



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD - PROGRAMA DE  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

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

PRESENTADO POR: ANA MARIA AVILA TORRES



# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVOS

METODOLOGÍA

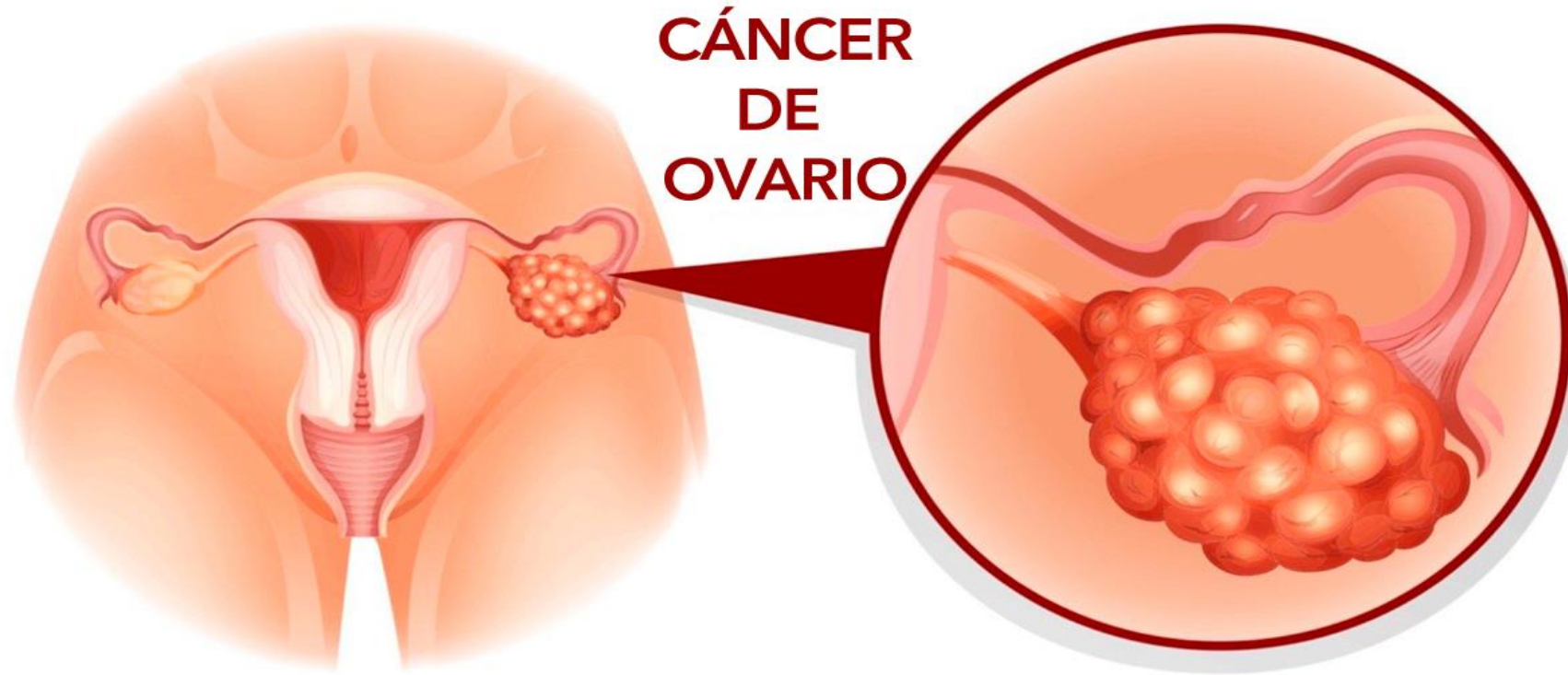
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES



## INTRODUCCIÓN: CÁNCER DE OVARIO

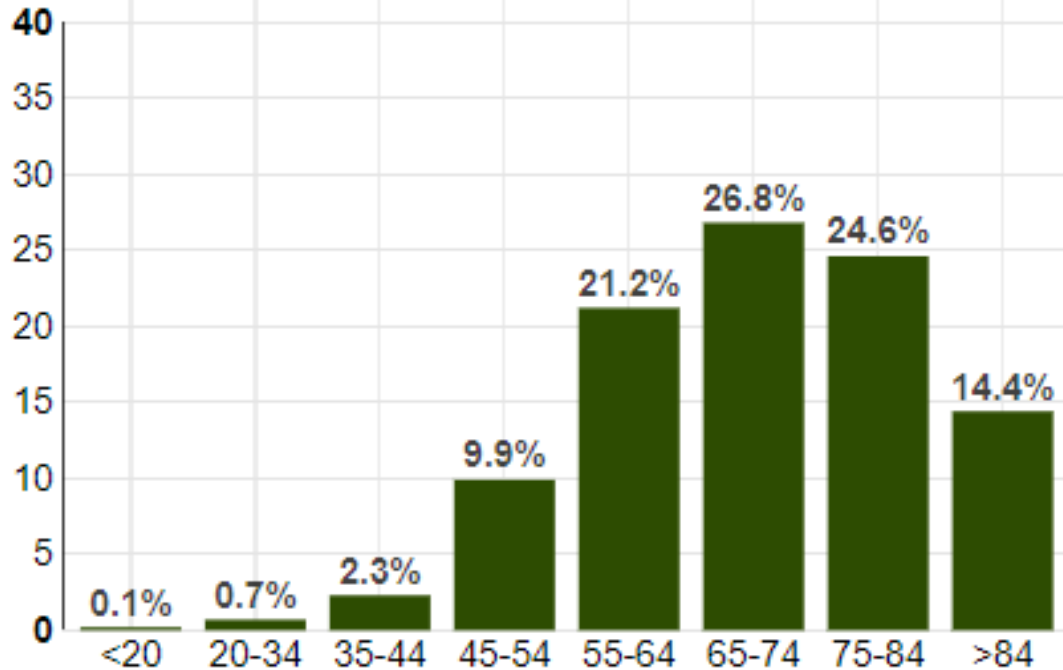


- ❑ Neoplasia que consiste en el crecimiento incontrolado de células malignas.
- ❑ Se diagnostica de un 70% a 80% en una etapa avanzada.
- ❑ Tipo de cáncer más frecuente y es la quinta causa

