorecer el crecimiento y proliferación de células malignas ayudando a la formación del tumor (5). La acción antiapoptótica de Hsp90 ha sido demostrada por su interacción con proteínas de la familia de las quinasas al generar señales de supervivencia en respuesta al estímulo de factores de crecimiento favoreciendo a la supervivencia celular (6). Por otra parte, Hsp70 interfiere con la apoptosis inhibiendo la formación del apoptosoma, uniéndose directamente a APAF-1 evitando su oligomerización y bloqueando el ensamblaje del apoptosoma (7).

En este trabajo se evaluó “in vitro” la expresión de Hsp70 y Hsp90 intracelular y en membrana usando métodos inmunológicos al adicionar 111.4 $\mu$ M, 148.6  $\mu$ M y 185.8  $\mu$ M de cisplatino a las células MES-OV (ATCC) induciendo dosis letales 25, 50 y 70. Se usó epi-inmunofluorescencia directa para identificar la expresión de las proteínas y señales de muerte celular. Se usó 7-AAD y Apopxin para detectar señales de apoptosis o necrosis y para identificar señales de fragmentación del DNA se usó el ensayo de TUNEL.

La identificación de las proteínas de choque térmico en pacientes con cáncer podría ser una herramienta útil para el seguimiento y la evolución de la neoplasia además de determinar si el tratamiento de quimioterapia es eficaz.

## 2. ANTECEDENTES

Diversos estudios han identificado el rol de las proteínas de choque térmico en procesos de adaptación oncogénica ya que permite el plegamiento de proteínas aberrantes, en el cual las HSP's ayudan al plegamiento de proteínas involucradas en la proliferación celular, entre otros; por este motivo han sido postuladas como posibles blancos terapéuticos contra el cáncer.

Alaiya A. *et al* (8) identificó mediante electroforesis en gel bidimensional la expresión de varias proteínas en tumores ováricos, detectando la sobreexpresión de proteínas de choque térmico, entre los cuales se encontró la Hsp90. Los autores sugirieron que esta proteína está involucrada en la presentación de antígenos tumorales en la superficie celular.

De igual forma, las HSP's podrían ser un blanco ideal para crear marcadores tumorales ayudando al diagnóstico de cáncer. Luo L. *et al* (9) en el año 2002, identificaron antígenos tumorales en cáncer de ovario mediante análisis serológicos en líquido ascítico utilizando la técnica de ADN complementario (cDNA) recombinante de cinco pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario, en la cual concluyeron que Hsp90 puede representar un nuevo biomarcador para el cáncer de ovario. Adicional a esto, identificaron anticuerpos contra la Hsp90, lo cual podría indicar que podría ser utilizada como vacuna contra el cáncer de ovario.



Por otra parte, Özlem G. *et al* (10) en el año 2003, determinaron mediante inmunohistoquímica la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp27, Hsp70 y Hsp90 asociadas a parámetros clínico patológicos y de supervivencia en carcinomas epiteliales de ovario, en donde encontraron que la expresión de Hsp70 Y Hsp90 no tenía valor pronóstico, ni relevancia en carcinomas epiteliales de ovario, sin embargo, la expresión de Hsp27 en estos tumores podrían ser indicadores confiables de pronóstico para el cáncer de ovario.

La resistencia a los fármacos utilizados en la quimioterapia ha sido un factor importante en mujeres con cáncer de ovario, indicando un mal pronóstico y un tiempo de supervivencia inferior a los 5 años. Chu S. *et al* (11) demostraron en la línea celular SKOV3 (ATCC), que la proteína HSP90AA1 se sobreexpresa, infiriendo que esta proteína podría funcionar como un factor de supervivencia en las células de cáncer de ovario promoviendo a la quimioresistencia al cisplatino. No obstante, Yang X. *et al* (12) en el año 2012, demostraron que en células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino (OV2008 y A2780cp), no se da la translocación de Bax a las mitocondrias impidiendo la liberación de citocromo C, Smac/ DIABLO y HrtA2 /Omi. Los autores concluyeron que la translocación de Bax a la mitocondria se ve alterada en las células quimiorresistentes al demostrar que Hsp70 previene la translocación mitocondrial de Bax, siendo un determinante importante de la resistencia al cisplatino en células de cáncer de ovario.

### **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1 Cáncer de ovario**

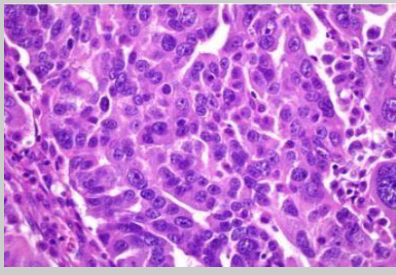
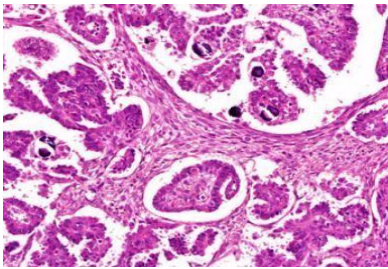
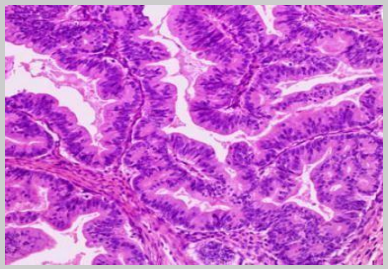
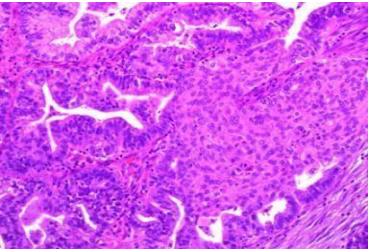
La carcinogénesis es un fenómeno en donde existe la transformación de células normales a células malignas generalmente por una serie de mutaciones que le permite a la célula dividirse sin necesidad de algún tipo de señal, es decir es autónoma y tiene la capacidad de generar una descendencia que conserva la mutación, es decir un clon. Posteriormente las células descendentes acumulan diversas mutaciones y permite generar nuevos clones que presentan mayor capacidad de crecimiento, sobrevida y altas tasas de proliferación logrando un fenotipo diferente a la célula de origen. Las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fueron expuestas al descubrir el genoma humano, mostrando que existen genes homólogos a virus retrovirales relacionados con el desarrollo de tumores. Cuando dicha proteína se encuentra mutada se denomina oncogén y es de tipo dominante, el cual incrementa la sobrevida y la proliferación de las células tumorales (13).

Para que las mutaciones que inician en las células tumorales alcancen a persistir en una célula y den origen a su clon, la célula y su microambiente deben dar efectos fundamentales como la inestabilidad genómica que consiste en la presencia y acumulación de mutaciones y la inflamación tumorogénica en donde interactúan células del sistema inmune y células anormales estableciendo el microambiente tumoral (13). El último reporte encontrado en la página de información de cáncer en Colombia revela que en el año 2012 hubo una incidencia de aproximadamente 111 mujeres y un promedio de 517 mujeres fallecidas por la patología (1).

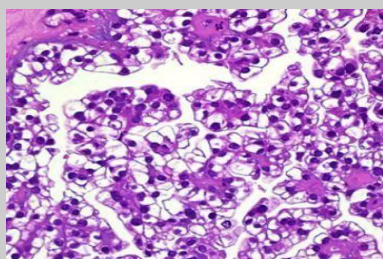
Alrededor del 90% de la presencia del cáncer de ovario son carcinomas, y basado en histopatología, análisis molecular y genético e inmunohistoquímica actualmente se

distinguen los siguientes tipos principales: carcinoma seroso de alto y bajo grado, carcinoma endometriode, carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso. Estos tipos de tumores según el autor Prat J. (14) son enfermedades inherentemente diferentes puesto que presentan diferencias en factores de riesgo epidemiológico y genético, por lesiones precursoras, por la respuesta a la quimioterapia y por eventos moleculares durante la oncogénesis.

**Figura1. Características clínicas y moleculares de los tipos más comunes de carcinomas ováricos.**

	<p><b>Tipo de carcinoma:</b> HGSC  <b>Factores de Riesgo:</b> BRCA1/2  <b>Lesiones Precursoras:</b> Carcinoma intraepitelial tubarico.  <b>Patrón de Propagación:</b> Difusión transcelómica muy temprana.  <b>Anormalidades Moleculares:</b> BRCA, p53  <b>Quimiosensibilidad:</b> Alto  <b>Pronóstico:</b> Malo</p>
	<p><b>Tipo de carcinoma:</b> LGSC  <b>Factores de Riesgo:</b> ¿?  <b>Lesiones Precursoras:</b> Tumor borderline seroso.  <b>Patrón de Propagación:</b> Difusión transcelómica.  <b>Anormalidades Moleculares:</b> BRAF, KRAS.  <b>Quimiosensibilidad:</b> Intermedio  <b>Pronóstico:</b> Intermedio</p>
	<p><b>Tipo de carcinoma:</b> MC  <b>Factores de Riesgo:</b> ¿?  <b>Lesiones Precursoras:</b> cistadenoma / tumor borderline?  <b>Patrón de Propagación:</b> Generalmente confinado al ovario.  <b>Anormalidades Moleculares:</b> KRAS, HER2  <b>Quimiosensibilidad:</b> Bajo  <b>Pronóstico:</b> Favorable</p>
	<p><b>Tipo de carcinoma:</b> EC  <b>Factores de Riesgo:</b> HNPCC  <b>Lesiones Precursoras:</b> Endometriosis atípica  <b>Patrón de Propagación:</b> Por lo general, confinado a la pelvis  <b>Anormalidades Moleculares:</b> PTEN ARID1A  <b>Quimiosensibilidad:</b> Alto</p>

**Pronóstico:** Favorable



**Tipo de carcinoma:** CCC  
**Factores de Riesgo:** ¿?  
**Lesiones Precursoras:** Endometriosis atípica  
**Patrón de Propagación:** Por lo general, confinado a la pelvis  
**Anormalidades Moleculares:** HNF1 ARID1A  
**Quimiosensibilidad:** Bajo  
**Pronóstico:** Intermedio

Fuente: Información extraída y editada de Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. 2012, 460(3), 237–249. <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1203-5>. HGSC Carcinoma seroso de alto grado, LGSC Carcinoma seroso de bajo grado, MC Carcinoma mucinoso, EC Carcinoma endometriode, CCC Carcinoma de células claras, HNPCC Carcinoma colorrectal hereditario no polipósico.

La estadificación del cáncer de ovario se realiza por medio de una biopsia quirúrgica de la zona afectada y del líquido abdominal usando la escala FIGO. En el año 2013 se realizaron cambios a esta escala FIGO de cáncer de ovario, trompas de Falopio y cancer peritoneal primario, el cual fue liderado por el Comité Para La Oncología Ginecológica-FIGO donde exponen nuevos criterios para describir los estadios del cáncer ginecológico (15).

**Tabla 1.** Clasificación por etapas para el cáncer de ovario, trompa de Falopio, y peritoneo.

<b>Estadio</b>	<b>Etapas Del Cáncer</b>	<b>Categoría</b>
<b>I</b>	<b>Tumor limitado a ovarios o trompas de Falopio</b>	<b>T1-N0-M0</b>
IA	Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta) o a trompa de Falopio; sin tumor en la superficie del	T1a-N0-M0

tubo ovárico o de trompa de Falopio; no hay células malignas en ascitis y en lavados peritoneales.

IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsula intacta) o a trompas de Falopio; sin tumor en la superficie del tubo ovárico o de trompa de Falopio; no hay células malignas en lavados peritoneales.	T1b-N0-M0
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio, con cualquiera de las siguientes características:	
IC1	Derrame quirúrgico	T1c1-N0-M0
IC2	Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o presencia de tumor en la superficie del ovario o la trompa de Falopio	T1c2-N0-M0
IC3	Células malignas en ascitis o en lavados peritoneales.	T1c3-N0-M0
<b>II</b>	<b>El tumor incluye uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con extensión pélvica (debajo del borde pélvico). También puede presentar cáncer peritoneal primario</b>	<b>T2-N0-M0</b>
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o en las trompas de Falopio y/o los ovarios.	T2a-N0-M0
IIB	Extensión a otros tejidos intraperitoneales pélvicos.	T2b-N0-M0
<b>III</b>	<b>El tumor involucra uno o ambos ovarios o trompas de Falopio, o puede presentar cáncer peritoneal primario con extensión confirmada citológica o histológicamente al peritoneo fuera de la pelvis y/o metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.</b>	
IIIA1	Ganglios linfáticos retroperitoneales positivos (citológicamente o histológicamente comprobados)	T1/T2-N1-M0
IIIA1(i)	Metástasis de hasta 10 mm en la dimensión más grande	
IIIA1(ii)	Metástasis de más de 10 mm en la dimensión más grande	
IIIA2	Implicación peritoneal microscópica extrapélvica (sobre el borde pélvico) con o sin ganglios linfáticos retroperitoneales positivos	T3a2-N0/N1-M0
IIIB	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis con aumento de hasta 2 cm de diámetro, con	T3b-N0/N1-M0

o sin metástasis a la región retroperitoneal de ganglios linfáticos

IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis con diámetro mayor de 2 cm, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluye la extensión del tumor a la cápsula de hígado y bazo sin afectación parenquimatosa de ninguno de los órganos)	T3c-N0/N1-M0
IV**	<b>Metástasis a distancia que excluye metástasis peritoneales</b>	<b>M1</b>
IVA	Derrame pleural con citología positiva	M1a
IVB	Metástasis parenquimatosas y metástasis a órganos extraabdominales (incluidos los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal).	M1b

Fuente: Información tomada de Prat, J., & Committee, F. (2013). International Journal of Gynecology and Obstetrics Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum ☆ . International Journal of Gynecology and Obstetrics, 124, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>  
T: extensión del tumor; N: propagación a los ganglios linfáticos regionales (N0: sin metástasis de ganglios linfáticos regionales; N1: metástasis de los ganglios linfáticos regionales); M: propagación a sitios distantes (M0: sin metástasis a distancia; M1: metástasis a distancia). \*\*El estadio IV puede presentar o no T o N.

### 3.2 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico- HSP's son macromoléculas altamente conservadas encontradas en todas las células de los seres vivos cumpliendo diversas funciones en donde se destaca la de chaperona molecular. Las HSP's están constantemente involucradas en el plegamiento de las proteínas nacientes que sintetiza la célula y sobreexpresadas como respuesta en células bajo condiciones de estrés. Asimismo, las HSP's participan en varios procesos celulares importantes como ensamblaje, secreción, tráfico de proteínas, degradación de proteínas aberrantes y regulación de los factores de transcripción. Del mismo modo se ha descrito que las HSP's son proteínas que juegan

papeles importantes en la supervivencia celular debido a la intervención que tiene en mecanismos citoprotectores (16).

La proteína Hsp70 es un componente central de la red celular de chaperonas moleculares. La Hsp70 proteína citoplasmática ayuda a una gran variedad de procesos de plegamiento de proteínas en la célula mediante la asociación transitoria de su dominio de unión a sustrato con segmentos peptídicos hidrofóbicos cortos encontrados en las proteínas cliente. La función de Hsp70 requiere una acción coordinada de los tres dominios que la conforman. La Hsp70 consta de: un dominio amino terminal de 44 kDa que une e hidroliza ATP y un dominio carboxilo terminal de 30 kDa que contiene el dominio de unión al péptido. La unión del sustrato se produce en una región hidrofóbica en el SBD con una afinidad y cinética dependientes del estado de nucleótidos del NBD. La forma de Hsp70 unida a ATP tiene una baja afinidad de unión al sustrato y una tasa de intercambio rápido, mientras que la forma unida a ADP muestra una afinidad más alta y tasas de cambio más lentas. Hsp70 revela que los dos tercios amino terminal de esta proteína está mucho más conservados que la región carboxilo terminal lo que explica que haya un dominio ATPasa conservado seguido de una región de unión al péptido variable (14,17).

La principal diferencia entre ATP y ADP es la ubicación del dominio carboxilo terminal, que se coloca sobre la región de unión del sustrato cuando ADP está unido y por lo tanto, reduce la liberación del sustrato unido. Los cambios estructurales en el NBD sobre la hidrólisis de ATP inducen los cambios conformacionales en el SBD y en el dominio carboxilo terminal que conducen a esta retención de sustrato, lo que indica una fuerte comunicación entre los dominios. En consecuencia, el sustrato al acoplarse al SBD altera

su estructura de forma que transmite una señal al NBD que estimula la hidrólisis de ATP, y por lo tanto, aumenta su afinidad de unión a Hsp70. Posteriormente, los factores de intercambio de nucleótidos promueven la liberación de ADP, lo que le facilita a Hsp70 adquirir nuevas moléculas de ATP y por lo tanto permite la restauración de la proteína al estado de baja afinidad que permite la liberación del sustrato (14,17).

La Hsp90 es una de las proteínas más abundantes de la familia de proteínas de choque térmico. Esta proteína citoplasmática está involucrada en muchos procesos celulares más allá del plegamiento de proteínas, que incluyen la reparación del DNA, el desarrollo, la respuesta inmune y enfermedad neurodegenerativa. La Hsp90 consta de 3 dominios estructurales altamente conservados: el dominio amino terminal (NTD), que media vinculante para ATP; el dominio medio (MD), que es importante para la hidrólisis de ATP y la unión de HSP90 a las proteínas clientes; y el dominio carboxilo terminal (CTD), que es responsable de la dimerización de Hsp90. También posee un motivo funcional importante que interactúa con sus co-chaperonas (MEEVD) y está formada por Met-Glu-Glu-Val-Asp. En la ausencia de ATP hsp90 adopta una conformación abierta en forma de "V" pero cuando la Hsp90 se encuentra regulada por ATP induce reordenamientos que conducen a un dominio amino terminal cerrado. Tras la unión de ATP existen nuevos ajustes en el NTD asegurando nuevos aminoácidos conservados, en donde la denominada "bisagra" se cierra unido al ATP conduciendo a un estado intermedio en donde se dimeriza NTD y luego se asocia con el dominio medio con la finalidad de hidrolizar el ATP. Después de la hidrólisis, los NTD se disocian y se libera ADP y fosfato inorgánico (Pi) y HSP90 vuelve a la conformación abierta en forma de "V" (18).



### **3.3 Proteínas de choque térmico en cáncer**

En cáncer de ovario Stope et al<sup>12</sup> muestra que las proteínas Hsp27, Hsp70 y Hsp90 controlan funciones ováricas como la regulación de la foliculogénesis, la homeostasis hormonal y en la regulación de los mecanismos apoptóticos. Cuando las células ováricas son estimuladas hormonalmente, induce a la expresión de Hsp27 y Hsp90 el cual están involucrados en el desarrollo del folículo ovárico. También demostró que Hsp70 actúa como un inhibidor de los efectos esteroideos; altos niveles de esta proteína se correlaciona con la regulación negativa del receptor de estrógeno y la expresión del receptor de progesterona. También se ha demostrado en diversos tejidos que las HSP's, particularmente Hsp70 y Hsp90 controlan la funcionalidad del receptor de esteroides nucleares y el receptor de andrógenos sugiriendo que la modulación dependiente de HSP de la fisiología del ovario sano esté impulsada principalmente por el control del receptor de esteroides sexuales (19).

Las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 en tumores malignos suelen estar sobreexpresadas correlacionándose con la tasa de proliferación celular y malignidad. La Hsp70 inhibe la apoptosis en múltiples puntos, en la vía intrínseca inhibe a la activación de Bax previniendo la permeabilización de la membrana mitocondria y liberación de factores proapoptóticos. En la vía extrínseca la Hsp70 actúa inhibiendo la unión del Complejo de Iniciación de Señalización de Muerte evitando la cascada de las caspasas. Asimismo, esta proteína es crucial para en el mantenimiento de la integridad del DNA uniéndose a la poli (ADPribosa) polimerasa-1 (PARP-1) y adicionalmente tiene funciones de reparación del DNA por el sistema de escisión. Hsp90 tiene un papel en el surgimiento

de polimorfismos y mutaciones que ayudan a la evolución de clones resistentes además de estabilizar las conformaciones de proteínas mutantes que surgen durante la transformación como p53 (16).

Además de ser secretado libremente, las proteínas de choque térmico también se pueden liberar de las células dentro de estructuras vesiculares conocidas como exosomas, y de esta forma ejercer efectos inflamatorios o inmunosupresores dependiendo de la naturaleza de las células blanco. La Hsp90 que interactúa con al menos dos proteínas de la superficie celular en donde se incluye la metaloproteína 2 de la matriz de proteasa extracelular (MMP2), factor clave en la progresión del cáncer y el receptor de LDL LRP1. Estos efectos fueron mediados principalmente por Hsp90-alfa mientras que Hsp90-beta, se mantuvo en gran medida a nivel intracelular. Hsp90 extracelular podría desencadenar el crecimiento del tumor, en este caso a través de la activación sostenida de la vía MEK / ERK. Además, Hsp90 extracelular podría desencadenar un cambio morfológico-transición mesenquimal epitelial (EMT): una transformación celular que se asoció con pérdida del marcador epitelial E-cadherina (19).

### **3.4 Cisplatino**

#### 3.4.1 Mecanismo de acción

El cisplatino es un fármaco utilizado en la quimioterapia clasificada en los agentes derivados del platino. El fármaco se activa una vez que ingresa a la célula. Una vez en el citoplasma, los átomos de cloruro que contiene la molécula de cisplatino son desplazados

por moléculas de agua. Este producto hidrolizado es un electrófilo potente que puede reaccionar con cualquier nucleófilo en donde se encuentra incluidos los grupos sulfhidrilo en las proteínas y los átomos donadores de nitrógeno en los ácidos nucleicos. El cisplatino se une al centro reactivo del nitrógeno 7 en residuos de purina causando daños en el ácido desoxirribonucleico (DNA) en las células cancerosas bloqueando la división celular y en muerte celular programada (apoptosis). Los enlaces intracatenarios de bases de purina con cisplatino son los más frecuentes y notables en los cambios del DNA, sin embargo pueden ocurrir enlaces intercatenarios y aductos no funcionales que contribuyen a la toxicidad del cisplatino al modular los genes de expresión; sin embargo este fármaco aparte de inducir apoptosis, también puede inducir estrés oxidativo, implicarse en vías de señalización como PKC, MAPK, JNK, p38 MAPK, AKT, p53 (22).

La apoptosis es un tipo controlado de muerte celular que depende de energía y conduce a la contracción celular, condensación de cromatina, gemación de membrana, externalización de fosfatidilserina y activación de la familia de cisteína proteasas llamadas caspasas. La activación de las caspasas es el paso clave en el comienzo de la apoptosis iniciando la cascada con las caspasas 8 y 9. Un defecto en las vías de señalización apoptóticas podría ser una de las causas de resistencia a cisplatino. Hay dos vías principales de apoptosis la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca se inicia cuando los ligandos se unen al receptor del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) seguido de oligomerización e incorporación de la procaspasa 8 a través de moléculas adaptadoras para formar el complejo de señalización de inducción a muerte (DISC). La vía intrínseca se inicia por el estrés celular, en este caso como el daño del DNA, lo que resulta en la inducción de las proteínas de la familia Bcl-2 y así liberar el citocromo-c de las

mitocondrias que causan la activación de procaspasa-9 a través de la interacción con la proteína peptidasa apoptótica activadora del factor 1 y así formar el apoptosoma (16, 20).

