



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de las proteínas de choque térmico como posibles dianas terapéuticas en sarcomas

Khaoulah El haji

Grado de Bioquímica

Año académico 2015-16

DNI del alumno: X5971580K

Trabajo tutelado por Regina Alemany Alonso
Departamento de Biología

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras claves del trabajo: Sarcoma, Proteínas de choque térmico, KIT, Factor de crecimiento insulínico tipo 1, Proteína de choque térmico 90.

ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Introducción	5
• Sarcomas	5
• Clasificación	5
• Características moleculares.....	6
• Terapia	9
• Proteínas de choque térmico	11
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos	13
5. Materiales y métodos.....	14
6. Resultados y discusión	15
7. Conclusiones	23
8. Referencias bibliográficas	24

1. Resumen

Los sarcomas son tumores del tejido conectivo, raro, maligno y de gran complejidad. Representa alrededor del 1% de todos los otros tipos de tumores en humanos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la clasificación de sarcoma se distingue en 11 categorías principales de tumores benignos y malignos de tejidos blandos que se subdividen en 113 subtipos histológicos, y 9 categorías de tumores óseos. Actualmente, se ha observado un papel importante de las proteínas de choque térmico (HSPs del inglés “Heat Shock Protein”) en la adquisición de resistencia, tanto a quimioterapia convencional como a la terapia de diana molecular, lo que ha dado lugar al desarrollo de inhibidores de HSPs. En este estudio bibliográfico se analiza la implicación de las HSPs en el mecanismo de resistencia de las células de sarcoma a antitumorales y se estudia si los inhibidores de las HSPs combinados con fármacos antitumorales potencian sus efectos en estos tumores.

Las HSPs más implicadas y estudiadas en el mecanismo de resistencia de células de sarcoma han sido las HSP90, donde en estudios preclínicos (cultivos celulares y estudios con animales) se observó un efecto antitumoral de varios inhibidores de HSP90 induciendo apoptosis, necrosis y disminución de proliferación tumoral. Estos estudios se han llevado a cabo sobre todo en células de osteosarcoma, sarcoma de Ewing y en tumores de estroma gastrointestinal. En la mayoría de las veces la combinación de los inhibidores de HSPs con otros fármacos antitumorales, tuvo un efecto sinérgico potenciando los efectos antitumorales de dichos fármacos. En general se ha observado una baja proporción de estudios clínicos, por lo que es necesario seguir investigando y llevar a cabo aún más ensayos clínicos para confirmar la efectividad antitumoral de los inhibidores HSPs, para conseguir implantarlos como fármacos antitumorales efectivos contra el sarcoma solos o combinados con la terapia convencional.

2. Introducción

Sarcomas

El término sarcoma se refiere a un tumor de tejido conectivo y deriva del griego “*sarkos*” (carne) y “*oma*” (tumor). Los sarcomas son tumores raros, malignos y de gran complejidad, y representan alrededor del 1% de todos los otros tipos de tumores en humanos. Además el 15% de los tumores malignos pediátricos son sarcomas, tienen una alta tasa de enfermedad metastásica y son refractarios a la terapia convencional [1, 2].

Clasificación

Los sarcomas son de origen mesenquimal, derivan del hueso, del músculo, de la grasa o del cartílago. Tradicionalmente han sido clasificados, basándose en la evaluación histológica, observando el grado del tumor y el tejido de origen, en 2 grupos generales: el sarcoma de tejidos blandos (STS, del inglés “Soft Tissue Sarcoma”) y el sarcoma de tejido óseo. Lamentablemente, este tipo de clasificación tiene limitaciones, ya que existen unos tipos de sarcomas que pueden ser indistinguibles y por lo tanto difícil de clasificar.

Los sarcomas también se pueden clasificar basándose en su cariotipo:

- Los sarcomas con cariotipos simples presentan translocaciones recurrentes, amplificaciones de genes y mutaciones oncogénicas específicas. La mayoría de los sarcomas pertenecen a esta categoría, como por ejemplo, el sarcoma de Ewing, el rabdomiosarcoma alveolar y el sarcoma sinovial.
- Los sarcomas con cariotipos complejos se caracterizan por numerosas pérdidas, ganancias y translocaciones desequilibradas no recíprocas. En este grupo de sarcomas se incluyen los sarcomas indiferenciados pleomórficos y los leiomiomas [3].

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha actualizado recientemente (2013) el sistema estándar de clasificación histológica de los STS y de los sarcomas de tejido óseo (Figura 1). Esto distingue 11 categorías principales de tumores benignos y malignos de tejidos blandos que se subdividen en 113 subtipos histológicos, y 9 categorías de tumores óseos. Una de las mayores modificaciones son la incorporación o la adición de 3 nuevas categorías que son el tumor de estroma gastrointestinal, el tumor de la vaina nerviosa y el sarcoma óseo pleomórfico de alto grado no diferenciado. Con los avances actuales en los estudios moleculares y genéticos, un subgrupo de tumores como el histiocitoma fibroso maligno tanto del tejido blando como del tejido óseo fue reclasificado en “los tumores de una diferenciación incierta” [4, 5].

SARCOMA

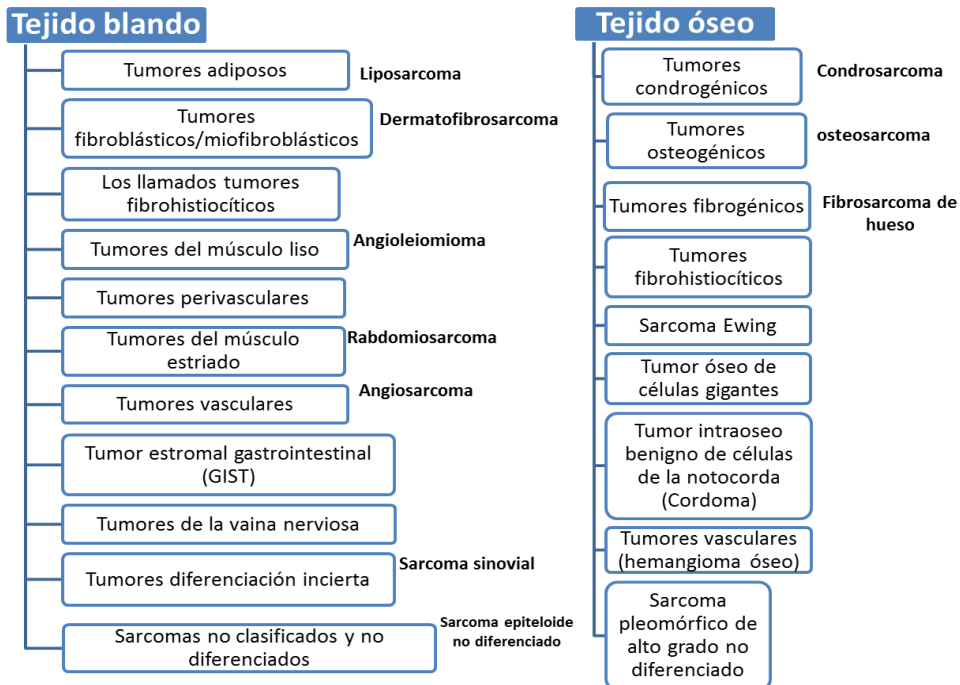


Figura 1. Clasificación de los sarcomas según la organización mundial de la salud 2013 [5].

Características moleculares

Los mecanismos que impulsan la génesis de los sarcomas humanos se presentan en 3 grandes categorías:

1. La desregulación transcripcional debido a las fusiones de genes que codifican proteínas de transcripción aberrantes. Un ejemplo de este tipo de mecanismo son las translocaciones que posee el sarcoma de Ewing donde se da la fusión del gen *EWS* con un factor de transcripción *FLI1* que pertenece a la familia ETS, y que se caracteriza por presentar una región de unión al DNA única. El resultado de esta fusión promueve la patogenicidad de las células de este subtipo de sarcoma.
2. Mutaciones somáticas en genes claves y en vías de señalización que controlan la proliferación celular, por ejemplo el tumor del estroma gastrointestinal (GIST) que es uno de los tipos de sarcoma más comunes, se caracteriza por mutaciones oncogénicas en *KIT* (gen que codifica para el receptor celular del factor de células madre “SCF” (del inglés “Stem Cell Factor”) con actividad tirosina quinasa) o, con menos frecuencia en el receptor- α para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFRA*). La mayoría de las mutaciones se encuentran en los exones 11 y 9, modificando el dominio transmembrana proximal y el dominio extracelular, respectivamente. Las mutaciones en el exón 11 permiten la activación y la dimerización del receptor en ausencia del ligando [6].
3. Numerosas anomalías en las copias de DNA. Un ejemplo de este tipo de mecanismo es una amplificación progresiva de la región cromosómica 12q. Esto

lleva a una sobreexpresión del gen HMGA2, ya que pierde su región no traducida 3' (UTR 3') y entonces se interrumpe la represión mediada por microRNA. Este tipo de anomalías se han observado en subtipos de liposarcoma [3].

Las alteraciones moleculares que pertenecen a la cascada de transducción de señales están también implicadas en la patogenicidad de los sarcomas conduciendo a la proliferación continua de las células [7].