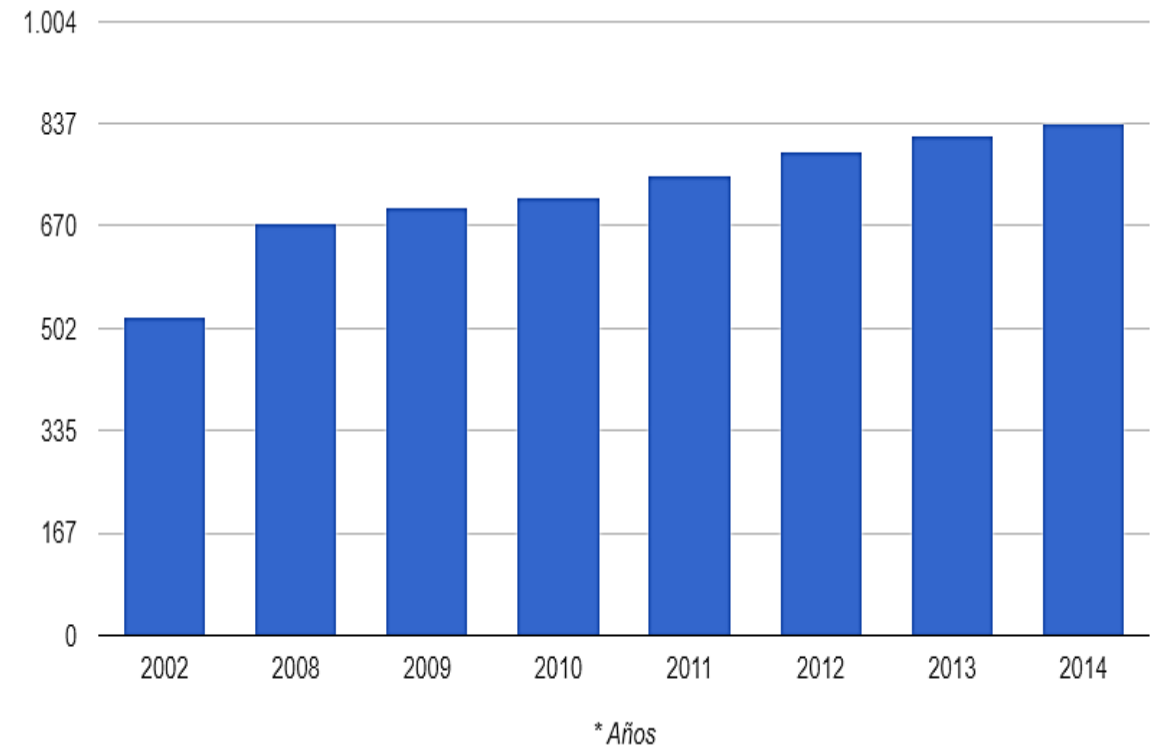


# INTRODUCCIÓN: ESTADÍSTICAS DE CÁNCER DE OVARIO A NIVEL MUNDIAL Y EN COLOMBIA

## PORCENTAJE DE MUERTE POR CÁNCER DE OVARIO A NIVEL MUNDIAL - SEGÚN LA EDAD



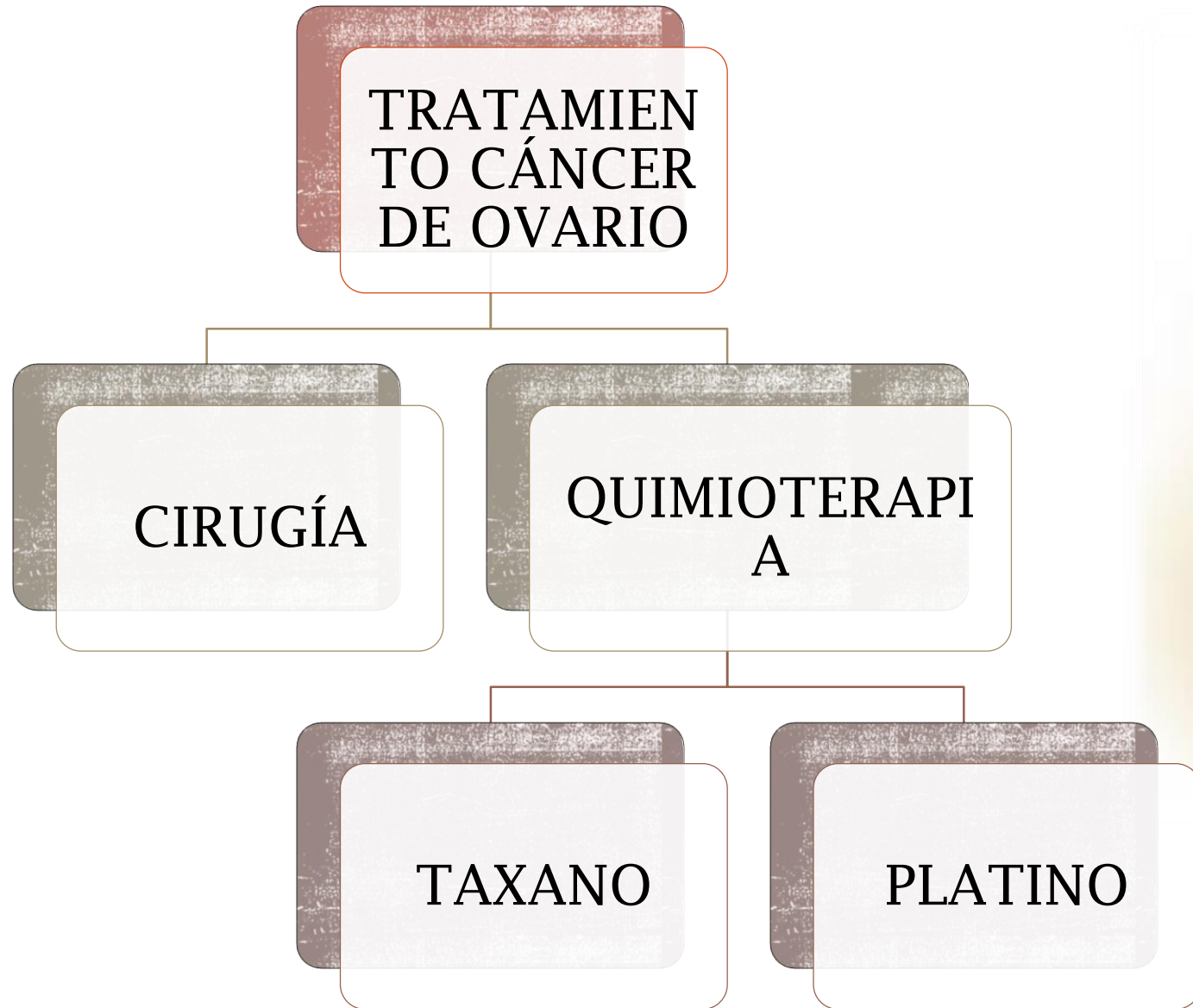
## NÚMERO DE MUERTES POR CÁNCER DE OVARIO EN MUJERES COLOMBIANAS



Fuente de información: Datos del SICC y Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE



# INTRODUCCIÓN: TRATAMIENTO UTILIZADO EN CÁNCER DE OVARIO



<https://sites.google.com/site/elcanceraepg/importancia-de-la-c>



# PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO HSP70 Y HSP90

Proteínas altamente conservadas

Son dependientes de ATP

Chaperonas moleculares

- Correcto plegamiento de proteínas
- Degradación de proteínas aberrantes



INTRODUCCIÓN: PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN CÁNCER

# PROTEÍNAS HSP70 Y HSP90 EN CÁNCER

Proliferación

Invasión

Diferenciación

Metástasis



¿LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE  
TÉRMICO HSP70 Y HSP90 CAMBIAN  
SU EXPRESIÓN EN LA LÍNEA  
CELULAR DE OVARIO MES-OV AL  
SER TRATADA CON CISPLATINO?





# OBJETIVOS

Determinar..de proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 en línea celular MES-OV tratada con cisplatino

Identificar cambios en la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp90 en la membrana citoplasmática de línea celular MES-OV tratada con DL25,DL50 y DL70 de cisplatino

Identificar señales de muerte en línea celular MES-OV al ser tratada con cisplatino

Identificar cambios en la fragmentación del DNA en línea celular MES-OV tratada con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino.

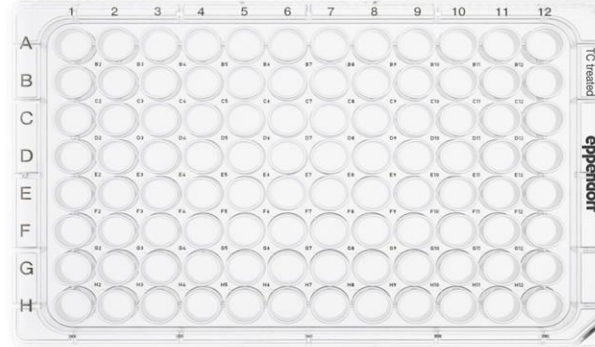
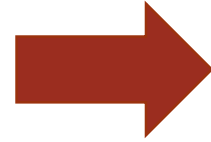


# METODOLOGÍA: CULTIVO CELULAR, TRATAMIENTO CON CISPLATINO Y VIABILIDAD CELULAR CON MTT



<https://fr.dreamstime.com/photo-stock-technologie-culture-cellulaire-dans-la-biologie-et-la-m%C3%A9decine-image85363358>

**CULTIVO CELULAR LÍNEA MES-OV  
(RPMI + SFB 10%)**



<http://www.directindustry.es/prod/eppendorf/product-22548-1606915.html>

**SIEMBRA DE 300,000  
CÉLULAS  
(RPMI + SFB 10%)**



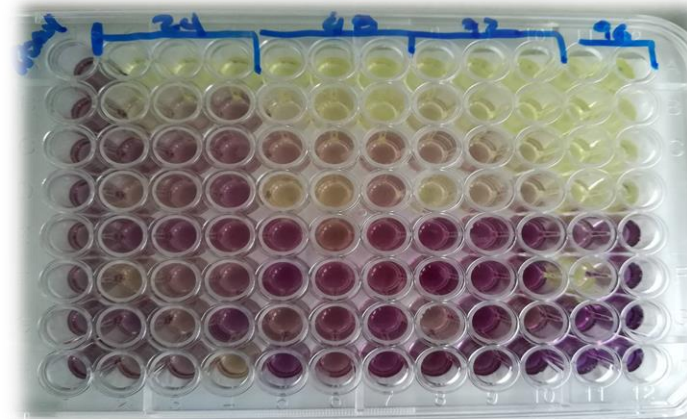
<https://www.scoopnest.com/es/user/LuisFlorido/911339379364425728-serviciopublico-paciente-de-la-tercera-edad-necesita-cisplatino-cytoplatin-1-mg-quien-pueda-colaborar-llamar-al-04242247780-22sep>

**TRATAMIENTO (200  $\mu$ M- 1,5  $\mu$ M)**

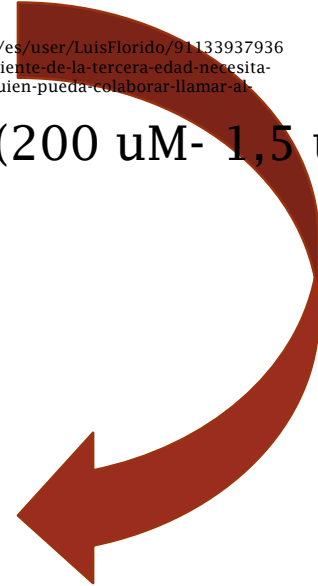
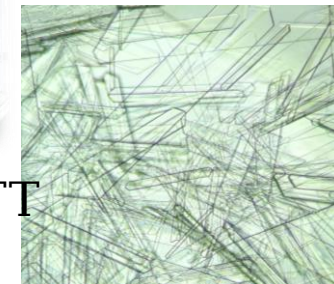
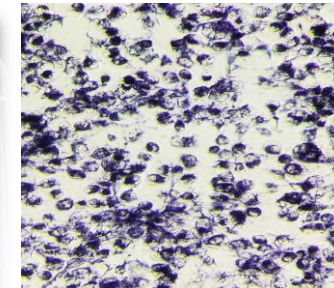


<http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/3022/Awareness-Technology/ChroMate/>