El estrés genotóxico inducido por cisplatino activa múltiples vías de transducción que pueden contribuir a la apoptosis anteriormente mencionada o a la resistencia a la quimioterapia. Esa resistencia puede estar mediada por las HSP's por tal razón, se espera cambios en la expresión de estas proteínas en desarrollo de resistencia celular al fármaco (20).

#### 3.4.2 Efectos secundarios del cisplatino

La insuficiencia renal se relaciona con el daño tubular que se puede observar, durante la segunda semana después de la dosis del fármaco suministrada y se manifiesta mediante un aumento en la creatinina sérica, el BUN, el ácido úrico sérico o mediante una disminución de la depuración de creatinina. La insuficiencia renal es generalmente de leve a moderada y reversible bajo las dosis usuales del medicamento; sin embargo, dosis altas o repetidas de cisplatino pueden aumentar la gravedad y la duración de la insuficiencia renal produciendo que sea irreversible. También puede presentar neuropatías que ocurren infrecuentemente con dosis usuales del medicamento. Estas son sensoriales por naturaleza pero también pueden incluir dificultades motrices, reflejos reducidos y debilidad en las piernas, también se han reportado neuropatía autónoma, convulsiones, dificultad en el habla, pérdida del gusto y de la memoria. Estas neuropatías aparecen luego de un tratamiento prolongado, pero también se han desarrollado después

de una dosis única del medicamento. La neuropatía periférica puede ser irreversible en algunos pacientes; sin embargo, ha sido parcial o completamente reversible en otros, después de la interrupción del tratamiento con cisplatino. Las náuseas y vómitos ocurren en la mayoría de los pacientes tratados con cisplatino; por lo general, se inician dentro de la primera hora del tratamiento y duran hasta 24 horas o más. Estos efectos adversos se alivian solo parcialmente con antieméticos estándar y la gravedad de estos síntomas puede reducirse mediante la división de la dosis total por ciclos en dosis más pequeñas (21).

## **4. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1 TIPO DE ESTUDIO**

Estudio experimental.

### **4.2 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

#### **4.2.1. Cultivo celular línea MES-OV**

Para realizar el cultivo celular se tomó un vial de la línea celular MES-OV de la cámara de nitrógeno líquido y se procedió a descongelar durante 2 minutos a 37°C. Posteriormente, el contenido del vial se traspasó a un tubo falcón de 15 mL, se adicionó 4 mL de medio RPMI+ SFB 10% y se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionó al precipitado 3 mL de medio RPMI+ SFB 10%, se homogenizó y el contenido se sembró en una caja de cultivo T25, se incubó en una

atmosfera de 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El crecimiento fue supervisado diariamente hasta que las células (MES-OV) alcanzaban una confluencia del 70 al 80% (22).

#### **4.2.2 Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Células en confluencia del 70% fueron tratadas con 2 mL de tripsina al 0.5 % e incubando por 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionó 3 mL de medio RPMI + SFB al 10%, se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y al precipitado obtenido se le adicionó 1 mL de medio RPMI+ SFB 10% y se homogenizó. Se realizó el conteo celular usando cámara de Neubauer, para esto se adiciono a la cámara 4 µL de células y 6 µL de azul tripán obteniendo los 10 µL necesarios para ocupar la profundidad de la cámara y así iniciar a contar las células. Se contó las células que no estaban teñidas con azul tripán localizadas en los cuatro cuadrantes encontrados en las esquinas de la cámara y el número de células contadas se multiplicó por 10.000 y se dividió por 4 (total de los cuadrantes contados); obteniendo el número de células viables por microlitro.

Posteriormente, se sembraron  $3 \times 10^5$  células de la línea MES-OV por cada pozo hasta completar los 96 pozos de la caja de cultivo y se dejó incubar por 24 horas para permitir la adherencia de las células. Después las células se trataron con cisplatino y para esto se inició con 200 µM, como la concentración más alta (definida por revisión de la literatura), a partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración final de 1,5 µM. Se incubó por 24 horas 37°C.

Una vez tratadas las células con cisplatino, se realizó el ensayo de MTT como prueba de viabilidad celular. Este ensayo mide la función de la mitocondria. Es basado en la

reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima succinato-deshidrogenasa de las células vivas. Para esto se adicionó 5  $\mu$ L de reactivo MTT por pozo, se incubó por 2 horas a 37°C, tiempo en el cual se formaron los cristales de formazán. Luego se adicionó 50  $\mu$ L de DMSO para disolver los cristales y se incubó por otras dos horas, para luego medir la densidad óptica por espectrofotometría a una longitud de onda de 490 nm. (Espectrofotómetro *Chromate*) (Este procedimiento se realiza por triplicado a las 0 (basal) 24, 48 y 72 horas y por duplicado a las 96 horas (23).

#### **4.2.3. Determinación de dosis letales por método *probit*.**

*Probit* es un método estadístico utilizado para el análisis de la relación que existe entre un estímulo y una respuesta por lo general cuantitativa (22). La identificación de la dosis letal es la determinación de la concentración de un tóxico o compuesto que induce un porcentaje de muerte a una población de estudio en un tiempo determinado. La regresión *probit* permite determinar la relación que existe entre una variable independiente (la dosis) y una variable dependiente (la respuesta). Para la determinación de la DL25, DL50 y DL70 con el método *probit*, se partió del ensayo de viabilidad celular realizado con el reactivo MTT, en donde se convirtió las concentraciones empleadas de cisplatino a logaritmo en base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) y el porcentaje de células muertas a unidades *probit*. El porcentaje de células muertas se halló promediando las densidades ópticas obtenidas a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con cisplatino, restando el promedio obtenido con la densidad óptica del control (células sin tratamiento) y posteriormente realizando

una regla de tres por cada tiempo (horas). Los porcentajes de células muertas se observa en la tabla 1.

**Tabla 1.** Porcentaje de muerte de células MES-OV a las 24, 48, 72, 96 horas post-tratamiento.

CONCENTRACIÓN	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	96 HORAS
200	62	66	71	69
100	16	49	64	67
50	12	42	55	66
25	0	47	59	63

**Fuente:** Elaboración propia

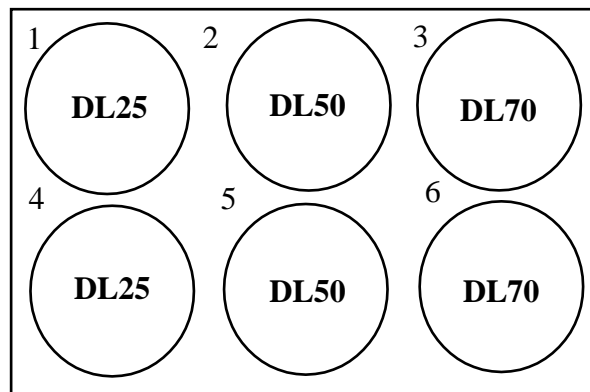
Posterior a esto, se realizó cálculos estadísticos de regresión por medio de Microsoft Excel 2010, obteniendo el intercepto y la variable en X, para emplear la siguiente formula:  $Y=ax+b$ ; siendo **Y**= la dosis letal a determinar en número *probit*, **a**= la variable en x, **b**= la intercepción y **x**= la concentración del fármaco que se debe utilizar para obtener la DL que se requiere (incógnita), cabe resaltar que este dato es obtenido en número *probit* y se debe sacar el antilogaritmo para obtener la concentración del fármaco para obtener las dosis letales (24).

#### 4.2.4. Inmunofluorescencia directa

Es una técnica de inmunomarcación que utiliza anticuerpos unidos a un fluoróforo, el cual emite una señal fluorescente para su detección. La inmunofluorescencia directa, también conocida por sus siglas IFD hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente emitiendo fluorescencia.



La presencia de las proteínas fue determinada mediante métodos inmunológicos usando la técnica de citometría de flujo FACSCanto II - Configuración 4-2-2 y mediante el microscopio de fluorescencia *Leica 2500* para visualizar las proteínas Hsp70 y Hsp90 la célula. Se sembraron  $2 \times 10^6$  de células de la línea celular de cáncer de ovario MES-OV en dos cajas multipozo de 6 con medio RPMI +SFB al 10% y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , supervisando diariamente hasta obtener  $4 \times 10^6$  células aproximadamente por pozo. Se trataron las células con  $111.4 \mu\text{M}$ ,  $148.6 \mu\text{M}$  y  $185.8 \mu\text{M}$  de cisplatino que permite obtener DL25, DL50, DL70 a las 24 horas halladas por el método *probit* y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Las concentraciones de cisplatino para obtener cada dosis letal se adicionó en el siguiente orden:



24 horas posteriores al tratamiento, se retiró el cisplatino de las dos cajas de cultivo de 6 pozos y se adicionó  $200 \mu\text{L}$  de tripsina al 0.5 % por cada pozo y se incubó por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Se tomó el contenido de los pozos por dosis letal en tubos falcón de 15 mL (tubo 1: pozos 1,4; tubo 2: pozos 2,5; tubo 3: pozos 3,6) teniendo al final 3 tubos falcón con su correspondiente dosis letal. A cada tubo falcón se adicionó 2 mL de medio RPMI + SFB al 10% y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos.

Una vez se obtuvo el precipitado celular de cada dosis letal, se adicionó 1 mL de paraformaldehído al 4% a cada tubo falcón y se incubó por 20 minutos a temperatura

ambiente con el fin de fijar las células. Un grupo de células fue permeabilizado y otro grupo no. Para determinar las proteínas Hsp70 y Hsp90 intracelulares, las células se permeabilizaron con saponina al 0.01% y para determinar la proteínas en la membrana, las células no fueron permeabilizadas. Al final se usó como controles células tratadas con cisplatino pero sin anticuerpo y células sin tratamiento para observar autofluorescencia.

#### **4.2.5 Detección de Apoptosis/Necrosis kit abcam**

Para detección de señales de muerte por apoptosis y necrosis se usó el “kit de detección de apoptosis / necrosis” de la casa comercial abcam (ab176749), el cual monitorea simultáneamente las células apoptóticas, necróticas y viables por medio de señales de fluorescencia

Se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células en laminillas cubreobjeto de 10x10 mm de diámetro, se incubo durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para obtener una confluencia del 70 al 80%, posteriormente se adiciono las concentraciones de cisplatino de 111.4 µM, 146.6 µM, y 185.8 µM correspondientes a las dosis letales 25,50, 70, respectivamente (obtenidas por el método *probit*). Las células tratadas fueron incubadas durante 24 horas 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después las células fueron lavadas con el buffer del kit y en se adiciono 1µL de indicador Apopxin, 0.5 µL de 7-AAD y 0.5 µL de Cytocalcein 450, se incubó a 37°C por 1 hora y posteriormente se lavaron las células dos veces con el buffer del kit y se procede a analizar bajo el microscopio de fluorescencia *Leica 2500*. El 7-AAD es impermeable y permite detectar células en necrosis debido a la perdida de la integridad de la membrana plasmática identificando el núcleo de las células necróticas que se pueden observar con

fluorescencia roja. Apopxin Green es un marcador que permite detectar células en apoptosis cuando estas exponen fosfatidilserina en la membrana observando una fluorescencia de color verde. La citocalceina permite detectar células vivas por la entrada del fluoróforo al citoplasma de las células viables que se puede observar con fluorescencia azul.