Los sarcomas parecen presentar anomalías en la activación de las rutas de señalización del factor de crecimiento, específicamente la del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) [2]. Esta activación es debida a un aumento de los niveles del RNAm que codifica para el receptor IGF-1. Sin embargo, el mecanismo sigue desconocido, ya que no se han descrito mutaciones o amplificaciones genómicas en el locus del receptor IGF-1 [6]. En otros estudios se han visto que la fusión EWS/FL-1 también promueve la activación de IGF-1R por la represión de la expresión de IGFBP-3 (proteína de unión que regula negativamente la señalización de IGF-1R por secuestrar IGF-1) [8].

Una activación desregulada del IGF-1R desencadena, en consecuencia, la activación de una serie de proteínas señal en cascada. La unión del ligando al IGF-1R induce su activación por una autofosforilación en residuos tirosina y la fosforilación posterior de sus proteínas sustrato intracelulares (IRS y Shc). En presencia de IRS, la principal vía activada es a través de PI3K y AKT que a su vez activan mTOR contribuyendo a la supervivencia celular y la tumorigénesis. En el caso de la proteína Shc, se induce la activación de una cascada de una serie de proteínas (RAS, RAF y MEK) activándose así proteínas-quinasas activadas por mitógenos (ERK) que participan en la proliferación celular [9].

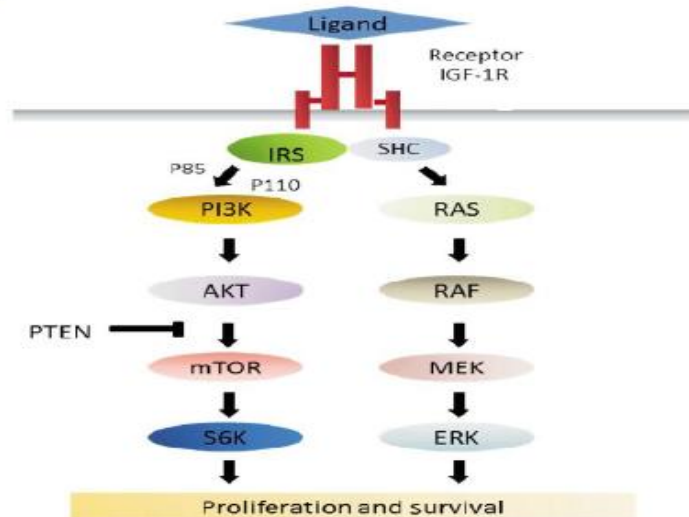


Figura 2. Representación esquemática de la vía de señalización de IGF-1R. La activación del receptor tras la unión del ligando induce la activación de dos vías de señalización (PI3K/AKT/mTOR y MAPK). Tomada de Chen, Helen X. et al. [9]

Otro ejemplo es la sobreactivación de los receptores C-KIT y PDGFRA que juegan un papel clave en la aparición y el desarrollo de los tumores del estroma gastrointestinal. Ambos son proteínas transmembrana con actividad tirosina quinasa. La unión específica de su agonista SCF o PDGF, respectivamente, puede inducir la dimerización de dichos receptores y su autofosforilación, dirigiendo de esta forma la señal hacia distintas cascadas de señalización:

- La cascada de PI3K/AKT y la cascada de MAPK son similares que en el caso de IGF1R, y juegan un papel muy importante en la diferenciación, la supervivencia celular y la angiogénesis.
- La cascada de PLC- γ . PLC- γ cataliza el PIP2 fosfoinosítido para generar un segundo mensajero diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato soluble (IP3). Este complejo DAG-IP3 induce la proliferación celular y IP3 se une al retículo endoplásmico para estimular la liberación de Ca^{2+} que también induce la proliferación celular.
- La cascada de JAK/STAT. JAK es una tirosina quinasa citoplasmática que puede ser activada por C-KIT, una vez activada fosforila y dimeriza factores de transcripción STATs. Finalmente estos factores de transcripción pasan al núcleo donde regulan la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular [10].

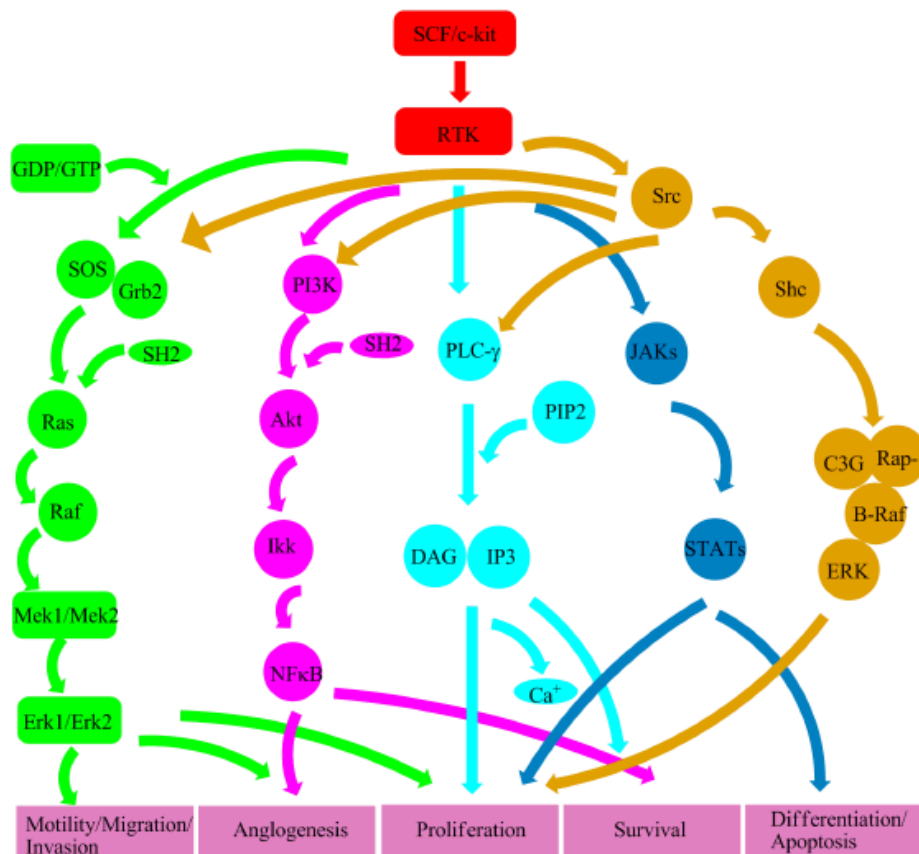


Figura 3. Representación esquemática de la vía de señalización de C-KIT. La activación de C-KIT tras la unión de SCF induce la activación de una serie de cascadas de señalización intracelular (PI3K/AKT, MAPK, PLC- γ y JAK/STAT). Tomada de Liang, Jing et al. [10]

La elucidación de estas vías y los mecanismos moleculares por los cuales se inhiben, se están convirtiendo en posibles dianas terapéuticas para ciertos subtipos de sarcomas.

Terapia

La cirugía es el principal tratamiento que se lleva a cabo en el cáncer. En general, los tumores pequeños de bajo grado con amplios márgenes negativos patológicos pueden ser tratados únicamente con cirugía [11].

Los tumores de mayor grado pueden beneficiarse de la radioterapia, reduciendo su recurrencia local, pero con ningún beneficio en la supervivencia global. No hay ninguna preferencia entre la radioterapia preoperatoria y la postoperatoria, el enfoque que se utiliza depende del centro de tratamiento. La radioterapia preoperatoria puede permitir un campo más pequeño a tratar y facilita la cirugía mediante la disminución del tamaño del tumor. La radiación postoperatoria también podría disminuir la incidencia de complicaciones postoperatorias de la lesión [11].

Antes o después de la cirugía, la principal terapia utilizada en sarcomas es la quimioterapia. La quimioterapia preoperatoria reduce el tamaño del tumor, haciendo más fácil la cirugía. Asimismo, también ayuda para decidir sobre si la quimioterapia postoperatoria debe ser considerada. De los agentes quimioterapéuticos que se han utilizado para tratar los STS, los dos más utilizados actualmente son la doxorubicina y la ifosfamida. El uso de gemcitabina también está aumentando [11].

La doxorubicina es uno de los primeros fármacos que han demostrado ser útiles para sarcomas, provocando una respuesta del 10% hasta 30% en STS. Sin embargo, una dosis alta de doxorubicina causa cardiotoxicidad. Para reducir el potencial de esta toxicidad y mejorar su eficacia se ha desarrollado una nueva formulación en la que la doxorubicina está contenida en liposomas que están recubiertos con metoxipoli-etilenglicol (confiere una disminución de la captación por el sistema reticuloendotelial y una vida media larga en la sangre). Esta nueva formulación se llama Doxorubicina liposomal pegilada (PLD) [11].

La ifosfamida es un profármaco que se metaboliza en el hígado para que sea un agente alquilante activo. Su desarrollo fue limitado por la toxicidad urotelial de sus metabolitos. Es uno de los fármacos más activos para el tratamiento del sarcoma. En algunos casos, una dosis alta de ifosfamida ($>10 \text{ g/m}^2$) puede ser útil, pero puede estar asociada con una toxicidad sustancial. Los liposarcomas mixoide y los sarcomas sinoviales han demostrado una sensibilidad significativa a la ifosfamida [11].