**DENSIDAD ÓPTICA (492 nm)**

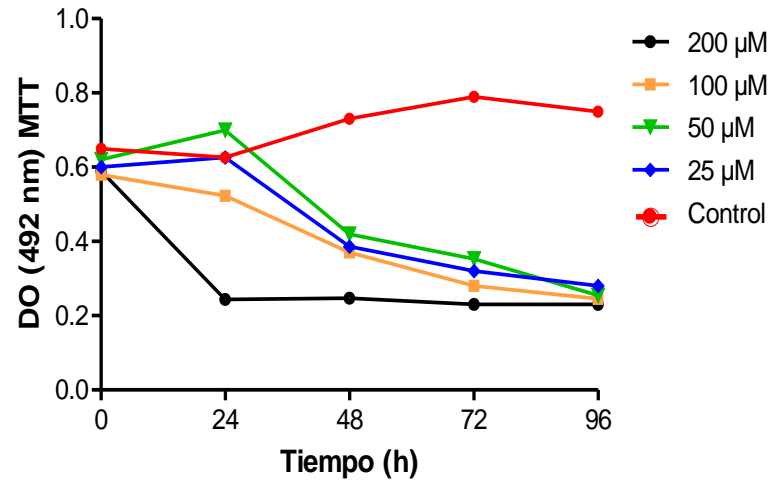


**VIABILIDAD CELULAR CON MTT  
(0, 24, 48, 72, 96 HORAS)**

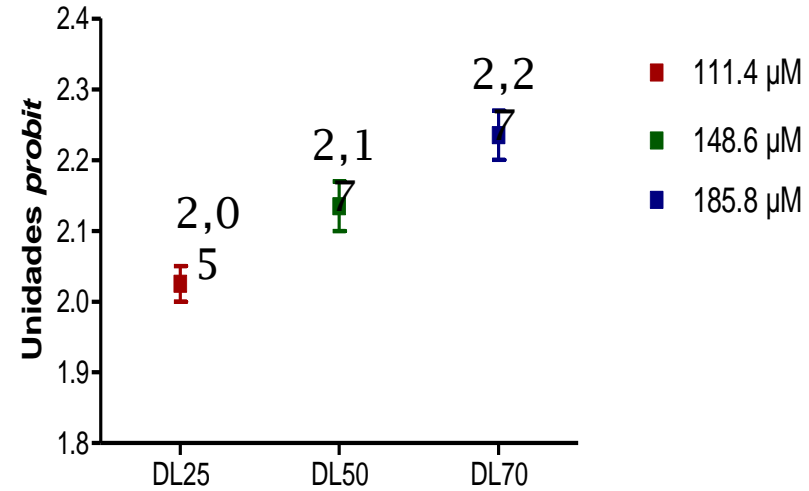


# RESULTADO: VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACIÓN DE DOSIS LETALES

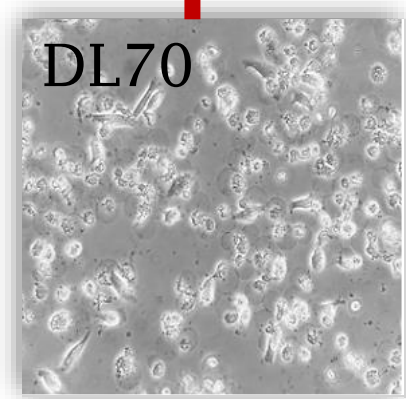
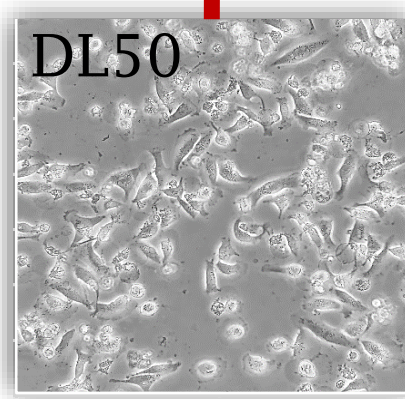
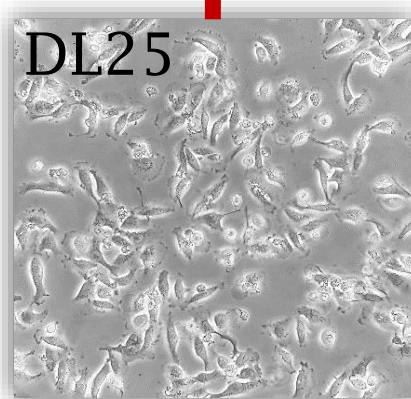
Ensayo de viabilidad celular en células tratadas con cisplatino



Determinación de DL25, DL50 y DL70



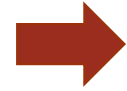
**Y=ax+b**  
 Y: DL a determinar  
 A: variable en X  
 X: [ ] del fármaco a utilizar  
 B: Intercepción



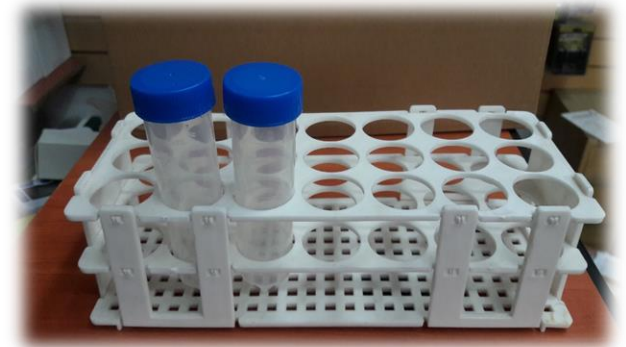
# METODOLOGÍA: EPI-INMUNOFLUORESCENCIA - CITOMETRÍA DE FLUJO



CULTIVO CELULAR LINEA MES-OV  
(RPMI + SFB 10%)



TRATAMIENTO (DL25, DL50 y DL70)



- FIJACIÓN (PFA 4%)
- PERMEABILIZACIÓN (SAPONINA)
- REMOVIÓ LA AUTOFLUORESCENCIA



LECTURA: CITOMETRÍA DE FLUJO Y  
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA



LAVADOS CON PBS 1X (2 VECES)