#### **4.2.6 Prueba de TUNEL Alexa Fluor 647**

EL ensayo de TUNEL Alexa Fluor 647 es basado en la incorporación de deoxiuridinatrifosfato (dUTPs) modificados por la enzima terminal deoxinucleodiltransferasa (TdT) al extremo 3'OH del fragmento de DNA. Esta técnica es empleada para identificar fragmentación del DNA.

Se sembraron  $1,5 \times 10^4$  células en laminillas cubreobjeto de 10x10 mm de diámetro, se incubo durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para obtener una confluencia del 70 al 80%, posteriormente se adiciono las concentraciones de cisplatino de 111.4 µM, 146.6 µM, y 185.8 µM correspondientes a las dosis letales 25,50, 70, respectivamente (obtenidas por el método *probit*). Las células tratadas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C EL ensayo de TUNEL fue realizado de la siguiente manera. Se adicionó 50 µL de buffer de reacción (reacción TdT) y se incubó por 10 minutos, tiempo en el que se une con los nucleótidos en los extremos 3' libre del DNA fragmentado. Posteriormente se removió el buffer, se lavó con PBS 1X y se adicionó 50 µL de cocktail de reacción TdT compuesto por TdT, EdUTP y TdT. Este cocktail permite catalizar la adición de los dUTPs al extremo 3' de las cadenas de DNA fragmentadas. Se adicionó 50 µL de reactivo Click-iT y se llevó a incubar por 30 minutos, permitiendo que el anticuerpo secundario se una a los dUTPs modificados. El reactivo mencionado anteriormente está compuesto por buffer de

reacción Click-iT y por el aditivo de buffer de reacción Click-iT. Por último, se adicionó 50  $\mu$ L de Hoechst para visualizar los núcleos de las células. Se dejó actuar por un minuto y se removió con PBS 1X. Las laminillas fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia *Leica 2500*, teniendo en cuenta que la longitud de onda en la que se excita el fluoróforo Alexa Fluor 647 es 650 nm y la absorbancia en la que emite fluorescencia es de 670nm y para Hoechst la absorbancia en la que se excita el fluoróforo es de 350 nm y en la que emite fluorescencia es 470 nm.

### **4.3 Estadística**

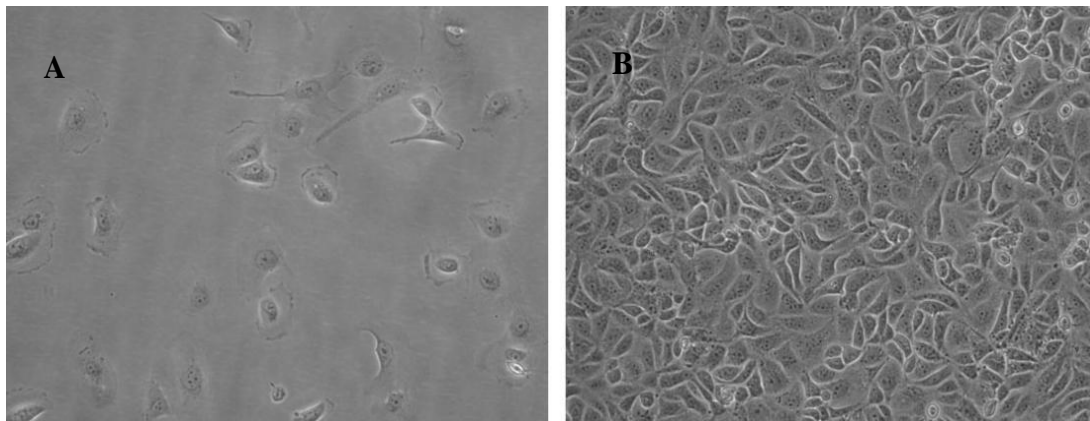
Los resultados fueron analizados con el método de T- test usando el programa Graphpad Prism versión 5.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Cultivo celular línea MES-OV

La línea celular MES-OV (ATCC) fue cultivada en medio RPMI + SFB al 10% en caja T25 al iniciar este proyecto de investigación. Esta línea presenta una morfología similar a un epitelio con propiedades adherentes como se ve reflejado en la figura 2.

**Figura 2.** Células de la línea MES-OV



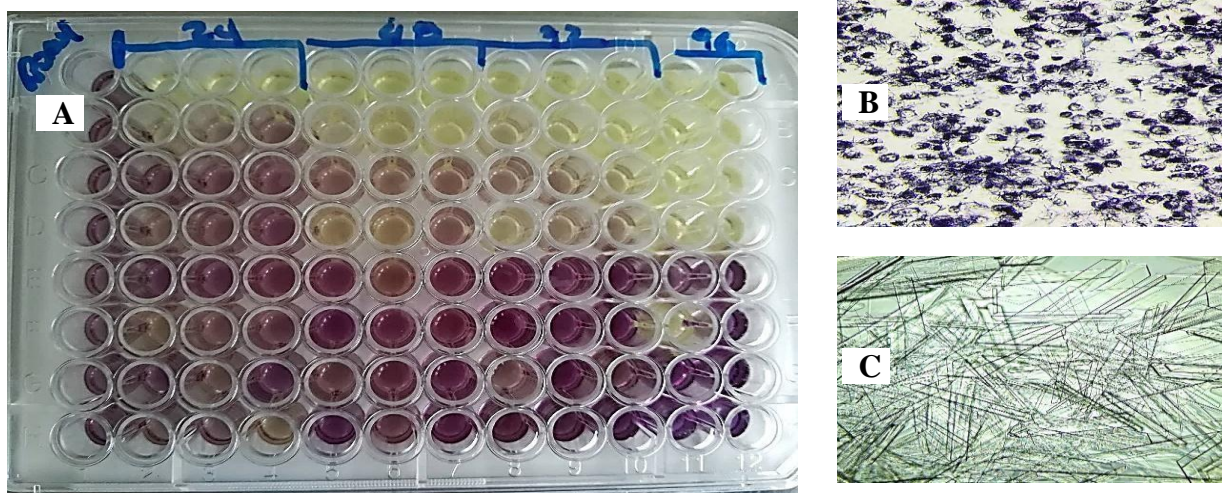
**Fuente:** Imagen tomada de ATCC the essentials of life science research, globally delivered. Disponible en: [https://www.atcc.org/en/products/cells\\_and\\_microorganisms/by\\_tissue/ovary/crl-3272.aspx](https://www.atcc.org/en/products/cells_and_microorganisms/by_tissue/ovary/crl-3272.aspx). En la figura 2 se observa morfología de las células de la línea mes-ov. a. baja densidad de células, b. alta densidad de células, confluencia de  $\pm 80\%$ .

### 5.2 Viabilidad celular con MTT

La prueba de viabilidad inició sembrando  $3 \times 10^6$  células de la línea MES-OV por pozo en una caja de 96 pozos durante 24 horas en atmósfera de  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  para obtener una confluencia del 80%.

Para examinar si el cisplatino afecta la viabilidad celular, las células MES-OV fueron tratadas con dosis de 1,5  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$  durante diferentes horas. La viabilidad fue medida usando el ensayo de MTT. La formación de cristales de formazán produce un color violeta indicando que las células son viables dado que contienen enzimas deshidrogenasas activas capaces de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazol. (Figura 3. Prueba de viabilidad con MTT)

**Figura 3.** Prueba de viabilidad con MTT

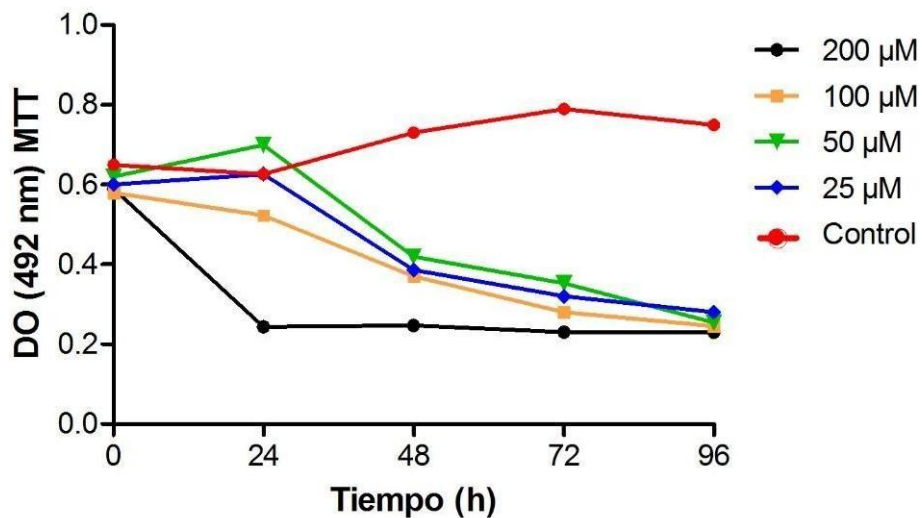


**Fuente:** Imágenes propias. **A.** caja multipozo de 96 donde se observa la escala de color a las 0,24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento con cisplatino. En la fila inferior de la caja multipozo se encuentran células sin tratamiento (control). **B.** Formación de cristales de formazán en 20X. **C.** cristales disueltos con DMSO.

La viabilidad de las células MES-OV disminuye a través del tiempo de exposición al cisplatino y a medida que aumenta la concentración del mismo, mostrado por disminución

en la densidad óptica durante el ensayo de MTT. Esto indica que el cisplatino tiene un efecto toxico sobre estas células. Adicionalmente, se observa que la concentración de 200µM disminuye la viabilidad celular un 72% aproximadamente y mantiene una viabilidad del 28% hasta las 96 horas. Las concentraciones de 25µM, 50µM y 100µM inducen disminución de la viabilidad de aproximadamente el 49% a las 48 horas y disminuye casi al 25% a las 96 horas como se observa en la gráfica 1 (ensayo de viabilidad celular en células tratadas con cisplatino)

**Gráfica 1.** Ensayo de viabilidad celular en células tratadas con cisplatino



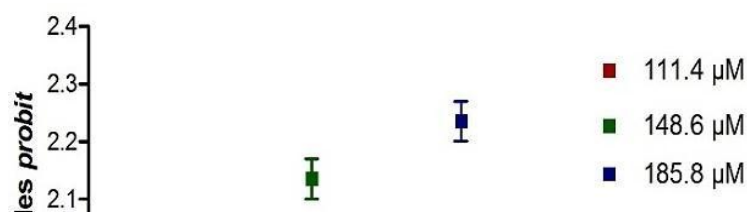
Ensayo colorimétrico de viabilidad con MTT en línea celular MES-OV tratada a diferentes concentraciones de cisplatino a través del tiempo (horas); el control contiene células MES-OV sin tratar (línea roja).

### 5.3 Determinación de dosis letales por método *probit*

Con el objetivo de determinar la DL25, DL50 y DL70, con la cual se determinara la expresión de las proteínas Hsp90 y Hsp70 , se convirtió las concentraciones empleadas de cisplatino a logaritmo en base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) y el porcentaje de células muertas se obtuvo a partir del ensayo de viabilidad celular y el resultado se convirtió a unidades *probit*. Los resultados de las concentraciones de cisplatino para inducir DL25, DL50 y DL70 a las 24 horas en unidades *probit* fueron de: 2.05, 2.10 y 2.20. Al sacar el Anti  $\text{log}_{10}$  a las unidades *probit*, las concentraciones de cisplatino fueron 111.4  $\mu\text{M}$ , 146.6  $\mu\text{M}$ , y 185.8  $\mu\text{M}$  registradas en la gráfica 2 (concentraciones de cisplatino para obtener DL25, DL50 y DL70 a las 24 horas).