La gemcitabina es un fármaco que pertenece al grupo de los análogos de nucleósidos, es activo en ciertos STS, especialmente en el leiomiomasarcoma uterino (LMS) y el histiocitoma fibroso maligno (HFM). La gemcitabina debe ser fosforilada dentro de la célula para llevar a cabo su actividad. La gemcitabina difosforilada inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa, interfiriendo en la síntesis del DNA [11].

El metotrexato, otro agente quimioterapéutico importante en el tratamiento del osteosarcoma, actúa inhibiendo a la enzima dihidrofolato reductasa y por lo tanto inhibe la síntesis de bases nitrogenadas y ciertos aminoácidos [11].

Los rápidos avances en la comprensión de los mecanismos moleculares en la oncogénesis del sarcoma, han llevado al desarrollo de nuevos fármacos basados en la terapia de diana molecular, como un enfoque terapéutico para la superación de la

resistencia a fármacos quimioterapéuticos [12]. A continuación, se detallan algunos agentes que han mostrado actividad antitumoral en ciertos sarcomas.

El primer fármaco y el más conocido que ha sido aprobado por la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés “Food and Drug Administration”) es el inhibidor de ciertas tirosinas-quinasas, imatinib. Inicialmente se ha desarrollado como un inhibidor de PDGFR, posteriormente fue dirigido contra la proteína de fusión BCR-ABL en leucemia mieloide crónica, más tarde se ha encontrado que tiene actividad contra el receptor de tirosina-quinasa (C-KIT) sobreactivado en tumores del estroma gastrointestinal. Imatinib actúa sobre el sitio de unión a ATP de la mutante quinasa KIT e inhibe la autofosforilación independientemente del ligando, de esta forma altera la señalización desregulada que induce la proliferación y la supervivencia del tumor [13]. Con Imatinib se logró un beneficio del orden de 70-80% en la progresión del tiempo de supervivencia hasta alrededor de 24 meses y una mediana de supervivencia global de cerca de 5 años. A pesar de esta eficacia inicial innegable del imatinib, la mayoría de los pacientes conservaron una enfermedad residual que eventualmente volvió a aparecer al cabo de 2-3 años [14].

La vía del IGF-1R es un objetivo para la terapia basada en la diana molecular, ya que es implicada en el desarrollo de distintos tipos de sarcoma (sarcoma de Ewing, rhabdomiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial y leiomiomasarcoma). AVE1642, un anticuerpo monoclonal dirigido contra IGF-1R, ha mostrado efectos sinérgicos en el tratamiento de leiomiomasarcoma en combinación con gemcitabina. AG1024, otra molécula inhibidora de la función quinasa del receptor IGF-1R, también ha mostrado efectos sinérgicos en el tratamiento de osteosarcoma en combinación con doxorubicina [15].

Aparte de estas dos estrategias terapéuticas de diana molecular, hay otros agentes o fármacos dirigidos a otros tipos de proteínas tirosina-quinasa que intervienen en vías de señalización implicadas en el desarrollo neoplásico de sarcomas, como los que se muestran en la Figura 4.

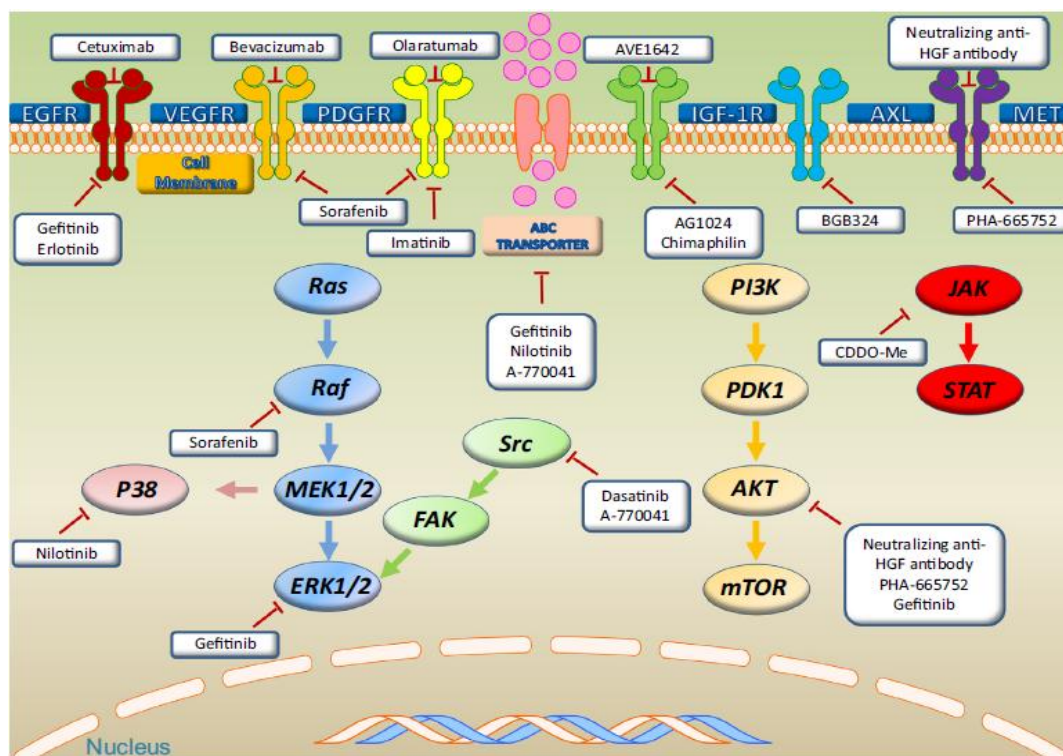


Figura 4. Ilustración de distintas dianas terapéuticas dirigidas a proteínas tirosina-quinasa en sarcomas. Estas dianas terapéuticas incluyen receptores tirosina-quinasa, no receptores de tirosina-quinasa, transportadores tipo ABC y proteínas claves de tres vías de señalización (PI3K/AKT/mTOR, MAPK, y JAK/STAT). Tomada de Chen. Hua et al. [15]

A pesar de la presencia de todas estas estrategias terapéuticas, sigue habiendo casos de los sarcomas con metástasis que desarrollan resistencia tanto a quimioterapia como a fármacos de diana molecular. Esta resistencia consiste en desarrollar mecanismos moleculares y metabólicos alternativos que ayudan a las células tumorales a sobrevivir a la quimioterapia y a los fármacos de diana molecular. Por eso, es necesario estudiar e identificar estos mecanismos implicados en esta resistencia.

Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico son proteínas altamente conservadas que desempeñan un papel vital en el mantenimiento del proteoma, ayudando en el correcto plegamiento de las proteínas (llamadas “proteínas diana”), de esta manera actúan como chaperonas moleculares. Las HSPs son proteínas abundantes tanto en células procariotas como en células eucariotas y se encuentran entre las proteínas mejor conservadas filogenéticamente, con respecto a función y a estructura. La expresión de las HSPs se induce en respuesta a una amplia variedad de cambios fisiológicos y ambientales, incluyendo los estados de estrés provocados por la quimioterapia, lo que permite a la célula sobrevivir en condiciones letales [16].

Las HSPs se clasifican en cinco clases o familias principales y se nombran según su peso molecular (en kilodaltons (kDa)): familia de HSP100, familia de HSP90, familia de HSP70, familia de HSP60 y familia de HSP pequeñas (peso molecular entre 12 y 43 kDa). Las HSPs de alto peso molecular son chaperonas dependientes de ATP, mientras que las HSPs de pequeño peso molecular actúan de manera independiente de ATP [16].

La expresión de altos niveles de HSPs se ha demostrado en varios tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata. Estos altos niveles de la expresión de HSPs se ha observado que se correlacionan con la proliferación de las células tumorales [16]. El desarrollo del cáncer implica una desregulación en el control del ciclo celular, y cambios en la homeostasis celular. Tales cambios promueven mutaciones por lo que llevan a una alta expresión de oncogenes, que se encuentran estabilizados por los altos niveles de HSPs (Figura 5) [17].