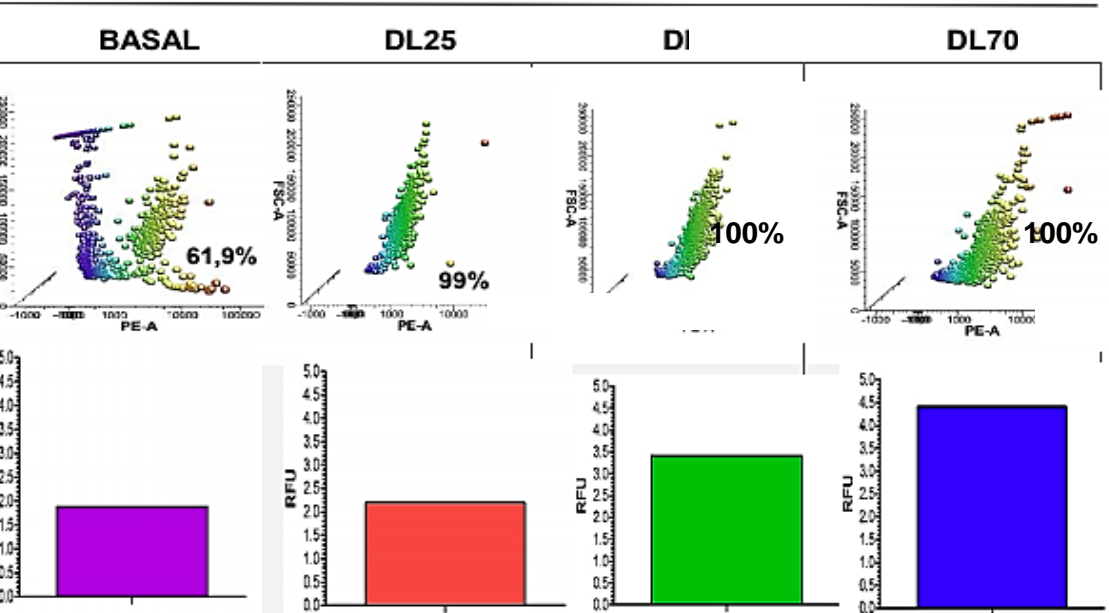
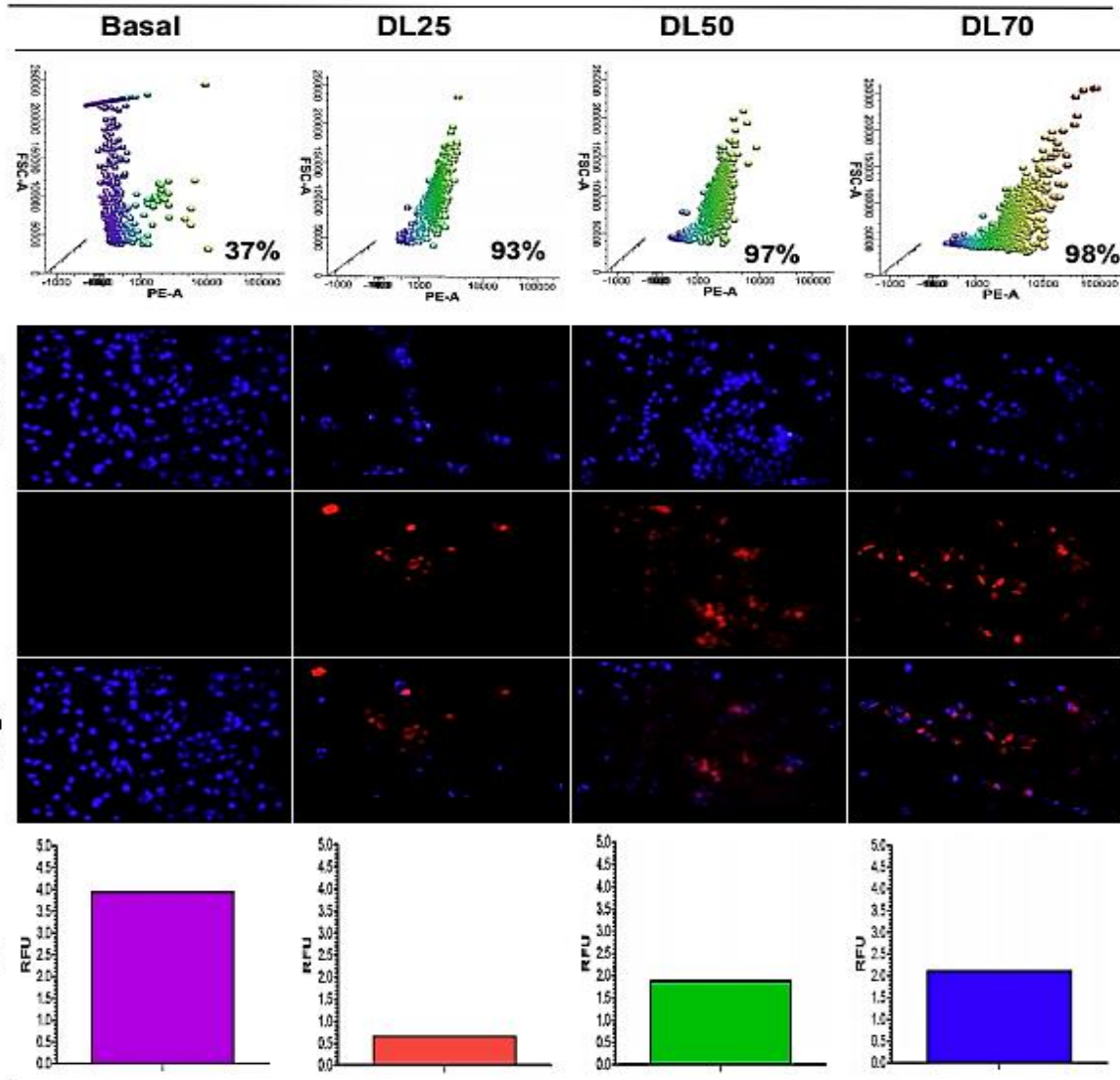
ADICIONO ANTICUERPOS HSP70 Y HSP90  
SE INCUBÓ POR 1 HORA A 37°C