A partir del resultado hallado, se trataron las células de la línea MES- OV con esas concentraciones y los cultivos se observaron a las 24 horas mediante el microscopio invertido *Leica* como se observa en la figura 4. Al ser tratadas las células MES-OV con las concentraciones de cisplatino halladas mediante el método *probit* (111.4  $\mu\text{M}$ , 146.6  $\mu\text{M}$ , y 185.8  $\mu\text{M}$ ) se observó muerte celular en los cultivos y a su vez, aumentó al incrementar la concentración del fármaco.

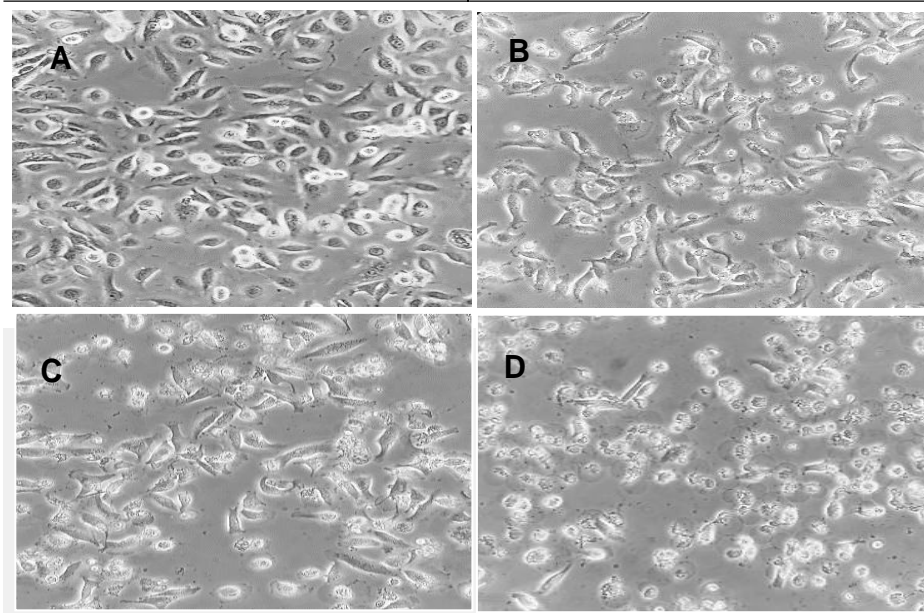
**Gráfica 2.** Concentraciones de cisplatino para obtener la DL25, DL50 y DL70 a las 24 horas.





Determinación de dosis letales de CDDP para la línea celular MES-OV basado en metodología *probit*. En color rojo se observa la concentración para hallar la DL25, en color verde se observa la concentración para hallar la DL50 y en color azul se observa la concentración para hallar la DL70 tanto en unidades *probit* como en  $\mu\text{M}$  a las 24 horas.

**Figura 4.** Células MES-OV al ser tratadas con cisplatino.



**Fuente:** Propia. Imagen tomada con microscopio invertido Leica DM IL LED. **A.** Células MES-OV sin tratamiento; **B.** Células MES-OV tratada con DL25 de CDDP, **C.** Células MES-OV DL50 de CDDP, **D.** Células MES-OV DL70 de CDPP.

#### **5.4 Determinación de Hsp70 en línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino mediante la técnica de Inmunofluorescencia.**

La proteína Hsp70 ha sido relacionada con procesos de carcinogénesis y/o resistencia a fármacos en varios tipos de cáncer (4,12). En este trabajo se identificó el efecto de la concentración del cisplatino con concentraciones que inducen DL25, DL50 y DL70 cambian su expresión respecto a células sin tratamiento. Para esto se llevó a cabo la técnica de epi-inmunofluorescencia después de cultivar las células MES-OV y tratarlas con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino.

Posteriormente se tomaron 50.000 células (aproximadamente) de células que fueron permeabilizadas para detectar la proteína intracelular. Se encontró que la proteína se sobreexpresa a nivel intracelular y en membrana en las células MES-OV con respecto a las células sin tratamiento (cisplatino). Se detectó que el cisplatino induce aumento de la proteína Hsp70 intracelular. En células sin tratamiento, se detectó una expresión del 61.9% de las células, mientras que en las tratadas con DL 25, DL50, DL70 aumentó la expresión del 99% al 100% de las células (tabla 2). Como medida del porcentaje de proteínas promedio que expresa cada célula, se evaluó la Intensidad Media de Fluorescencia- IMF que pasa de una expresión intracelular de 61.9 % a 99 % con DL25 y 100% con DL50 y DL70 y en membrana pasa de una expresión de 37% a 93% con DL25, 97% con DL50 y 98% con DL70 (ver tabla 2). Como medida de fluorescencia se graficó la intensidad media de fluorescencia – IMF, en donde se detectó que la DL25, DL50 y DL70 intracelular y en membrana aumenta. Estos resultados en conjunto muestran que la proteína de choque térmico Hsp70 aumenta su expresión en células bajo condiciones de estrés como lo muestra la tabla 2 y las figuras 5-6.

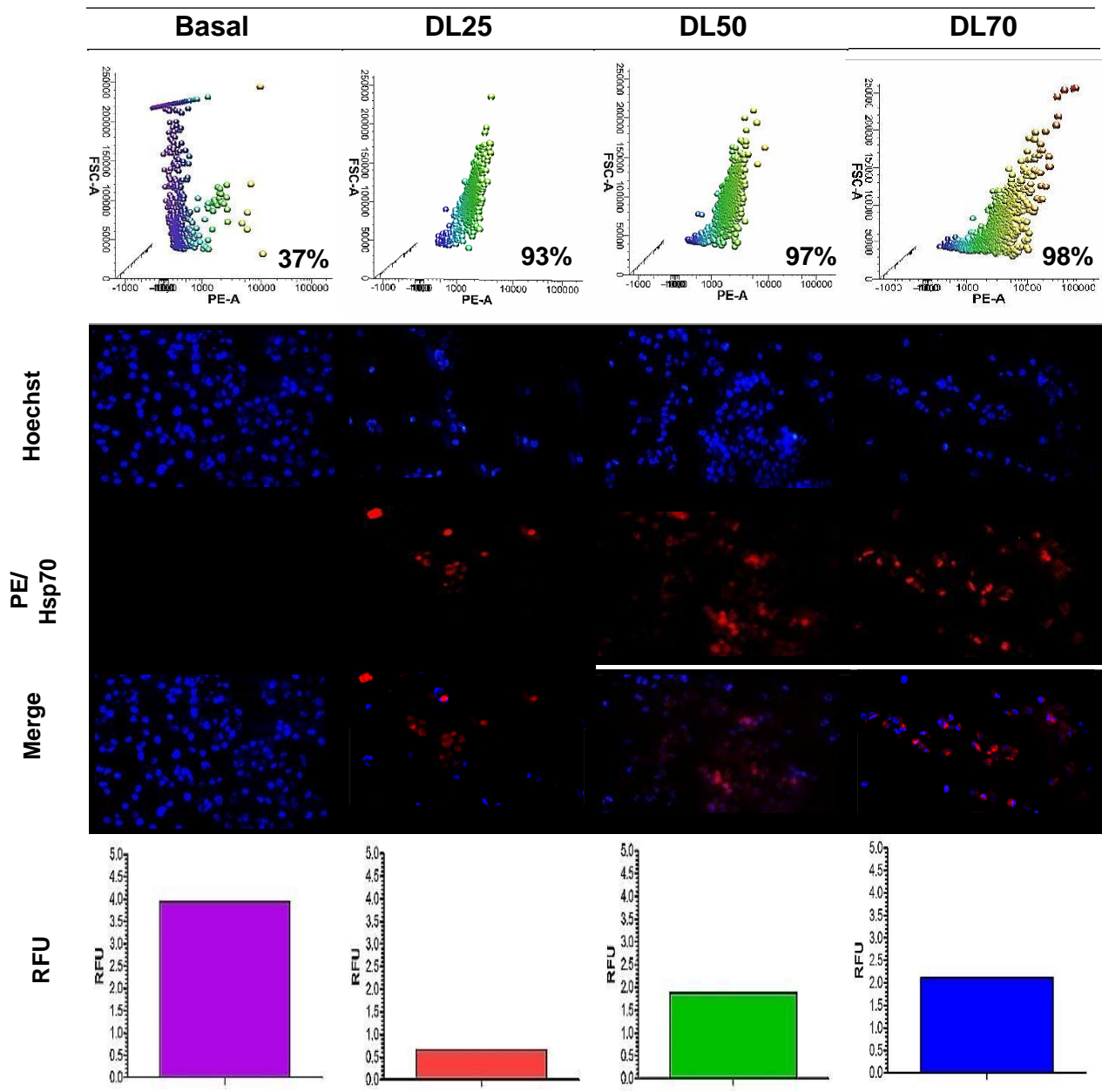
La proteína Hsp70 se identificó mediante citometría de flujo e Inmunofluorescencia directa después de cultivar las células MES-OV y posteriormente tratarlas con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino, en donde se identificó que la proteína se sobreexpresa en la periferia de las células MES-OV al aumentar la concentración de cisplatino con respecto a la expresión basal. Cabe resaltar, que la IMF basal es identificada mediante la señal del fluoróforo Hoechst indicando la viabilidad celular de las células MES-OV (ATCC).

**Tabla 2.** Determinación de Hsp70

<b>Dosis letal</b>	<b>Porcentaje de expresión (%)</b>	<b>Intensidad media de fluorescencia (RFU)</b>
Basal intracelular	61,9	1,897
Basal periferia	37	3,948
DL25 intracelular	99	2,205
DL25 periferia	93	0,67
DL50 intracelular	100	3,407
DL50 periferia	97	1,889
DL70 intracelular	100	4,417
DL70 periferia	98	2,12

**Fuente:** elaboración propia

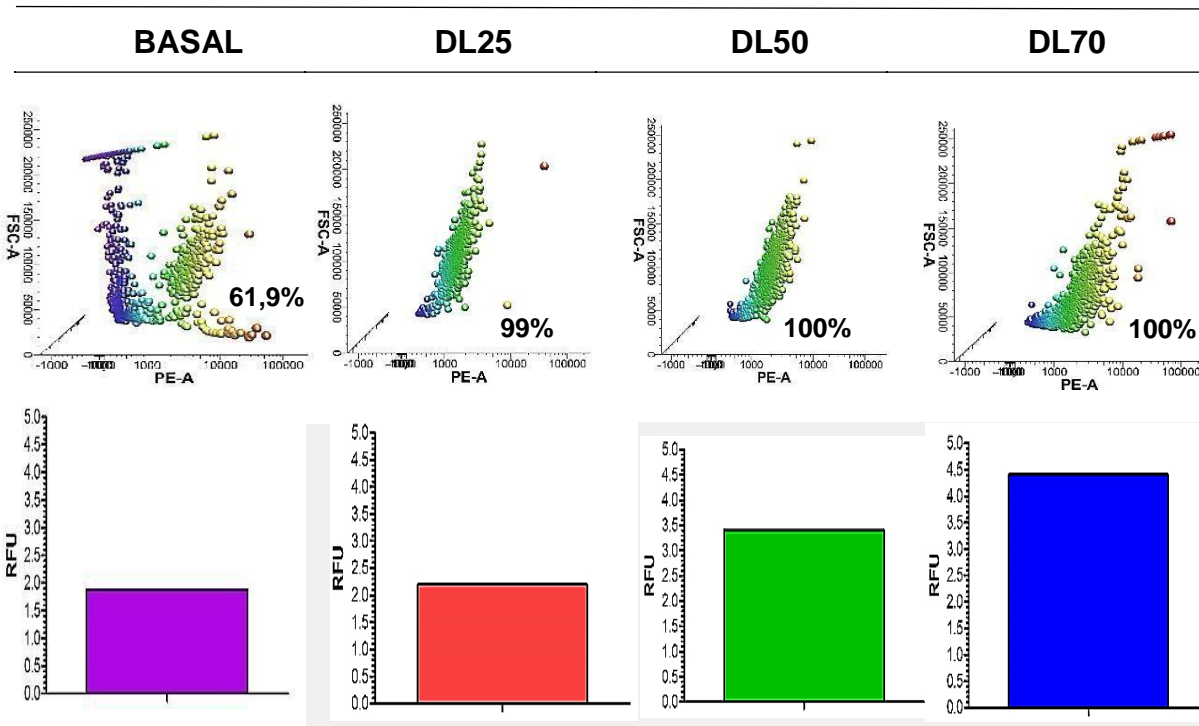
**Figura 5.** Proteína de choque térmico Hsp70 periferia.