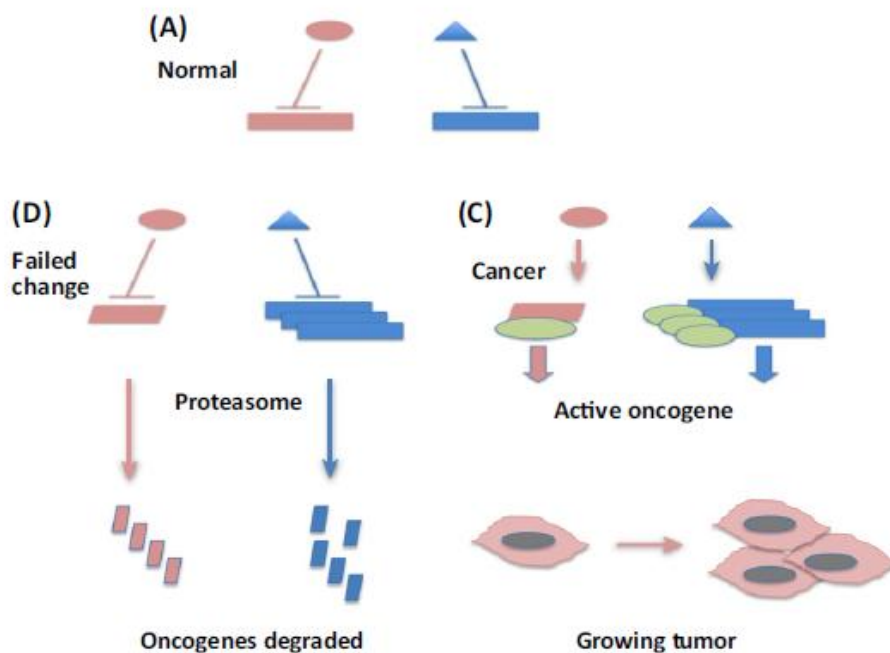


Figura 5. Papel de las HSPs en el desarrollo del cáncer. (A) La expresión suprimida de los oncogenes (rectángulos) por proteínas reguladoras (esfera y triángulo) en una célula normal. (D) Cambios en el potencial oncogénico por mutación (rectángulo rosa) o por una elevada expresión de oncogenes (múltiples rectángulos azules), y su degradación mediada por proteosoma. (C) Elevados niveles de HSPs (esferas de color verde) permiten la transformación tumoral, y su posterior crecimiento por una estabilización de los oncogenes mutados o sobreexpresados. Tomada de Caldewood et al. [17]

Las HSPs más estudiadas son las HSP90, HSP70 y HSP27. Actúan manteniendo la integridad de las proteínas mutadas implicadas en las cascadas de señalización proliferativas y afectan inhibiendo la vía de apoptosis, actuando sobre supresores tumorales como la proteína p53. También contribuyen en la angiogénesis estabilizando el factor de transcripción HIF1 (factor inducible por hipoxia), como es el caso de HSP90. La HSP27 actúa como un factor angiogénico y se une a los receptores induciendo una simulación de la transcripción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) a través de una vía alternativa que implica al factor NF- κ B. La HSP90 tiene un papel importante en la prevención de la apoptosis a través de su efecto sobre la vía de AKT quinasa, siendo AKT una proteína diana de HSP90, entre otras como MEK, STAT3, SRC, Raf-1 y muchos receptores tirosina-quinasa. La expresión de las HSPs parece ser esencial en el desarrollo maligno de las células cancerosas, incluyendo el crecimiento descontrolado, la inactivación de los supresores tumorales, la supervivencia celular, y la adquisición de capacidades para la angiogénesis y la metástasis. Por lo tanto, la inhibición de las HSPs es una importante estrategia para el desarrollo de fármacos antineoplásicos eficientes de diana múltiple [16, 17].

Inhibidores de HSPs

La HSP90 se caracteriza por presentar un dominio con un sitio de unión a ATP donde se unen productos inhibidores como geldanamicina y 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG; análogo a geldanamicina). 17-AAG es el primer inhibidor de HSP90 que ha sido utilizado clínicamente y se ha demostrado su actividad contra el cáncer, como por ejemplo, en cáncer de colon y de hígado. Sin embargo, 17-AAG es poco soluble y presenta un perfil significativo de toxicidad, lo que impide su desarrollo clínico [16].

Posteriormente se han desarrollado inhibidores de HSP90 como N,N-dimetiletanolamino (17-DMAG), un análogo de 17-AAG, y IPI-504 (retaspimicina), que presentan una mejora en la solubilidad, y una toxicidad tolerable [16]. Más recientemente se han desarrollado nuevos inhibidores con mejores características estructurales y mejor perfil farmacológico, tales como PU-H71, PU-DZ8 y CNF2024 (BIIB021), que son derivados de purina [16]. Éste último ha mostrado una actividad antitumoral potente, tanto *in vitro* como *in vivo*, en una variedad de tumores. Otros inhibidores de HSP90 que se han desarrollado como agentes clínicos más eficaces, y están en fase de ensayos clínicos son los inhibidores de HSP90 de pequeño peso molecular específicos (SNX-5422, CNF2024, STA9090 y AUY922) [16]. Entre ellos, se destaca AUY922 que es un compuesto a base de isoxazol que inhibe la actividad de ATPasa de la HSP90 [16].

En el caso de la HSP70 que es una proteína altamente estable y protegida se ha visto que puede reducir fácilmente el efecto de la apoptosis inducida por inhibidores de HSP90, por lo que su inhibición es una estrategia terapéutica importante. Recientemente ha surgido un estudio preclínico de una clase de inhibidores de HSP70 como por ejemplo MAL3-101 que se une específicamente a HSP70 y afecta su interacción con sus co-chaperonas, presentando un efecto antitumoral [16].

La posibilidad de la inhibición de HSP27 como una diana molecular terapéutica ha sido valorada. Sin embargo, el hecho de que es una proteína de choque térmico de pequeño peso molecular independiente de ATP, hace que sea una molécula problemática a la hora de su orientación para llevar a cabo su inhibición.

3. Hipótesis

Existe una relación importante entre las proteínas de choque térmico y la adquisición de resistencia a fármacos antitumorales.

4. Objetivos

1. Estudiar la implicación de las HSPs en el mecanismo de resistencia de las células de sarcoma a antitumorales.
2. Estudiar si los inhibidores de las HSPs combinados con antitumorales potencian sus efectos farmacológicos en los sarcomas.

5. Materiales y métodos

Para realizar este estudio se ha hecho una revisión bibliográfica. La búsqueda bibliográfica se ha realizado desde octubre de 2015 hasta mayo de 2016 en la base de datos MEDLINE, a través de Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), con el objetivo de asegurar la exhaustividad de la revisión.

Se utilizaron los siguientes términos para llevar a cabo la búsqueda: *sarcoma and heat shock protein*; *osteosarcoma and heat shock protein*; *Ewing sarcoma and heat shock protein*; *Gastrointestinal stromal tumor and heat shock protein*; *liposarcoma and heat shock protein*.

Para añadir más información específica sobre los estudios clínicos llevados a cabo en sarcomas, se ha utilizado la base de datos “ClinicalTrials” (<https://clinicaltrials.gov>), introduciendo los siguientes términos: *sarcoma and HSP*, *GIST and HSP*, *osteosarcoma and HSP* y *Ewing sarcoma and HSP*.

Los criterios de inclusión de artículos aplicados fueron:

- a) Artículos con los términos de búsqueda en título y resumen.
- b) Publicados en los últimos 10 años, es decir, entre el 2006 y el 2016.
- c) Que explicaran la relación de las HSPs en la resistencia a la quimioterapia convencional en los diferentes subtipos de sarcomas.
- d) Tipo de estudios: estudios preclínicos tanto *in vitro* como *in vivo*, estudios clínicos en pacientes con sarcoma y revisiones bibliográficas.
- e) Estudios publicados en inglés y español.

Los criterios de exclusión de artículos aplicados fueron:

- a) Estudios que no contribuyen a lograr los objetivos generales del trabajo, como por ejemplo artículos en los que sólo se mencionan las palabras: sarcoma o algún subtipo de sarcoma sin contribuir en los objetivos del trabajo.
- b) Estudios en los que se ha detectado ausencia de la información necesaria para su inclusión en el trabajo.

Para llevar a cabo la búsqueda bibliográfica, se ha realizado una primera selección de los artículos mediante la lectura del título y del resumen. Posteriormente con la lectura del texto completo se han revisado aquellos que cumplieran los criterios de inclusión.

Para sintetizar la información obtenida de los artículos seleccionados se han diseñado las siguientes tablas que aparecen en el apartado resultados :

- Tablas que recogen estudios preclínicos (*in vitro* e *in vivo*), incluyen información sobre el autor, el año de su publicación, el subtipo de sarcoma estudiado, el tipo de terapia utilizada, el tipo de muestra, el nombre del inhibidor de HSP utilizado, el tipo de HSPs que inhibe, la combinación del inhibidor de HSP con otros antitumorales y el efecto descrito.
- Tablas que recogen estudios clínicos, incluyen información sobre el autor, el año de su publicación, el subtipo de sarcoma estudiado, la fase del estudio clínico, tipo de pacientes seleccionados, los nombres de los inhibidores de HSP90

utilizados, los efectos adversos, la dosis máxima tolerable y la respuesta antitumoral descrita.

5. Resultados y discusión

En la Figura 6 se pueden apreciar los pasos seguidos para la selección de los artículos. Se obtuvieron 485 artículos tras una primera búsqueda. A continuación, se excluyeron 449 artículos por idioma, temporalidad, títulos y resúmenes no idóneos seleccionándose 36 artículos.