# RESULTADO: DETERMINACIÓN DE HSP70 EN MEMBRANA E INTRACELULAR

## PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP70

### A. MEMBRANA CITOPLASMÁTICA



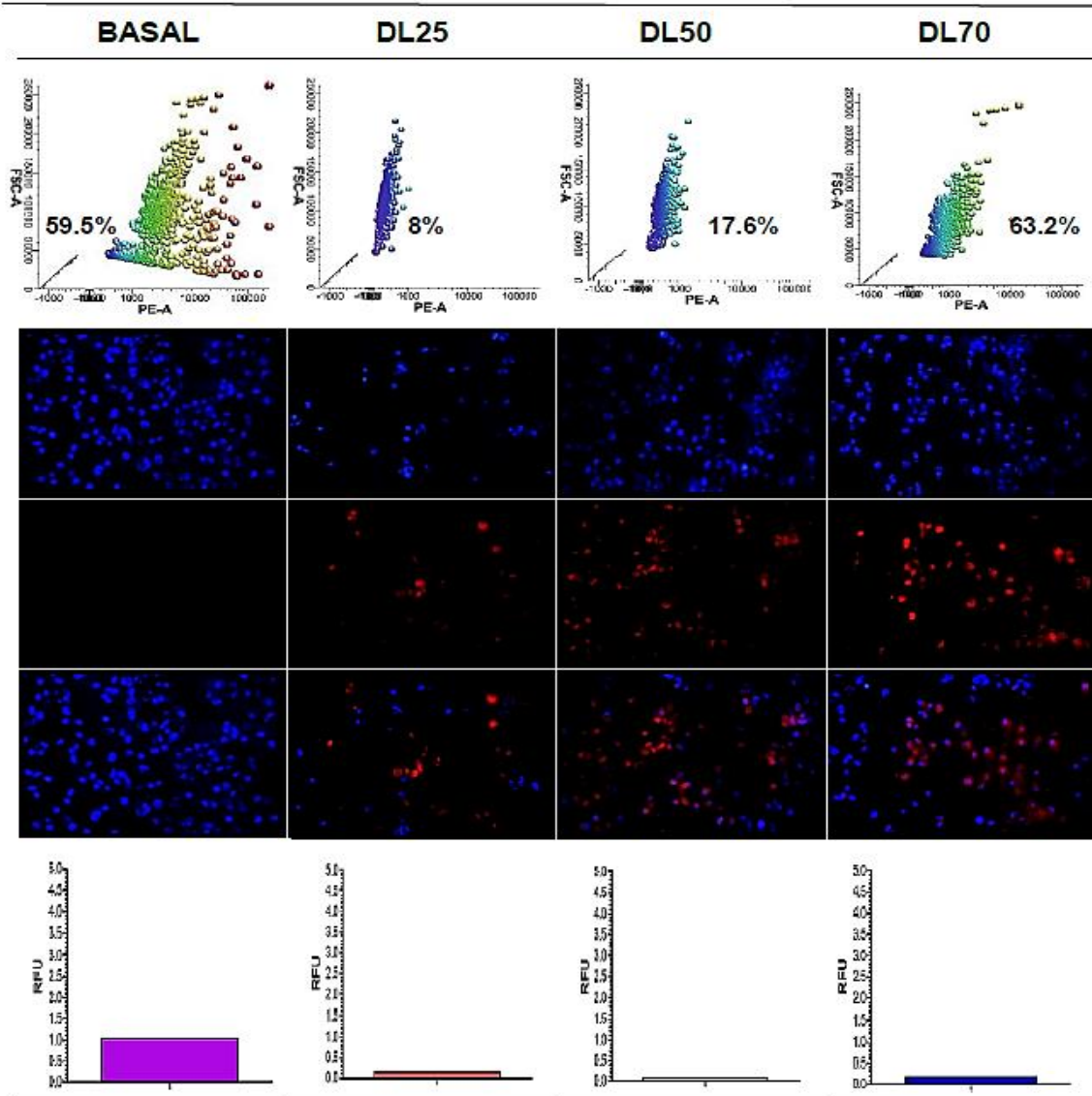
Dosis letal	Porcentaje de expresión (%)	Intensidad media de fluorescencia (RFU)
Basal intracelular	61,9	1,897
Basal periferia	37	3,948
DL25 intracelular	99	2,205
DL25 periferia	93	0,67
DL50 intracelular	100	3,407
DL50 periferia	97	1,889
DL70 intracelular	100	4,417
DL70 periferia	98	2,12



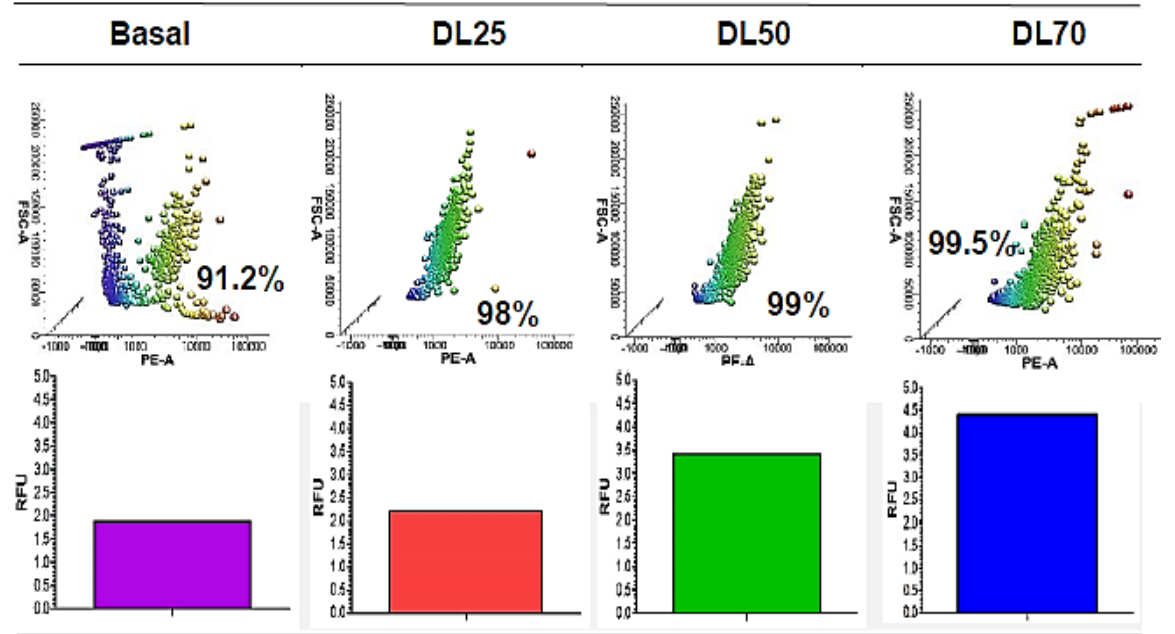
# RESULTADO: DETERMINACIÓN DE HSP90 EN MEMBRANA E INTRACELULAR

## PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSP90

A



B



Dosis letal	Porcentaje de expresión (%)	Intensidad media de fluorescencia (RFU)
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