**Fuente:** elaboración propia. En la figura 5 se observa en la parte superior la citometría de flujo, seguida de la IFD y por último de la IMF, revelando datos basales y de las correspondientes dosis letales de la proteína

Hsp70 en la periferia de las células MES-OV. El porcentaje de expresión y las unidades relativas de fluorescencia se encuentran registradas en la tabla 2.

**Figura 6.** Proteína de choque térmico Hsp70 intracelular.



**Fuente:** elaboración propia. En la figura 6 se observa en la parte superior la citometría de flujo seguida de la IFD, revelando datos basales y de las correspondientes dosis letales de la proteína Hsp70.A nivel intracelular de las células MES-OV.

### 5.5 Determinación de Hsp90 en línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino mediante la técnica de Inmunofluorescencia.

Con el objetivo de identificar la proteína Hsp90 en las células MES-OV tratadas, la proteína Hsp90 se identificó mediante citometría de flujo después de cultivar las células MES-OV y tratarlas con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino. Posteriormente se tomó un porcentaje de células que fueron permeabilizadas con saponina al 0.01% para detectar

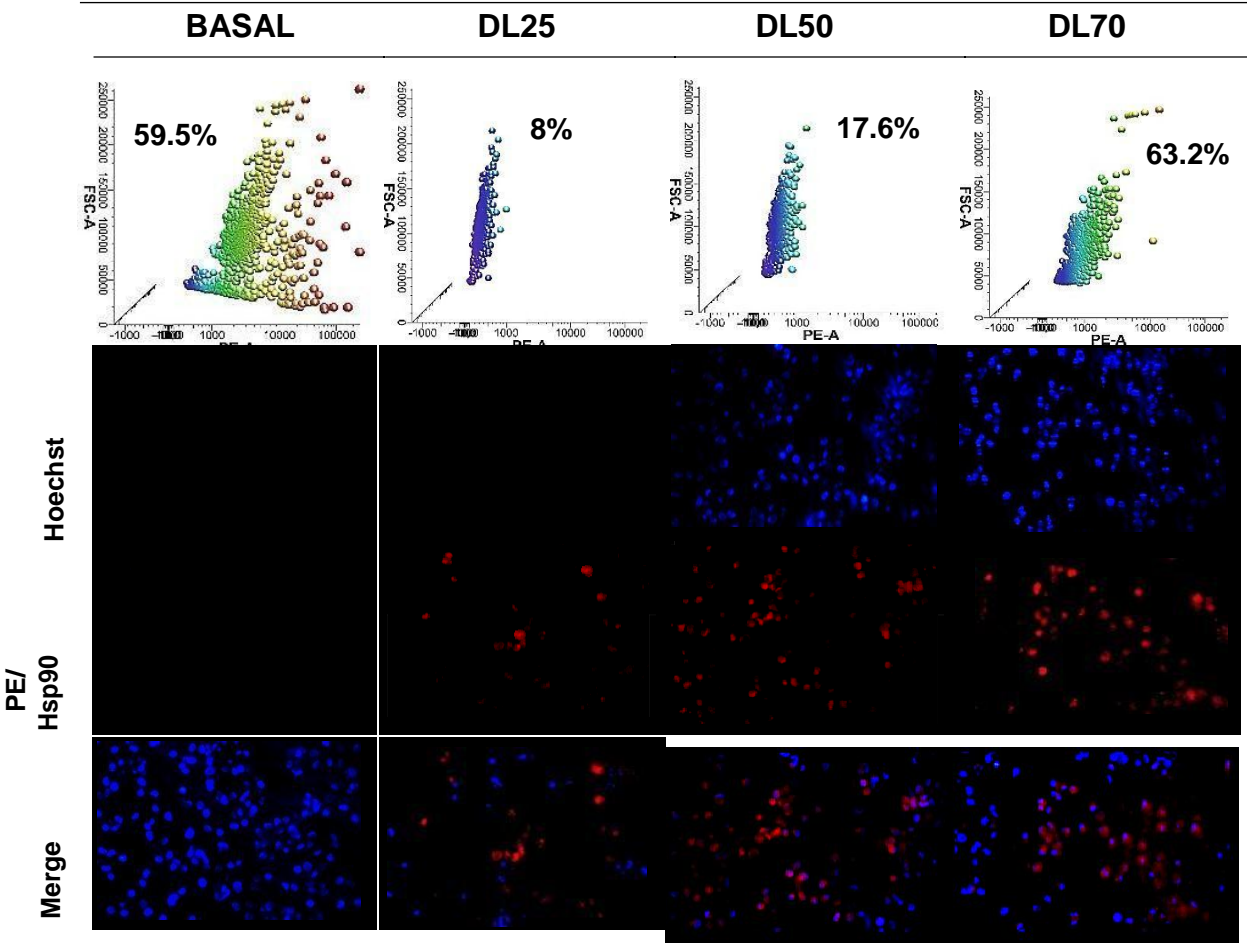
la proteína intracelular. Se encontró que la proteína se sobreexpresa a nivel intracelular en las células MES-OV (ATCC) con respecto al dato basal. Se detectó que pasa de una expresión intracelular de 91.2 % a estar en 98 % con las concentraciones que inducen DL25, 99% con las concentraciones que inducen DL50 y 99.5% con las concentraciones que inducen DL70. Sin embargo en membrana la proteína Hsp90 tiene un porcentaje de expresión ambiguo ya que pasa de una expresión de 59.5% a estar en 8% con DL25, 17.6% con DL50 y 63.2% con DL70 (ver tabla 3). Como medida de fluorescencia se graficó la intensidad media de fluorescencia detectando que la DL25, DL50 y DL70 intracelular aumenta pero la fluorescencia basal arroja unidades relativas de fluorescencia (URF) mayores a expensas del fluoróforo Hoechst indicando la viabilidad celular de las células MES-OV (ATCC). Estos resultados en conjunto muestran que la proteína de choque térmico Hsp90 aumenta su expresión intracelular en células bajo

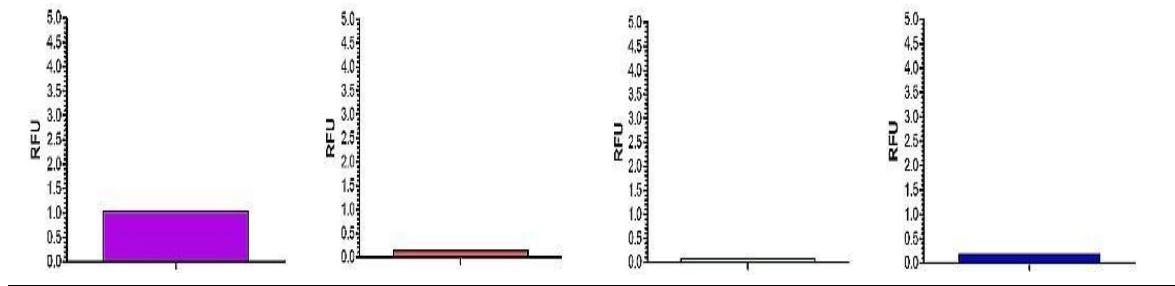
**Tabla3.** Determinación de Hsp90

<b>Dosis letal</b>	<b>Porcentaje de expresión (%)</b>	<b>Intensidad media de fluorescencia (RFU)</b>
Basal intracelular	91,2	3,501
Basal periferia	59,5	1,032
DL25 intracelular	98	0,626
DL25 periferia	8	0,137
DL50 intracelular	99	0,981
DL50 periferia	17,6	0,073
DL70 intracelular	99,5	1,76
DL70 periferia	63,2	0,17

condiciones de estrés como se muestra en la tabla 3 y la figura 7.

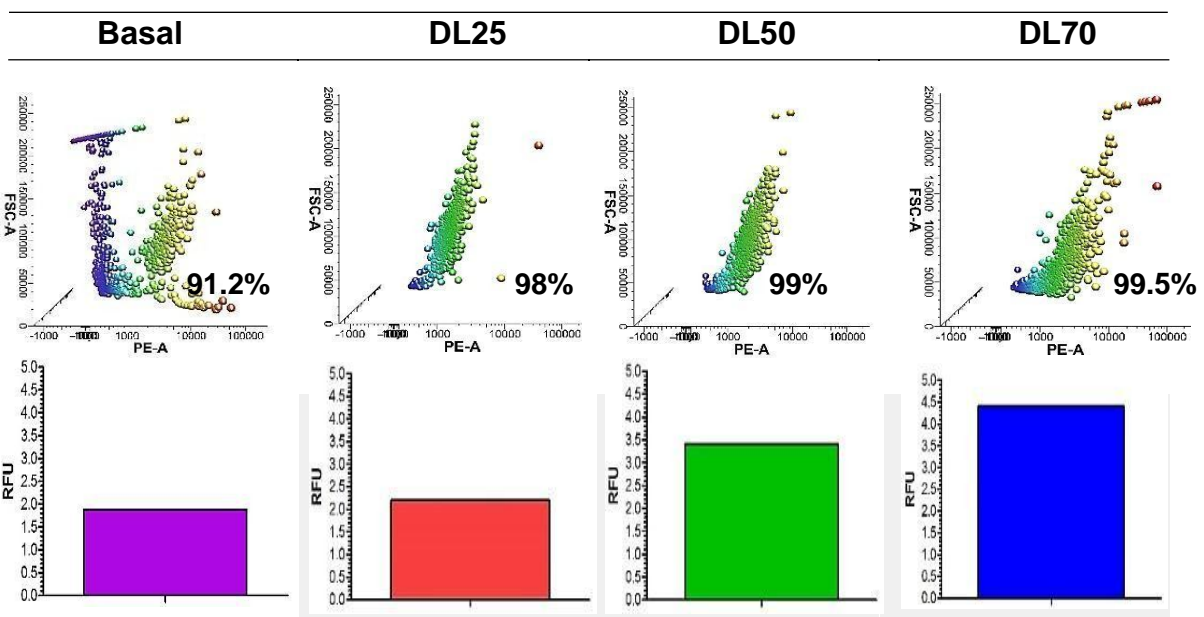
Figura 7. Proteína de shock térmico Hsp90 en membrana





**Fuente:** elaboración propia En la figura 7 se observa en la parte superior la citometría de flujo, seguida de la IFD y por último de la IMF, revelando datos basales y de las correspondientes dosis letales de la proteína Hsp90 en la periferia de las células MES-OV. El porcentaje de expresión y las unidades relativas de fluorescencia se encuentran registradas en la tabla 3.

**Figura 8.** Proteína de shock térmico Hsp90 intracelular.



**Fuente:** elaboración propia. En la figura 8 se observa en la parte superior la citometría de flujo seguida de la IFD, revelando datos basales y de las correspondientes dosis letales de la proteína Hsp90 A nivel intracelular de las células MES-OV. El porcentaje de expresión y las unidades relativas de fluorescencia se encuentran registradas en la tabla 3.