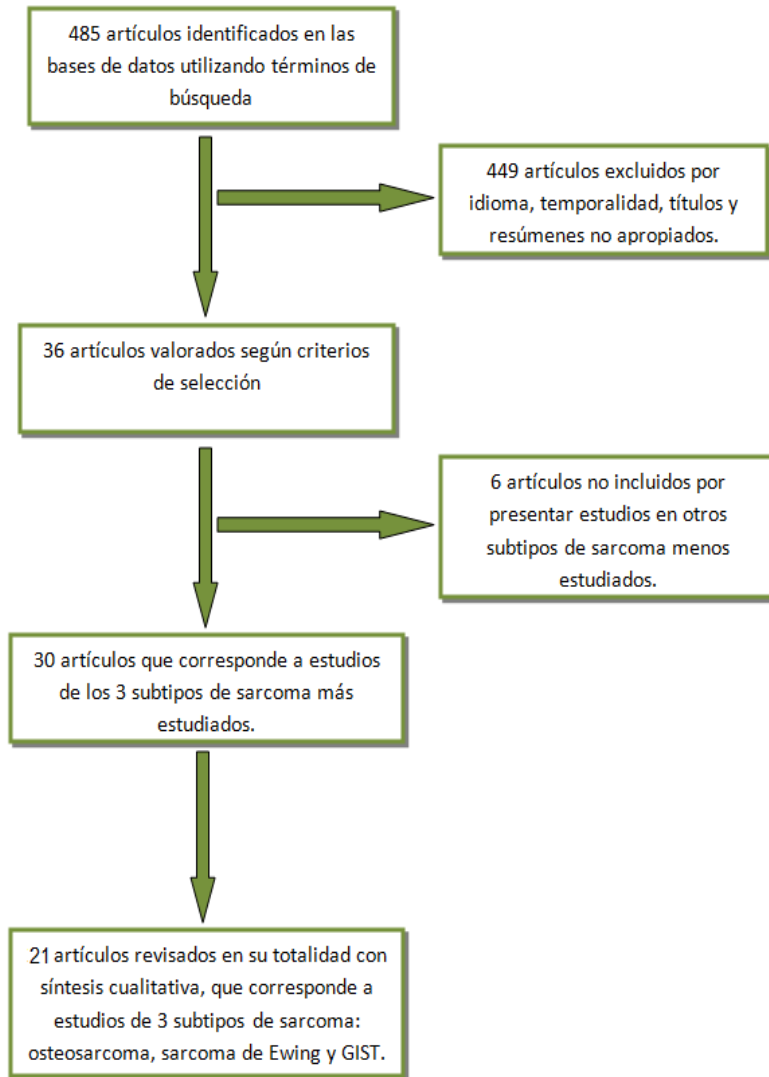
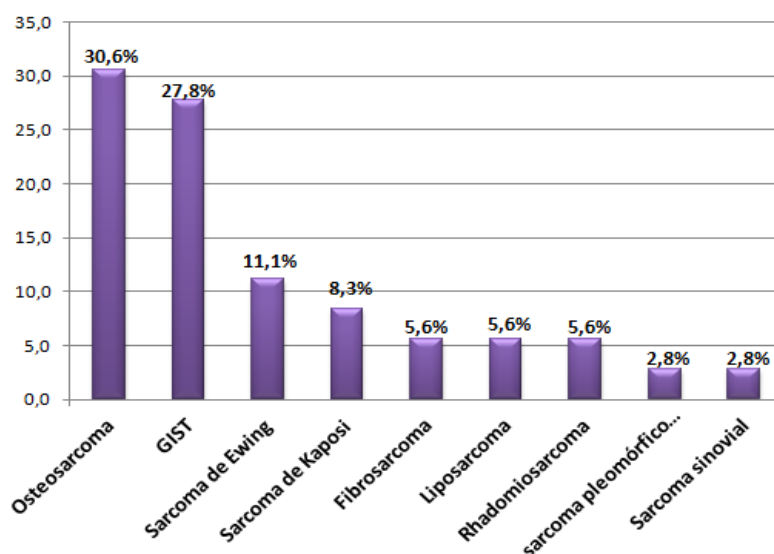


Figura 6. Esquema de la búsqueda y selección de artículos

Los 36 artículos seleccionados para el estudio fueron agrupados, teniendo en cuenta el subtipo de sarcoma estudiado (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de los estudios en subtipos de sarcoma obtenidos de la primera búsqueda.

Observando la gráfica 1 se aprecia que un mayor porcentaje de estudios que investigan el papel de las HSPs en el mecanismo de resistencia a fármacos antitumorales se centran en los siguientes subtipos de sarcomas: osteosarcoma, GIST y sarcoma de Ewing que en conjunto sumaron 30 artículos. Mientras que los subtipos con menor porcentaje de estudios fueron el sarcoma pleomórfico no diferenciado y el sarcoma sinovial.

Después de afinar y limitar este trabajo a los 3 subtipos de sarcomas más estudiados, se redujo el número de artículos seleccionados a 30. Tras una lectura detallada de estos artículos se excluyeron 9 artículos por presentar irregularidades, obteniéndose finalmente 21 artículos (Figura 6). De estos 21 artículos, tres de ellos, referencias [18], [19] y [20] presentan estudios que confirman únicamente el papel de las HSPs en la adquisición de resistencia a fármacos antitumorales en osteosarcoma y sarcoma de Ewing, sin presentar datos sobre ningún inhibidor de HSPs. En ellos, se han confirmado los altos niveles de HSPs tanto en células de osteosarcoma como en células de sarcoma de Ewing, después de ser tratados con doxorubicina y otros fármacos quimioterapéuticos, a través de su cuantificación mediante la técnica del *western blot*. El resto recoge estudios que además de confirmar la intervención de las HSPs en la adquisición de la resistencia a antitumorales, también indican y presentan datos sobre el efecto de los inhibidores de las HSPs (ver tablas).

Es preciso señalar que no se ha encontrado ninguna revisión ni sistemática ni narrativa sobre el tema, por lo que se tuvo que recolectar los artículos de estudios separados y analizarlos uno por uno.

En los estudios seleccionados se han llevado a cabo: estudios preclínicos (*in vitro* con células tumorales e *in vivo* con modelos de animal con tumores xenográficos) y estudios clínicos (Figura 7).

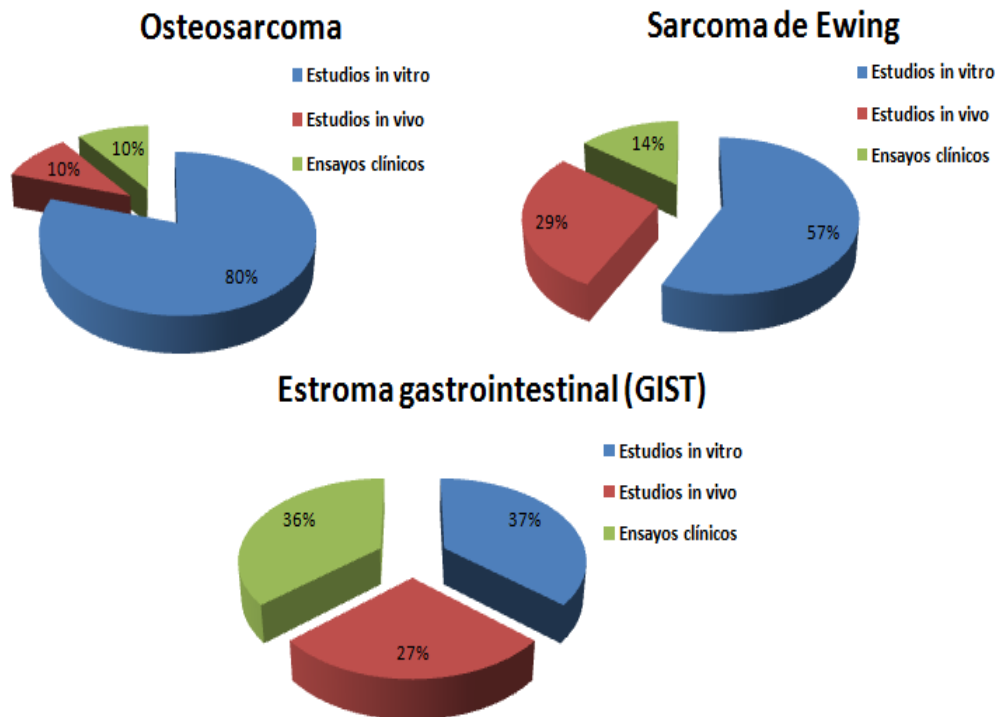


Figura 7. Porcentaje de los distintos tipos de estudios en los 3 subtipos de sarcoma (Osteosarcoma, sarcoma de Ewing y GIST).

En la Figura 7, se observa un porcentaje alto de estudios *in vitro* en todos los 3 subtipos de sarcoma. Este hecho sugiere que el tipo de estudio que predomina teniendo en cuenta los criterios de selección de artículos en este trabajo son los estudios *in vitro*. Este predominio de estudios *in vitro* es lógico, ya que es imprescindible una evidencia sólida adquirida a partir de estos estudios para llegar al siguiente paso de la investigación y llevar a cabo estudios *in vivo* y posteriormente realizar ensayos clínicos. También se puede apreciar una menor diferencia entre los porcentajes de los distintos tipos de estudios en el caso de GIST. Sin embargo, en el caso de osteosarcoma y sarcoma de Ewing observamos una mayor diferencia entre los distintos estudios, donde prevalecen los estudios *in vitro* frente a los estudios con animales (*in vivo*) o a los estudios clínicos. Esta diferencia se puede justificar al tener en cuenta que estos últimos subtipos de sarcoma pertenecen a los tumores pediátricos, de manera que es más difícil llegar a alcanzar un número considerable de pacientes para llevar a cabo ensayos clínicos.