**METODOLOGÍA:** KIT APOPTOSIS/NECROSIS abcam® ab176749

SIEMBRA DE  
150,000  
CÉLULAS MES-  
OV EN LAMINA

ANÁLISIS DE  
IMÁGENES EN EL  
MICROSCOPIO DE  
FLUORESCENCIA  
LEICA

TRATAMIENTO CON  
CISPLATINO

SE ADICIONÓ  
0,5  $\mu$ L DE  
CITOCALCEI  
N 450

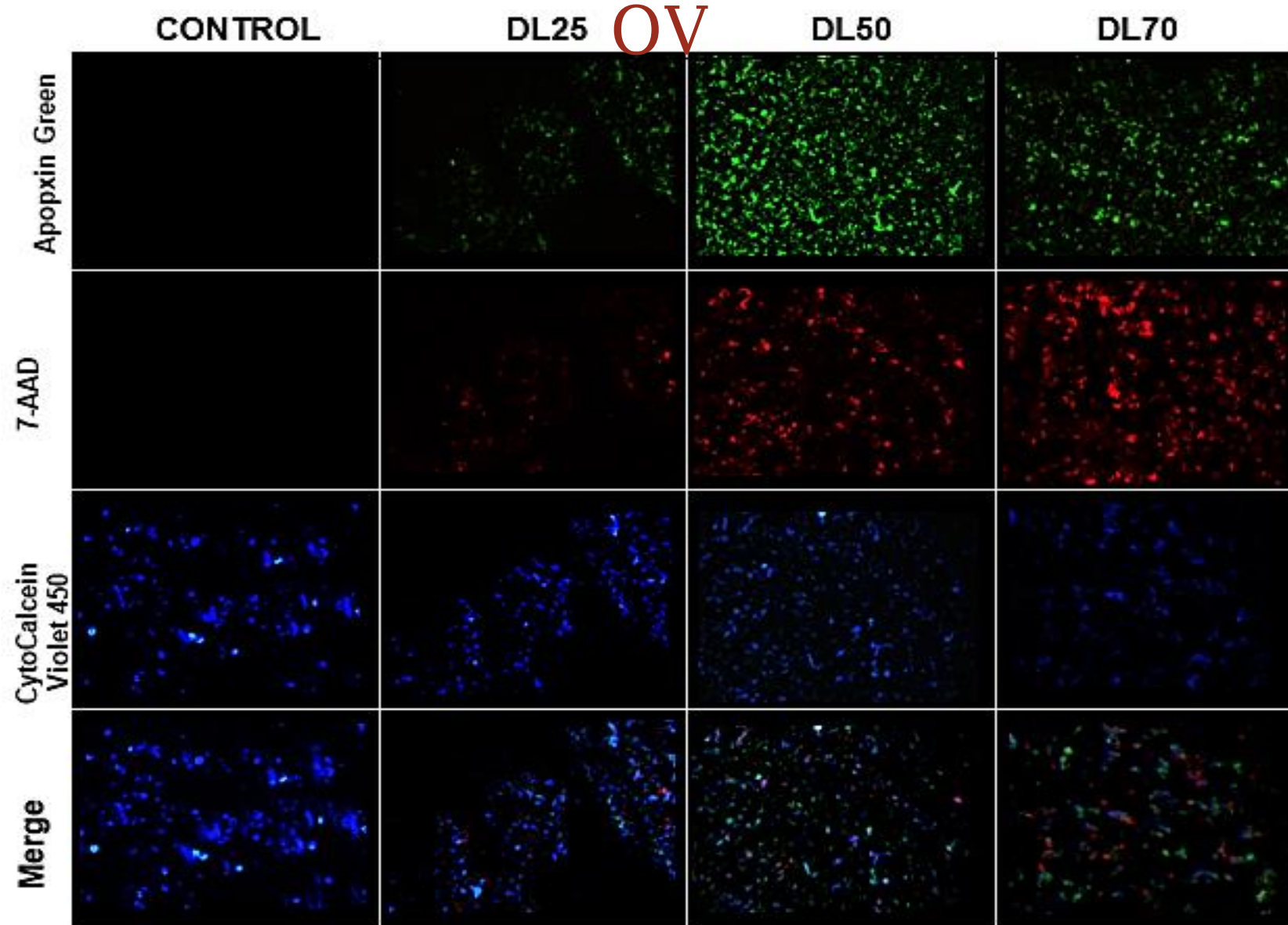
LAVADO CON  
BUFFER DEL  
KIT (2 VECES)

SE  
ADICIONÓ  
0,5  $\mu$ L DE  
7-AAD

SE  
ADICIONÓ  
1  $\mu$ L DE  
APOPXIN  
GREEN

RESULTADO: IDENTIFICACIÓN DE SEÑAL DE MUERTE

# SEÑALES DE MUERTE EN LINEA CELULAR MES-





## **METODOLOGÍA:** KIT CLICK-IT TUNEL ALEXA FLUOR 647

SIEMBRA DE 150,000 CÉLULAS MES-OV EN LAMINA MULTIPOZO

TRATAMIENTO CON CISPLATINO

LAVADO CON PBS 1X (2 VECES)

PERMEABILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS (SAPONINA 0,1%)