## **5.6 Identificación de señales de muerte en línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino.**

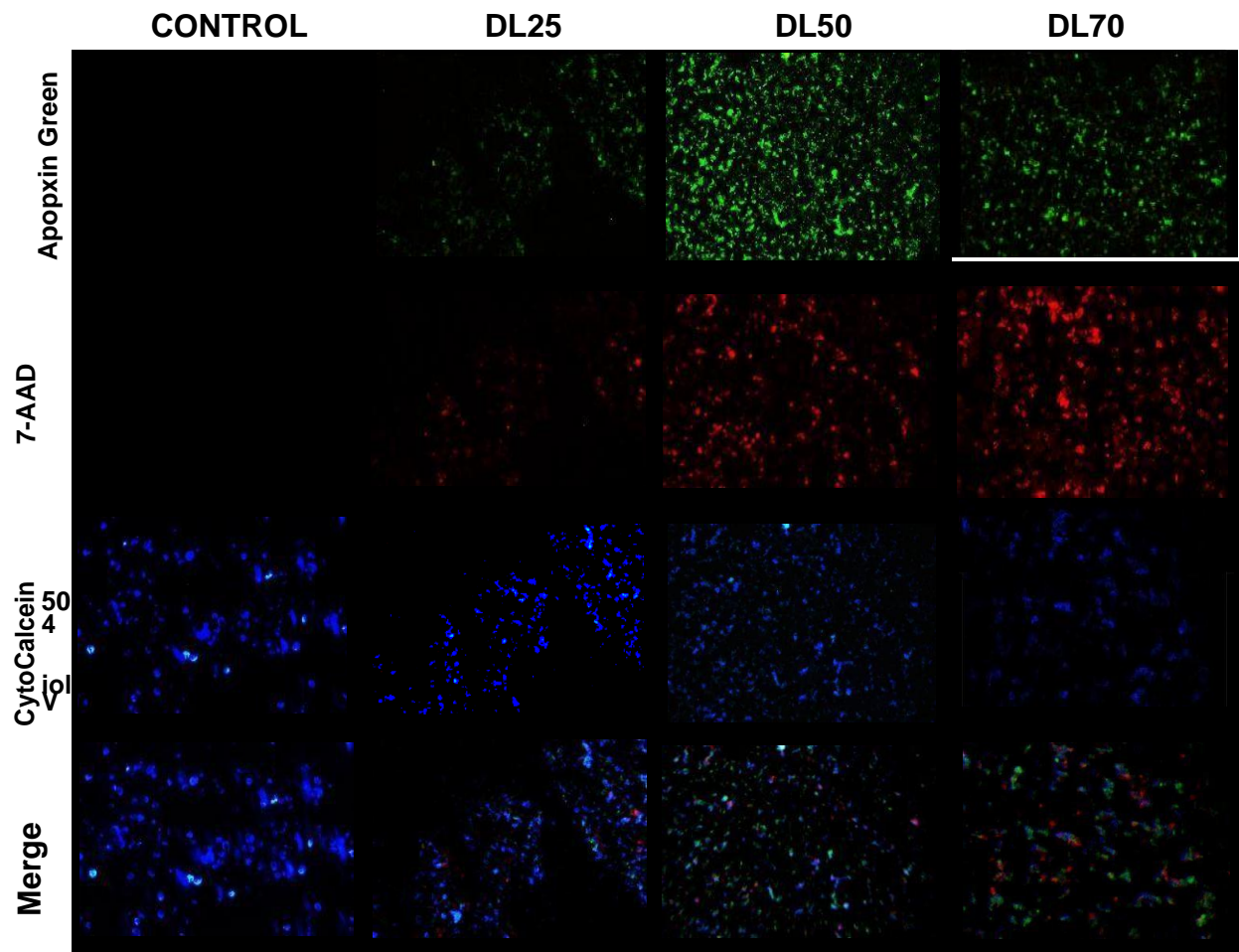
La apoptosis es un proceso activo y programado de desmantelamiento celular autónomo que evita la inflamación. Durante la muerte celular se dan cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. Uno de los cambios morfológicos durante la muerte celular son los cambios que se dan en la membrana citoplasmática. Durante procesos de muerte relacionados con apoptosis hay exposición de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular sin alteración de la permeabilidad celular como sucede en la necrosis.

Estos eventos pueden ser detectados por el kit apoptosis/ necrosis de la casa comercial abcam® al ser detectado por inmunofluorescencia por el uso de anexina marcada con fluoróforos o apoxin los cuales se unen a este fosfolípido (fosfatidilserina); mientras que la permeabilidad se detecta por uso de 7-AAD que se une a los núcleos de las células con daño en la membrana indicando permeabilidad de la membrana.

Se identificó las señales de muerte en la línea MES-OV expuestas a cisplatino en DL25, DL50 y DL70. Para esto se usó la técnica de Inmunofluorescencia y el kit apoptosis/ necrosis de la casa comercial abcam®. Se encontraron señales positivas con los tres fluoróforos que emplea la técnica. A medida que aumenta la dosis letal, aumenta el porcentaje de células positivas de Apoxin Green, 7-AAD y asimismo disminuye el porcentaje de células positivas del fluoróforo Cytocalcein, indicando muerte celular relacionada con apoptosis y necrosis. La IMF de 7-AAD en células MES-OV indica que las células perdieron la integridad de su membrana, además de exponer fosfatidilserina

en la membrana celular, lo cual se observa con la IMF que emite el fluoróforo Apopxin Green.

**Figura 9.** Señales de muerte identificadas con kit *apoptosis/necrosis abcam*.

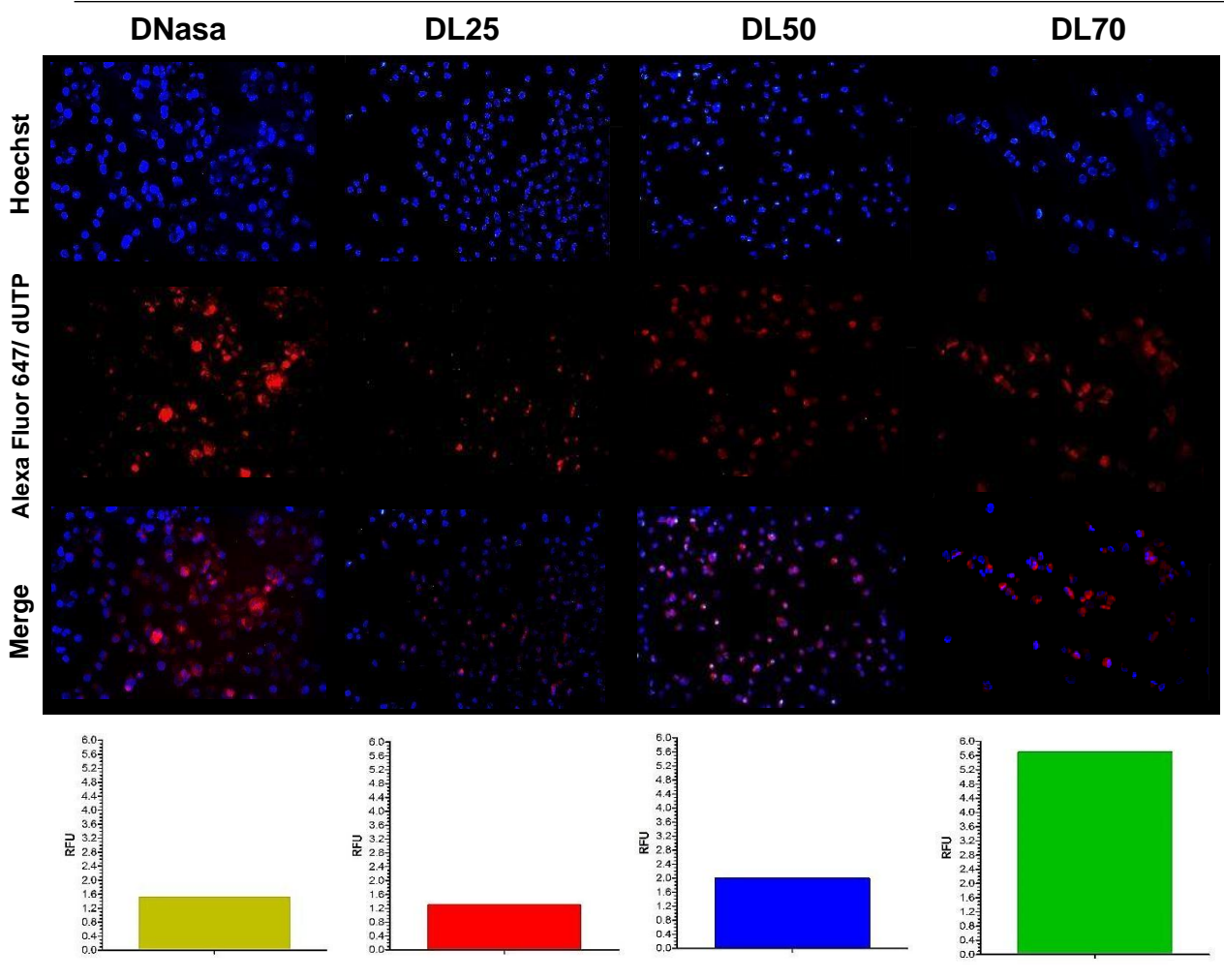


**Fuente:** elaboración propia, imagen tomada con microscopio de fluorescencia Leica 2500. En la figura 9 las células MES –OV al ser tratadas con DL25, DL50 y DL70 muestra fluorescencia para los tres indicadores: Apopxin Green, para 7-AAD y CytoCalcein violet 450. A medida que aumenta la dosis letal disminuye la intensidad del fluoróforo CytoCalcein violet 450 (azul), indicando que disminuye la viabilidad celular. Por otro lado, el indicador de Apopxin Green (verde) se observa en las células al ser tratadas con las tres dosis letales, sin embargo la intensidad no es la misma, en la DL25 es baja, en la DL50 es alta y en la DL70 es intermedia demostrando que las células MES-OV entran en apoptosis al ser tratadas con cisplatino, pero, al visualizarse el indicador 7-AAD (rojo) revela que hay daño en la membrana de las células.

### 5.7 Determinación de la fragmentación del DNA de las células MES-OV (ATCC) al ser tratada con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino

Una señal de muerte celular es la fragmentación del DNA (23). Dado que se identificó que el cisplatino a las 24 horas causa muerte celular relacionada con apoptosis, se determinó si el fármaco induce fragmentación de DNA. Este ensayo fue evaluado mediante el ensayo del TUNEL Alexa Fluor 647. Las células MES-OV expuestas a DL25, DL50 y DL70 fueron positivas para fragmentación del DNA.

**Figura 10.** Identificación de cambios en la fragmentación del DNA kit TUNEL Alexa Fluor 647.



**Fuente:** elaboración propia, imagen tomada con microscopio de fluorescencia Leica 2500. En la figura 10 las células MES –OV al ser tratadas con DL25, DL50 y DL70 muestra fluorescencia para los dos fluoróforos. Hoechst permite visualizar los núcleos de las células y Alexa Fluor 647 indica ruptura del DNA. Los datos de IMF en unidades relativa de fluorescencia son: DNAsa1.5 RFU; DL25 1.3 RFU; DL50 2 RFU; DL70 5.7 RFU.

## 6. DISCUSIÓN

Las proteínas de choque térmico han sido relacionadas con la resistencia a fármacos utilizados en la terapia del cáncer(4,12-13). En este trabajo se muestra que el cisplatino induce cambios en la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 en un modelo “*in vitro*”.

La expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 cambia en células de la línea MES-OV cuando son expuestas a concentraciones de cisplatino que inducen DL25, DL50 y DL70 indicando que ellas pueden participar de procesos relacionados con respuesta al estrés generado por este fármaco (cisplatino). Vallespí et al. (23) sugirieron que la expresión de una o más proteínas de choque térmico le confiere protección a la célula tumoral. Así mismo, Vallespí et al. (23) y Lianos et al. (16) señalaron que Hsp70 está involucrada en la inhibición de la apoptosis porque bloquea el ensamblaje del complejo multiproteico del apoptosoma y que mediante esta inhibe la muerte celular durante los inicios del estrés celular. De igual modo, plantearon que la Hsp90 cumple más funciones a parte de inhibir la apoptosis. Entre ellas la de facilitar la transformación neoplásica de la célula en donde destacan que es la única chaperona en mantener varias oncoproteínas activas.

La expresión de la Hsp70 en la membrana aumentó en las células MES-OV cuando se expuso a la DL25, DL50 y DL70 de cisplatino, además de aumentar la intensidad media

de fluorescencia, indicando que esta proteína se transloca a la membrana citoplasmática durante el estrés generado por cisplatino. Multhoff G. et al (24) planteó que la Hsp70 tiene afinidad con la fosfatidilserina y que esta proteína de choque térmico participa en el mecanismo flip-flop y así facilita más el transporte de Hsp70 desde el interior del célula a la cara externa de la membrana.

Así mismo Schilling D. et al (25), Lancaster G. et al (26) y Multhoff G. et al (27) expusieron la estrecha relación de Hsp70 y fosfatidilserina fuera de las balsas lipídicas en la membrana plasmática de las células tumorales, corroborando que la sobreexpresión de las HSP's en la membrana podría generar una reorganización de la bicapa lipídica y podría modular la interacción de la Hsp70 con los componentes lipídicos de la membrana celular, siendo un hallazgo clave para utilizar la Hsp70 como posible marcador tumoral ya que esta proteína se sobreexpresa solo en células tumorales.

Los resultados obtenidos también guardan relación con Stope M. et al (19) al señalar que las proteínas de choque térmico se sobreexpresan al estar bajo condiciones de estrés a causa de los fármacos generando quimioresistencia.

Al tratar las células con DL25 y DL50 de cisplatino la expresión de Hsp90 fue baja en la membrana a comparación de las células que no se trataron con cisplatino debido a la actividad de chaperona que realizaba la Hsp90 intracelular al plegar las posibles proteínas aberrantes de las células MES-OV producto del tratamiento con cisplatino. No obstante, con la DL70 la Hsp90 tuvo un porcentaje más alto (63%) que las otras dosis letales (DL25 8%; DL50 17.5%) posiblemente a la translocación del citoplasma a la membrana que realizó la Hsp90 $\alpha$ . Chen B. et al (28) expone que las células bajo condiciones de estrés inducen la liberación de Hsp90 $\alpha$  de forma constitutiva dado que la

sobreexpresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1) se produce en un 40% de tumores humanos, haciendo que la Hsp90 $\alpha$  se trasloque a la membrana celular. En efecto, lo mencionado anteriormente es acorde con lo que se halló en esta investigación.

Al tratar las células MES-OV con cisplatino, se identificó que el este induce muerte relacionada con la ruptura del DNA probablemente después de la formación de aductos (20). Dado que las diferentes concentraciones de cisplatino usadas indujeron fragmentación del DNA, evaluamos si esta fragmentación aumenta a medida que aumenta la dosis letal mediante el análisis de la Intensidad Media De Fluorescencia -IMF. Se identificó que la IMF de DL25 induce 1.3 RFU, la DL50 2.0 RFU y DL70 5.7 RFU.

El presente estudio, muestra que el cisplatino induce cambios en la expresión de proteínas de choque térmico en la línea MES-OV (ATCC) de cáncer de ovario indicado que estas proteínas participan en la modulación de la respuesta a estrés y que pueden ser candidatos como biomarcadores o proteínas blanco para terapia dirigida.

## 7. CONCLUSIÓN

1. Se determinó cambios en las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 intracelular y en membrana celular mediante la técnica de epi-inmunofluorescencia.
2. Se identificó que las células de la línea MES-OV expresan fosfatidilserina en la membrana celular y además presenta daños en la membrana cuando fueron tratadas con cisplatino.
3. Se detectó fragmentación del DNA en las células de la línea MES-OV corroborando el mecanismo de acción del cisplatino.

## **8. SUGERENCIAS**

8.1 Evaluar cambios en la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp27 y Hsp60 en la línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino.

8.2 Evaluar la expresión del protooncogén Her2 junto con la expresión de Hsp90 en la membrana de la línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lucasian Labs S.A.S. y Alejandría Soluciones de Tecnología S.A.S. Sistema de Información de Cáncer en Colombia [Internet]. [Citado el 18 Junio 2018]. Disponible en: <http://www.infocancer.co/portal/#!/home>
2. Piulats JM, Vidal A, García-Rodríguez FJ, Muñoz C, Nadal M, Moutinho C, et al. Orthoxenografts of testicular germ cell tumors demonstrate genomic changes associated with cisplatin resistance and identify PDMP as a re-sensitizing agent. [Internet]. 2018; clincanres.1898.2017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29618620><http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-1898>
3. Sociedad Americana de Cáncer. Acerca del cáncer de ovario [Internet]. Cancer.org. 2018 [citado 18 Julio 2018]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/acerca.html>
4. Lema M. Carcinoma de ovario (C56X) [Internet]. Mauriciolema.webhost4life.com. 2018 [citado 24 Julio 2018]. Disponible en: [http://mauriciolema.webhost4life.com/Protocolos QT/FichasTécnicas/C56X.doc](http://mauriciolema.webhost4life.com/Protocolos%20QT/FichasTécnicas/C56X.doc)
5. Macario AJL, De Macario EC. Chaperonopathies by defect, excess, or mistake. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1113:178–91.
6. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 286(3):433–42.

7. Rappa F, Farina F, Zummo G, David S, Campanella C, Carini F, et al. HSP-Molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: An overview. *Anticancer Res.* 2012; 32(12):5139–50.
8. Alaiya A , Franzén B, Fujioka K, Moberger B, Schedvins K, Silfversvärd C, et al. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors. 1997; 73(5):678–83.
9. Luo LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer.* 2002; 87(3):339–43.
10. Elpek GÖ, Karaveli Ş, Şimşek T, Keleş N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *Apmis.* 2003; 111(4):523–30.
11. Vidal CI, Mintz PJ, Lu K, Ellis LM, Manenti L, Giavazzi R, et al. An HSP90-mimic peptide revealed by fingerprinting the pool of antibodies from ovarian cancer patients. *Oncogene.* 2004; 23(55):8859–67.
12. Chu SH, Liu YW, Zhang L, Liu B, Li L, Shi JZ. Regulation of survival and chemoresistance by HSP90AA1 in ovarian cancer SKOV3 cells. *Mol Biol Rep.* 2013; 40(1):1–6.
13. Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett [Internet].* 2012; 321(2):137–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.030>
14. Prat J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. 2012; 460(3):237–49.

15. Prat J, Committee F. International Journal of Gynecology and Obstetrics Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum ☆. *Int J Gynecol Obstet* [Internet]. 2013; 124:1–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2013.10.001>
16. Lianos GD, Alexiou GA, Mangano A, Mangano A, Rausei S, Boni L, et al. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2015; 360(2):114–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026>
17. Carmelo, E. et al. (2006). Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune. *Revista Ibérica de Parasitología*, 66(4), 39–46.
18. Sharma, D. et al. (2009). Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein and Peptide Letters*, 16(6), 571–581. <https://doi.org/10.2174/092986609788490230>
19. Stope M. et al. Jump in the fire — heat shock proteins and their impact on ovarian cancer therapy. [citado 20 Julio 2018] Disponible en: [https://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(15\)30023-8/pdf](https://www.croh-online.com/article/S1040-8428(15)30023-8/pdf)
20. Dasari S. et al. (2015). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 5(0), 364–378. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. Cisplatin
21. Cisplatino [Internet]. Oncohealth Institute. 2018 Disponible en: <http://www.oncohealth.eu/es/area-paciente/cancer/informacion-soporte-paciente/informacion-general/tratamiento/quimioterapia/listado-farmacos/cisplatino>
22. Gutierrez L *et al.* 2018, Cultivo celular de la línea MES-OV.

23. Invitrogen™ Molecular Probes™ MTT Cell Proliferation Assay Kit.
24. Avila A. 2018 Cálculo de dosis letales por metodología *probit*
25. Delgado N. [Internet]. Ucv.ve. 2018 [citado 26 Julio 2018]. Disponible en:  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia3/Clase\\_practica\\_control\\_microbiologico\\_FMIIIP\\_2016.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Clase_practica_control_microbiologico_FMIIIP_2016.pdf)
26. Vallespí M, García I2. Annu Rev Microbiol. Habana 2008; 25:10.
27. Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. Methods. 2007; 43(3):229–37.
28. Schilling D, Gehrman M, Steinem C, De Maio A, Pockley AG, Abend M, et al. Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. FASEB J. 2009; 23(8):2467–77.
29. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. J Biol Chem. 2005
30. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, et al. a stress-inducible 72-kda heat-shock protein (hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, 1995; 279:272–9.
31. Chen,B. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. Genomics 86, 627-637 (2005). [PubMed]
32. Jiang S, Tu K, Fu Q, Schmitt DC, Zhou L, Lu N, et al. Multifaceted roles of HSF1 in cancer. Tumor Biol. 2015; 36(7):4923–31.
33. Zhang Z, Xie Z, Sun G, Yang P, Li J, Yang H, et al. Reversing drug resistance of cisplatin by hsp90 inhibitors in human ovarian cancer cells. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(5):6687–701.

34. Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: From structure to drug development. *BMB Rep.* 2009; 42(10):623–30.
35. Medicina FDE, Doctoral T. *Celular En Cáncer De Ovario Y De.* 2016;
36. Perales Romero S. Proliferación y Apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo. 2005. 243 p.
37. Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2015; 5(0):364–78.
38. Canet Lorente B, Catasús Cols L. Papel de las RHO GTPasas en el carcinoma de ovario. 2014; Disponible en: <https://ddd.uab.cat/record/117057>
39. Powers M V., Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle.* 2009; 8(4):518–26.
40. Khurana N, Bhattacharyya S. Hsp90, the Concertmaster: Tuning Transcription. *Front Oncol* [Internet]. 2015; 5(April):1–8. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2015.00100/abstract>
41. Nimmervoll B, Chitchevlova LA, Juhasz K, Cremades N, Aprile FA, Sonnleitner A, et al. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett* [Internet]. 2015; 589(19):2747–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.037>
42. Wong DS, Jay DG. Emerging Roles of Extracellular Hsp90 in Cancer [Internet]. 1ed. Vol. 129, *Advances in Cancer Research.* Elsevier Inc.; 2016. 141-163 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2016.01.001>
43. Benedet J.L., Bender H., Jones III H., Ngan H.Y.S PS. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int J*

Gynecol Obstet [Internet]. 2000; 70(2):209–62. Disponible en:  
<http://doi.wiley.com/10.1016/S0020-7292%2800%2990001-8>

44. Wong DS, Jay DG. Emerging Roles of Extracellular Hsp90 in Cancer [Internet]. 1st ed. Vol. 129, Advances in Cancer Research. Elsevier Inc.; 2016. 141-163 p.  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2016.01.001>
45. Kang H-J, Moon H-S, Chung H-W. The expression of FAS-associated factor 1 and heat shock protein 70 in ovarian cancer. *Obstet Gynecol Sci.* 2014;57(4):281–90.
46. Jiang S, Tu K, Fu Q, Schmitt DC, Zhou L, Lu N, et al. Multifaceted roles of HSF1 in cancer. *Tumor Biol.* 2015; 36(7):4923–31.