La siguiente tabla 1 recoge la información sobre los estudios preclínicos llevados a cabo *in vitro* con cultivos de células de osteosarcoma, GIST y sarcoma de Ewing tratadas con inhibidores de HSPs combinados o no con quimioterapia o fármacos de diana molecular.

Autor/año	Subtipo de sarcoma	Tipo de Terapia al que se adquiere resistencia	Inhibidores de HSPs	Tipo de HSPs	Combinación con otros antitumorales	Efecto	Referencias
Chinn et al. 2012	Osteosarcoma	MAP ^a	SNX-2112 Dosis= 9nM	HSP90	SNX-2112 + Cisplatino	Inhibición de crecimiento y proliferación celular	[21]
Sharma et al. 2013	Osteosarcoma	MAP	AUY922 Dosis= 100nM	HSP90	AUY922+ SCH727965 ^b	Apoptosis y disminución de la supervivencia celular	[22]
Gorska et al. 2013	Osteosarcoma	MAP	Geldanamicina Dosis= 4 µM	HSP90 y HSP60	-	Aumento de necrosis y apoptosis	[23]
Mori et al. 2015	Osteosarcoma	Quimioterapia	Geldanamicina Dosis= 5.974 µM	HSP90	-	Autofagia y apoptosis	[24]
Banerjee et al. 2013	Osteosarcoma	Quimioterapia	Minnelide/triptolide ^c Dosis= 50 nM	HSP70	-	Apoptosis e inhibición de la proliferación celular.	[25]
Bauer et al. 2006	GIST	Imatinib	17AAG Dosis= 100nM	HSP90	-	Apoptosis y disminución del crecimiento celular	[26]
Dewaele et al. 2008	GIST	Imatinib	IPI-504 Dosis= 500 nM	HSP90	-	Apoptosis y degradación celular	[27]
Hsueh et al. 2013	GIST	Imatinib	AUY922 Dosis= 50 nM	HSP90	-	Autofagia y apoptosis	[28]
Hsueh et al. 2014	GIST	Imatinib	AUY922 Dosis= 32nM	HSP90	AUY922 + rapamicina ^d	Muerte celular por autofagia y apoptosis	[29]
Smyth et al. 2012	GIST	Imatinib	AT13387 Dosis= 310nM	HSP90	-	Inhibición de proliferación celular	[30]
Martins et al. 2008	Sarcoma de Ewing	Imatinib	17-AAG Dosis= 1.01 a 1.62 µM	HSP90	17-AAG + Imatinib	Disminución de crecimiento tumoral y necrosis celular	[31]
Roundhil et al. 2015	Sarcoma de Ewing	Doxorrubicina	17-AAG Dosis= 6.25-1600 nM	HSP90	-	Disminución del proliferación y viabilidad celular	[32]
Ambati et al. 2013	Sarcoma de Ewing	Doxorrubicina y ciclofosfamida	PU-H71 Dosis= 0.5 µM	HSP90	-	Apoptosis e inhibición del crecimiento celular	[33]

^a MAP: Un tipo de quimioterapia formada por una combinación de doxorrubicina, metotrexato, y cisplatino.

^b Un inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina.

^c Un profármaco de triptolide que es un epóxido diterpeno antiinflamatorio derivado de la planta china "*tripterygium wilfordii*", se identificó como una molécula inhibidora de la transcripción de genes de choque térmico.

^d Un agente anticancerígeno que inhibe mTOR, además se utiliza ampliamente como un inmunosupresor en pacientes de órganos trasplantados.

Las células de sarcomas utilizadas en los estudios recogidos en la tabla 1 son líneas celulares de las que los autores conocen su resistencia a fármacos antitumorales convencionales como por ejemplo doxorubicina, cisplatino e imatinib, entre otros. Por ello, las células fueron tratadas con los inhibidores de HSPs solos o combinados con los fármacos antitumorales. Los más utilizados han sido los que inhiben a la HSP90, entre los otros tipos de HSPs. Estos resultados sugieren que el tipo de HSP más involucrado en el desarrollo de la resistencia a quimioterapia en osteosarcoma, GIST y sarcoma de Ewing sea probablemente la HSP90. En todos los estudios se aprecia una buena eficacia de estos inhibidores, induciendo apoptosis, necrosis y disminución de proliferación tumoral. Además, los inhibidores de HSP90 son los únicos que han sido combinados con los fármacos antitumorales.

En osteosarcoma hay dos casos de combinación con efectos sinérgicos. El primer caso es la combinación de SNX-2112 con cisplatino (fármaco quimioterapéutico utilizado en la terapia convencional), que ha resultado en una mayor actividad antitumoral que la que podría haberse alcanzado con estos dos fármacos por separado. El otro caso es la combinación de AUY922 y SCH727965 (inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina), donde se dio lugar a la escisión de la caspasa-3 provocando su activación y su posterior inducción a la muerte celular.

En GIST, se ha dado una combinación de efecto sinérgico entre AUY922 y rapamicina, que derivó en una mayor apoptosis.

En sarcoma de Ewing la combinación de 17-AAG e imatinib provocó también un efecto antitumoral sinérgico, y además de inhibir la proliferación tumoral también provocó la necrosis celular.

En conjunto, estos resultados demuestran que *in vitro* la combinación de inhibidores de HSP90 con antitumorales utilizados en el tratamiento de osteosarcoma, GIST y sarcoma de Ewing tienen un efecto sinérgico antitumoral que podría contrarrestar la resistencia de estas células tumorales a la quimioterapia convencional.

La siguiente tabla 2 agrupa la información encontrada sobre los estudios preclínicos llevados a cabo *in vivo* con modelos de animal con tumores xenográficos, tratados con inhibidores de HSPs combinados o no con quimioterapia o fármacos de diana molecular.

Autor/Año	Subtipo de sarcoma	Tipo de muestra	Inhibidores de HSPs	Tipo de HSPs	Combinación con otros antitumorales	Conclusión	Referencias
Banerjee et al. 2013	Ostosarcoma	24 ratones atímicos nu/nu ¹ con una inoculación intratibial de células	Minnelide (0.42 mg/kg)	HSP70	-	Disminución metástasis y del volumen tumoral	[25]
Hsueh et al. 2013	GIST	Ratones NOD/SCID ² con una inoculación subcutánea de células GIST	AUY922(25 mg/kg)	HSP90	AUY922 + rapamicina	Disminución del volumen tumoral por necrosis celular	[28]
Floris et al. 2011	GIST	Ratas desnudas atímicas NMRI (albinos)	IPI-504 (100mg/kg)	HSP90	IPI-504 + Imatinib o Sunitinib	Disminución del volumen tumoral	[34]
Smyth et al. 2012	GIST	Ratones SCID, inmunocompetentes congénicos BALB/c	AT13387 (70 mg/kg)	HSP90	AT13387 +Imatinib	Inhibición del crecimiento tumoral y disminución del volumen tumoral	[30]
Martins et al. 2008	Sarcoma de Ewing	Ratas NOD/SCID	17-AAG (80mg/kg)	HSP90	17-AAG + AEW541 (inhibidor IGF-1R).	Disminución del tamaño y crecimiento tumoral.	[31]
Ambati et al. 2013	Sarcoma de Ewing	Ratones NOD/SCID y ratones desnudos	PU-H71 (75mg/kg)	HSP90	PU-H71 + Bortezomib ³	Disminución metástasis y del tamaño tumoral	[33]

¹ Un tipo de ratones que muestran un fenotipo desnudo, son inmunodeficientes por carencia de un timo funcional.

² Un tipo de ratones con inmunodeficiencia combinada severa.

³ Un fármaco antitumoral de diana molecular, que actúa como un inhibidor selectivo del proteosoma provocando la muerte celular.

En la tabla 2 se recogen estudios en los que ratones inmunodeficientes con tumores xenográficos de células humanas de ostesarcoma, GIST o sarcoma de Ewing resistentes a la quimioterapia convencional son tratados con inhibidores de HSPs solos o combinados con otros fármacos antitumorales, como el imatinib, sunitinib o rapamicina en GIST, AEW541 (inhibidor del IGF-1R) o bortezomib en sarcoma de Ewing. Al igual que en los estudios *in vitro* los inhibidores de HSP90 vuelven a prevalecer de entre los otros tipos de HSPs. Estos resultados indican que son también los tipos de inhibidores de HSPs más estudiados *in vivo*.

En los estudios *in vivo* también se apreció una buena efectividad antitumoral de estos inhibidores, ya que provocaron una disminución del volumen y del tamaño del tumor.