SE ADICIONÓ 20  $\mu$ L DE BUFFER TdT E INCUBAR A T° AMBIENTE

SE ADICIONÓ 20  $\mu$ L DE COCKTAIL DE REACCIÓN TdT E INCUBAR A 37°C POR 1 HORA

LAVADOS CON PBS 1X

SE ADICIONÓ EL COCKTAIL DE REACCIÓN, SE LAVÓ CON PBS 1X

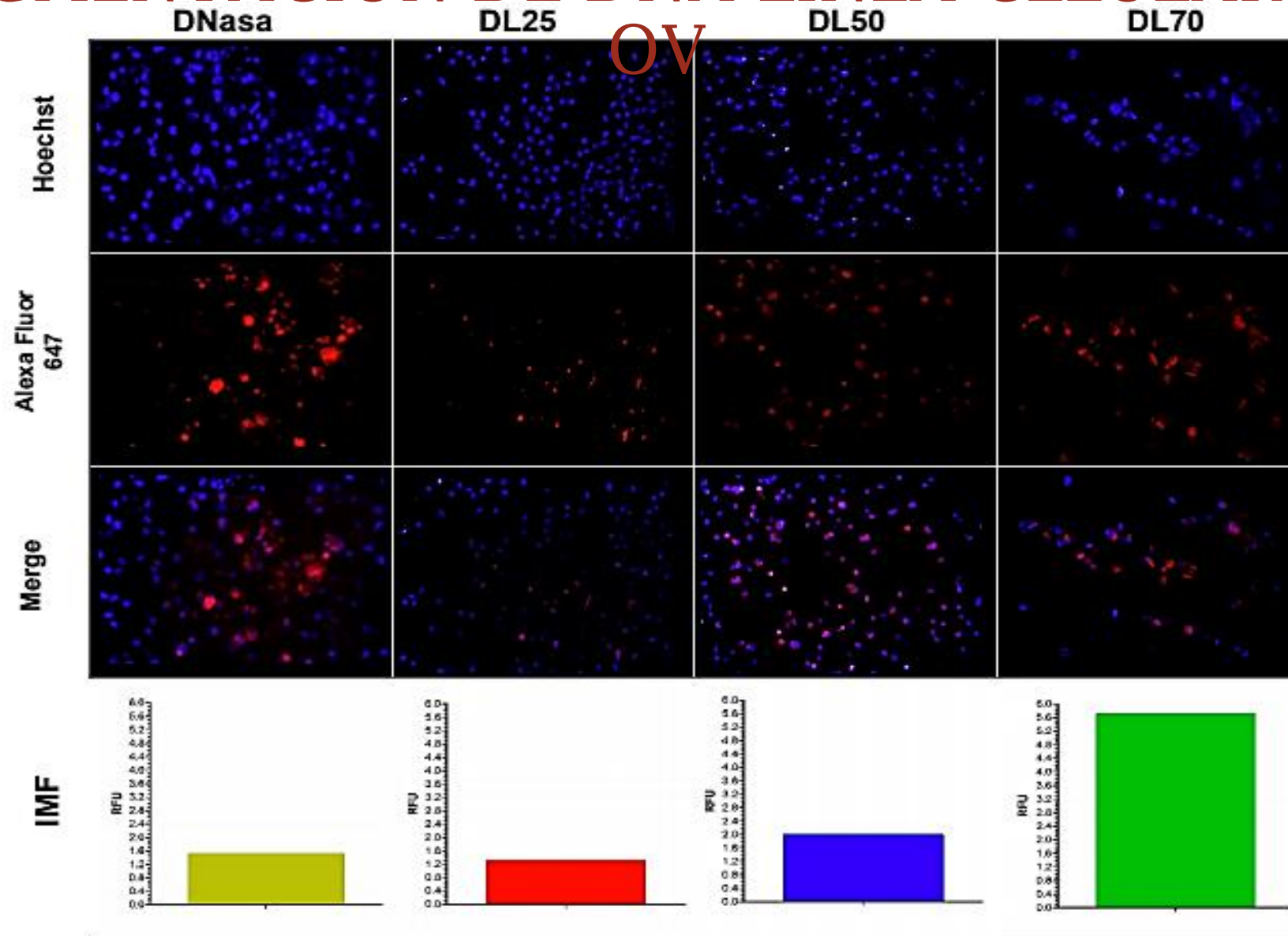
ANALISIS DE IMÁGENES BAJO EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA LEICA



RESULTADO: CAMBIOS EN LA FRAGMENTACIÓN DE DNA

# FRAGMENTACIÓN DE DNA LINEA CELULAR MES-

OV



# CONCLUSIONES

1. Se identificó cambios en las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 intracelular y en membrana mediante la técnica de Epi-inmunofluorescencia.
2. Se determinó que las proteínas de choque térmico Hsp70 y Hsp90 en la línea MES-OV cambian su expresión cuando se trataron con DL25, DL50 y DL70 de cisplatino.
3. Se identificó señales de muerte en las células MES-OV cuando fueron tratadas con cisplatino.
4. Se detectó fragmentación del DNA en células MES-OV tratadas con cisplatino.



# SUGERENCIAS

- Realizar la identificación de las proteínas de choque térmico Hsp27 y Hsp60 en la línea celular MES-OV (ATCC) al ser tratada con cisplatino.
- Identificar el protooncogen Her-2 junto con la proteína de choque térmico Hsp90 en membrana de las células MES-OV tratadas con cisplatino



# AGRADECIMIENTOS

- A la doctora Luz Dary Gutiérrez, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo.
- A la doctora Ruth Sánchez por su apoyo, orientación y atención a mis consultas sobre temas relacionados con metodología
- A la Fundación Universitaria De Ciencias De La Salud - FUCS por patrocinar este proyecto de investigación en su totalidad.
- A la Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca, por brindarme la oportunidad de realizar la práctica formativa especializada en la FUCS
- A mi mamá y a mi hermano, por el apoyo que me han ofrecido con mi proceso de formación profesional.



# 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/ProtocolosQT/FichasTecnicas/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. Banna E, Farina E, Zummo G, David S, Campanella C, Carini E, et al. HSP Molecular chaperones in



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, 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>



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. 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\\_FMIIP\\_2016.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia3/Clase_practica_control_microbiologico_FMIIP_2016.pdf)
23. Vallespí M, García I2. Annu Rev Microbiol. Habana 2008; 25:10.
24. Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. Methods. 2007; 43(3):229-37.
25. 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.
26. Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. J Biol Chem. 2005





29. 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

30. 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.

31. Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: From structure to drug development. *BMB Rep.* 2009; 42(10):623-30.

32. Medicina FDE, Doctoral T. *Celular En Cáncer De Ovario Y De.* 2016;

33. Perales Romero S. *Proliferación y Apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo.* 2005. 243 p.

34. Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2015; 5(0):364-78.

35. 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>

36. Powers M V., Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle.* 2009; 8(4):518-26.

37. 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>

38. Nimmervoll B, Chtcheglova LA, Juhasz K, Cremades N, Aprile FA, Sonnleitner A, et al. Cell surface



1. 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>
2. 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>
3. 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.
4. 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.



# MECANISMO DE ACCION DEL CISPLATINO