En GIST se ha confirmado el efecto sinérgico de la combinación de AUY922 con rapamicina, demostrando una mayor disminución del volumen tumoral y mayor necrosis tumoral, que ha sido comprobada por un ensayo inmunohistoquímico. La combinación de IPI-504 (un inhibidor de HSP90) con imatinib o sunitinib provocó un efecto aditivo induciendo la disminución de la carga tumoral, mayor actividad apoptótica y la detención de la proliferación tumoral. Sin embargo, en el examen histológico, se observó con frecuencia daño hepático en ratones tratados con la combinación de fármacos o con altas dosis de IPI-504 (150 mg/kg). Otro ejemplo de una combinación con efecto sinérgico en modelos murinos con tumores GIST xenográficos es el caso de la combinación de AT13387 (un inhibidor de HSP90) con imatinib. En este estudio se demostró que el efecto de la combinación fue sinérgico inhibiendo, el crecimiento del tumor y superó el efecto máximo de cualquiera de estos fármacos antitumorales por separado. Además, esta combinación fue bien tolerada sin apreciarse a nivel histológico ninguna hepatotoxicidad.

Una de las consecuencias más observadas al inhibir a la HSP90 con el compuesto AT13387 es la inducción de HSP70, sugiriendo que la disminución de la HSP90 es compensada por el aumento de HSP70.

En el sarcoma de Ewing, la combinación de 17-AAG con AEW541 presentó un efecto sinérgico reduciendo el tamaño tumoral además de la disminución de su crecimiento. La combinación de PU-H71 con Bortezomib también mostró un efecto sinérgico disminuyendo la carga metastásica y el tamaño tumoral, incluso incrementó la acumulación de proteínas ubiquitinadas por una disminución de la actividad del proteosoma.

En su conjunto, estos estudios *in vivo* corroboran lo publicado en los estudios *in vitro* demostrando que la inhibición de la HSP90 aumenta los efectos antitumorales de los fármacos antitumorales convencionales, lo que sugiere la participación de esta chaperona en los mecanismos de resistencia que desarrollan estas células de sarcomas.

La siguiente tabla 3 representa los artículos con estudios clínicos llevados a cabo con pacientes con sarcomas recurrentes o metastásicos tras el tratamiento con la quimioterapia convencional que fueron tratados a continuación con inhibidores de HSPs.

Autor/ Año	Subtipo de sarcoma	Fase de estudio	Tipo de pacientes	Inhibidores de HSP90	Efectos adversos	Dosis máxima tolerable	Respuesta antitumoral	Referencias
Bagatell et al. 2007	Osteosarcoma	Fase I	6 pacientes con osteosarcoma recurrente	17-AAG (150- 360 mg/m ²)	Toxicidad pulmonar, toxicidad hematológica y hipoxemia	270 mg/m ²	No respuestas objetivas	[35]
Dickson et al. 2013	GIST	Fase II	23 pacientes con GIST resistentes a Imatinib y Sunitinib	BIIB021 (400 o 600mg)	Altos niveles de las transaminasas y mareo	400 mg/m ² TIW* o 600 mg/m ² BIW**	Respuesta en <20% de los pacientes	[36]
Hanson et al. 2009	GIST	Fase I/II	37 pacientes con GIST metastásico y resistente a Imatinib y Sunitinib	IPI-504 (90 a 500mg/m ²)	Fatiga, mareo, nausea, vómito y diarrea	400 mg/m ² BIW	Enfermedad estable en 70% y 38% respuesta metabólica parcial	[37]
Hanson et al. 2009	GIST	Fase III	200 pacientes con GIST metastásico y resistente a Imatinib y Sunitinib	IPI-504 (400 mg/m ² BIW)	-	-	Terminación del ensayo por una alta tasa de mortalidad de pacientes	[37]

* 3 veces a la semana (TIW; siglas del inglés three times a week)

** 2 veces a la semana (BIW; siglas del inglés twice a week)

En el caso de los estudios clínicos agrupados en la tabla 3, se observa que todos los inhibidores de HSPs que se han utilizado son exclusivamente inhibidores de HSP90, probablemente porque son los que más se han estudiado a nivel preclínico y con los que se han obtenido mejores resultados.

En osteosarcoma, el ensayo clínico de fase I que se llevó a cabo, indicó que la dosis tolerable de 17-AAG que se puede administrar es la de 270 mg/m². Sin embargo, debe administrarse con precaución en el caso de aquellos pacientes que presentan una enfermedad pulmonar o metástasis en los pulmones, ya que se murieron dos pacientes durante el ensayo por complicaciones respiratorias.

En GIST, el estudio del efecto de BIIB021 se llevó directamente a ensayos clínicos, teniendo en cuenta su efecto antitumoral demostrado en estudios preclínicos en otro subtipo de sarcoma (sarcoma uterino) o incluso en otros tipos de tumores como la adenocarcinoma cortical, cáncer cerebral y cáncer de próstata [37]. La dosis de BIIB021 en este estudio clínico de fase II fue tolerable. Sin embargo, su actividad antitumoral fue limitada (<20% de respuesta antitumoral al compuesto). En el caso del inhibidor IPI-504 este compuesto presentó una buena eficacia en fase I/II, pero en la fase III, se terminó el ensayo antes de tiempo debido a una mayor mortalidad en el grupo de

tratamiento por fallos renales, hepáticos, acidosis metabólica y un paro cardiorrespiratorio.

Estos estudios clínicos que se han agrupado en la tabla 3 fueron también encontrados en la base de datos “*ClinicalTrials*” (<https://clinicaltrials.gov>), entre otros:

- [NCT00093821](#): estudio clínico en fase I completado llevado a cabo en pacientes con osteosarcoma tratados con 17-AAG.
- [NCT01404650](#): estudio clínico en fase II completado llevado a cabo en 36 pacientes con GIST refractario y resistente a imatinib tratados con AUY922. La tasa de respuesta parcial fue 3% y de la enfermedad estable fue 67%.
- [NCT00688766](#): estudio clínico en fase III llevado a cabo en pacientes con GIST resistente a imatinib y sunitinib tratados con IPI-504. Se ha terminado por alta mortalidad causada por toxicidad.
- [NCT01294202](#): estudio clínico en fase II completado llevado a cabo en pacientes con GIST metastásico tratados con AT13387 sólo o con combinación con imatinib. Se ha observado una estabilización de la enfermedad y reducción de dimensiones del tumor.

Sobre las limitaciones de los estudios clínicos presentados en este trabajo cabe comentar que en uno de los estudios clínicos realizados en un conjunto de pacientes pediátricos con tumores sólidos recurrentes o refractorios, se ha percibido el pequeño número de pacientes de sarcoma de Ewing (n=2), por lo que es difícil aceptarlo como una evidencia añadida a los efectos de los inhibidores de HSPs en pacientes con sarcoma. Además, en este estudio se comenta la muerte de 2 pacientes sin especificar qué tipo de tumor sólido presentaban, por lo que no puede saberse si tenían un sarcoma u otro tipo de tumor.

6. Conclusiones

Con la información recogida en este trabajo se puede concluir que:

Las HSPs, especialmente la HSP90 y en menor proporción la HSP70, están implicadas en el mecanismo de resistencia a fármacos antitumorales convencionales en los subtipos de sarcomas GIST, osteosarcoma y sarcoma de Ewing.

Los inhibidores de HSPs, en especial los de la HSP90, han demostrado una actividad antitumoral en células de sarcoma resistentes a la quimioterapia convencional tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, y su combinación con antitumorales ha dado lugar a un efecto sinérgico potenciando los efectos de los antitumorales.

El número de estudios clínicos llevados a cabo con inhibidores de HSP90 han sido bajos. Destacan los estudios en pacientes con GIST resistentes a la quimioterapia con imatinib o sunitinib dando resultados positivos, aunque con una cierta toxicidad.

En su conjunto, los resultados recogidos en este trabajo demuestran la necesidad de seguir investigando para desarrollar más estudios clínicos y confirmar los efectos

antitumorales de estos inhibidores HSPs en sarcomas resistentes a la quimioterapia convencional ya sea en forma de monoterapia o combinada.

7. Referencias bibliográficas

- [1] J. Varshney and S. Subramanian, “MicroRNAs as potential target in human bone and soft tissue sarcoma therapeutics,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 2, no. June, pp. 1–11, 2015.
- [2] L. J. Helman and P. Meltzer, “Mechanisms of sarcoma development,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 9, pp. 685–694, 2003.
- [3] B. S. Taylor, J. Barretina, R. G. Maki, C. R. Antonescu, S. Singer, and M. Ladanyi, “Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 8, pp. 541–557, 2011.
- [4] C. Honoré, P. Méeus, E. Stoeckle, and S. Bonvalot, “Soft tissue sarcoma in France in 2015 : Epidemiology , classification and organization of clinical care,” *J. Visc. Surg.*, vol. 152, no. 4, pp. 223–230, 2015.
- [5] L. A. Doyle, “Sarcoma Classification : An Update Based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone,” pp. 1763–1774, 2014.
- [6] M. D. Fernanda I. Arnaldez, M.D. Lee J. Helman, “New Strategies in Ewings Sarcoma ” *Clin. Cancer Res.*, vol. 20, no. 12, pp. 3050–3056, 2015.
- [7] I. Matushansky and R. G. Maki, “Mechanisms of sarcomagenesis,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 19, no. 3, pp. 427–449, 2005.
- [8] A. L. Ho, G. K. Schwartz, and N. York, “Targeting of Insulin-Like Growth Factor Type 1 Receptor in Ewing Sarcoma : Unfulfilled Promise or a Promising Beginning ?,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 34, pp. 4581–4583, 2015.
- [9] H. X. Chen and E. Sharon, “IGF-1R as an anti-cancer target-trials and tribulations,” *Chin. J. Cancer*, vol. 32, no. 5, pp. 242–252, 2013.
- [10] J. Liang, Y. Wu, B. Chen, W. Zhang, Y. Tanaka, and H. Sugiyama, “The C-Kit Receptor-Mediated Signal Transduction and Tumor-Related Diseases,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 9, pp. 435–443, 2013.
- [11] P. Keith M. Skubitz. MD, David R. Adamo, “Sarcoma,” vol. 82, no. November, pp. 1409–1432, 2007.
- [12] V. Mehren and D. Press, “New drugs and combinations for the treatment of soft-tissue sarcoma : a review,” pp. 397–411, 2012.
- [13] G. D. Demetri and E. B. A. M. D., “A safety evaluation of imatinib mesylate in the treatment of gastrointestinal stromal tumor (GIST) Drug Safety Evaluation A safety evaluation of imatinib mesylate in the treatment of gastrointestinal stromal tumor (GIST),” vol. 0338, no. February, 2016.
- [14] A. Dufresne, P. Cassier, P. Heudel, D. Pissaloux, Q. Wang, J. Blay, and I. Raycoquard, “Biologie moléculaire des sarcomes et choix thérapeutiques,” *Bull. Cancer*, vol. 102, no. 1, pp. 6–16, 2015.
- [15] H. Chen, J. Shen, E. Choy, F. J. Hornicek, and Z. Duan, “Targeting protein kinases to reverse multidrug resistance in sarcoma,” vol. 43, pp. 8–18, 2016.
- [16] Z. Nahleh, A. Tfayli, and A. El Sayed, “Heat shock proteins in cancer : targeting the ‘ chaperones ,” pp. 927–935.
- [17] S. K. Calderwood and J. Gong, “Heat Shock Proteins Promote Cancer : It ’ s a

- Protection Racket,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. xx, pp. 1–13, 2016.
- [18] U. N. M. Rao, B. L. Hood, J. M. J. Bs, M. Sun, and T. P. Conrads, “Distinct profiles of oxidative stress – related and matrix proteins in adult bone and soft tissue osteosarcoma and desmoid tumors : A proteomics study,” *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 5, pp. 725–733, 2013.
- [19] H. S. P. Á. Ros, “HSP70 desensitizes osteosarcoma cells to baicalein and protects cells from undergoing apoptosis,” no. 185, 2014.
- [20] C. Zanini, G. Giribaldi, G. Mandili, F. Carta, N. Crescenzo, B. Bisaro, A. Doria, L. Foglia, F. Timeus, and F. Turrini, “Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing ’ s sarcoma cell lines,” pp. 1344–1354, 2007.
- [21] D. C. Chinn, W. S. Holland, J. M. Yoon, T. Zwerdling, and P. C. Mack, “Anti-Tumor Activity of the HSP90 Inhibitor SNX-2112 in Pediatric Cancer Cell Lines,” no. July 2011, pp. 885–890, 2012.
- [22] W. Fu, S. S. Sharma, L. Ma, B. Chu, M. M. Bui, D. Reed, and W. J. Pledger, “Apoptosis of osteosarcoma cultures by the combination of the cyclin-dependent kinase inhibitor SCH727965 and a heat shock protein 90 inhibitor,” 2013.
- [23] M. Gorska, A. M. Gammazza, M. A. Zmijewski, C. Campanella, F. Cappello, T. Wasiewicz, A. Kuban-jankowska, A. Daca, A. Sielicka, U. Popowska, N. Knap, J. Antoniewicz, T. Wakabayashi, and M. Wozniak, “Geldanamycin-Induced Osteosarcoma Cell Death Is Associated with Hyperacetylation and Loss of Mitochondrial Pool of Heat Shock Protein 60 (Hsp60),” vol. 8, no. 8, pp. 2–9, 2013.
- [24] M. Mori, T. Hitora, O. Nakamura, and Y. Yamagami, “Hsp90 inhibitor induces autophagy and apoptosis in osteosarcoma cells,” no. 14, pp. 47–54, 2015.
- [25] S. Banerjee, V. Thayanithy, V. Sangwan, T. N. Mackenzie, A. K. Saluja, and S. Subramanian, “Minnelide reduces tumor burden in preclinical models of osteosarcoma,” *Cancer Lett.*, vol. 335, no. 2, pp. 412–420, 2013.
- [26] S. Bauer, L. K. Yu, G. D. Demetri, and J. A. Fletcher, “Heat Shock Protein 90 Inhibition in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor,” no. 18, pp. 9153–9162, 2006.
- [27] B. Dewaele, B. Wasag, J. Cools, R. Sciot, H. Prenen, A. Wozniak, P. Scho, P. Marynen, and M. Debiec-rychter, “Cancer Therapy : Preclinical Activity of Dasatinib , a Dual SRC / ABL Kinase Inhibitor , and IPI-504 , a Heat Shock Protein 90 Inhibitor , against Gastrointestinal Stromal Tumor ^ Associated PDGFRA D842V Mutation,” vol. 14, no. 13, pp. 5749–5759, 2008.
- [28] Y. Hsueh, C. Yen, N. Shih, N. Chiang, C. Li, L. Chen, Y. Hsueh, C. Yen, N. Shih, N. Chiang, C. Li, and L. Chen, “Autophagy is involved in endogenous and NVP-AUY922-induced KIT degradation in gastrointestinal stromal tumors Autophagy is involved in endogenous and NVP-AUY922-induced KIT degradation in gastrointestinal stromal tumors,” vol. 8627, no. April 2016, 2013.
- [29] Y. Hsueh, H. H. Chang, N. Chiang, and C. Yen, “MTOR inhibition enhances NVP-AUY922-induced autophagy- mediated KIT degradation and cytotoxicity in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors,” vol. 5, no. 22.
- [30] T. Smyth, T. Van Looy, J. E. Curry, A. M. Rodriguez-lopez, A. Wozniak, M. Zhu, R. Donsky, J. G. Morgan, M. Mayeda, J. A. Fletcher, P. Sch, J. Lyons, N. T. Thompson, and N. G. Wallis, “The HSP90 Inhibitor , AT13387 , Is Effective against Imatinib-Sensitive and -Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor Models,” no. 11, pp. 1799–1809, 2012.
- [31] A. S. Martins, L. Ordon, A. Garcı, D. Herrero, V. Sevillano, D. Osuna, C.

- Mackintosh, G. Caballero, A. P. Otero, C. Poremba, J. Madoz-gu, and E. De Alava, "A Pivotal Role for Heat Shock Protein 90 in Ewing Sarcoma Resistance to Anti-Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Treatment: In vitro and In vivo Study," no. 15, pp. 6260–6271, 2008.
- [32] E. Roundhill, D. Turnbull, and S. Burchill, "Localization of MRP-1 to the outer mitochondrial membrane by the chaperone protein HSP90 b," pp. 1–12, 2015.
- [33] S. R. Ambati, E. Caldas, K. Kosugi, U. Mony, A. Zehir, S. K. Shah, T. Taldone, A. L. Moreira, P. A. Meyers, G. Chiosis, and M. A. S. Moore, "ScienceDirect Pre-clinical efficacy of PU-H71 , a novel HSP90 inhibitor , alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma," *Mol. Oncol.*, vol. 8, no. 2, pp. 323–336, 2013.
- [34] G. Floris, M. Debiec-rychter, A. Wozniak, C. Stefan, and E. Normant, "The Heat Shock Protein 90 Inhibitor IPI-504 Induces KIT Degradation , Tumor Shrinkage , and Cell Proliferation Arrest in Xenograft Models of Gastrointestinal Stromal Tumors," pp. 1897–1909, 2011.
- [35] R. Bagatell, L. Gore, M. J. Egorin, R. Ho, G. Heller, N. Boucher, E. G. Zuhowski, J. A. Whitlock, S. P. Hunger, A. Narendran, H. M. Katzenstein, R. Arceci, J. Boklan, C. E. Herzog, S. P. Ivy, and M. Trippett, "Cancer Therapy : Clinical Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of 17- N - Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Pediatric Patients with Recurrent or Refractory SolidT umors : A Pediatric Oncology ExperimentalTherapeutics Investigators Consor," vol. 13, no. 6, pp. 1783–1789, 2007.
- [36] M. A. Dickson, S. H. Okuno, M. L. Keohan, R. G. Maki, D. R. D. Adamo, T. J. Akhurst, C. R. Antonescu, and G. K. Schwartz, "Phase II study of the HSP90-inhibitor BIIB021 in gastrointestinal stromal tumors," no. August 2012, pp. 252–257, 2013.
- [37] H. Zhang, L. Neely, K. Lundgren, Y. C. Yang, R. Lough, N. Timple, and F. Burrows, "BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance," *Int. J. Cancer*, vol. 126, no. 5, pp. 1226–1234, 2010.