

ESCOLA DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

KARINA RODRIGUES LIMA

**AVALIAÇÃO *in vivo* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA CO-CHAPERONA HspBP1**

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

KARINA RODRIGUES LIMA

Avaliação *in vivo* do potencial antitumoral da co-chaperona HspBP1

PORTO ALEGRE

2019

KARINA RODRIGUES LIMA

Avaliação *in vivo* do potencial antitumoral da co-chaperona HspBP1

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Co Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Bonorino

PORTO ALEGRE

2019

## Ficha Catalográfica

L732a Lima, Karina Rodrigues

Avaliação in vivo do potencial antitumoral da co-chaperona HspBP1 / Karina Rodrigues Lima . – 2019.

73.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino.

1. HSP70. 2. HspBP1. 3. câncer. 4. proteína recombinante. 5. citometria de fluxo. I. Bauer, Moisés Evandro. II. Bonorino, Cristina Beatriz Cazabuena. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus pais, Nilza e Luis Eduardo, às minhas irmãs Gabriela e Luiza, e a minha vó Eneida, pelo amor, apoio, motivação e principalmente paciência. Não conseguiria sem a ajuda de vocês.

A minha orientadora, Cristina Bonorino, pela oportunidade de entrar no seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, apoio e dedicação nesses dois anos. Muito obrigada Cris.

Ao Professor Moisés Bauer, pela ajuda e disponibilidade na etapa final do mestrado. E A professora Ana Paula Duarte de Souza pela ajuda durante a realização deste trabalho.

A todas as pessoas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelo apoio, risadas, carinho e incentivos. Com certeza este trabalho foi muito mais fácil com vocês por perto. Gostaria de destacar a Julia, pelo companheirismo; Sofia, pela ajuda no artigo; Rodrigo Gassen, pelos ensinamentos em citometria de fluxo; Rodrigo Dornelles, pela ajuda com os animais; e ao meu co-orientador não oficial, Tiago Fazolo, pela ajuda, apoio e preocupação nesses últimos dois anos.

Aos meus amigos, obrigada pelo companheirismo, pelas risadas, brincadeiras e pelo amor. O apoio e presença de vocês são muito importante para mim.

E a todos os outros que, de alguma forma contribuíram para que esses últimos dois anos se tornassem mais fáceis com seus respectivos apoios, meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a PUCRS, o programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e também pelo apoio financeiro obtido pela CAPES.

## RESUMO

A proteína de ligação a HSP70 (HspBP1) é uma co-chaperona da HSP70. É classificada um fator de troca de nucleotídeo conseguindo inibir ou estimular a atividade de ATPase da HSP70 assim, regulando a sua atividade. A HSP70 apresenta uma alta expressão em diversos tipos de tumores, encontrando-se presente na membrana dessas células. Dessa forma, HSP70 é um biomarcador tumoral e uma forma de modular a sua atividade é utilizando sua co-chaperonas. O presente trabalho tem como objeto avaliar a capacidade antitumoral da co-chaperona HspBP1 em dois modelos tumorais e analisar mudanças no perfil das células do sistema imunológico. Aqui está descrito os métodos de clonagem, expressão, purificação e obtenção da HspBP1 inteira e do peptídeo 1-136. Análises por espectrometria de massas e determinação do estado oligomérico da proteína também são apresentados. Para avaliar presença de endotoxinas nas proteínas foi realizado um bioensaio. Análise do efeito antitumoral da HspBP1 e do peptídeo 1-136, em modelos de melanoma e câncer de mama, mostram uma redução do volume tumoral. O fenótipo das células imunológicas do infiltrado tumoral e do linfonodo drenante, por citometria de fluxo, indicaram uma modulação em resposta ao tratamento. Em suma, nossa pesquisa revela a capacidade da HspBP1 em induzir uma redução no volume tumoral e em modular o sistema imunológico adaptativo. O conhecimento da capacidade da HspBP1 em modular o sistema imunológico será útil para avaliar esse como um novo possível fármaco antineoplásico.

**Palavras chave:** HSP70, HspBP1, câncer, proteína recombinante, citometria de fluxo

## ABSTRACT

HSP70 binding protein-1 (HspBP1) is a cochaperone of HSP70. Its classified as a nucleotide exchange factor capable to inhibit or stimulate the ATPase activity of HSP70 thus, regulating its activity. HSP70 have a high expression in several types of tumors, finding present in the plasma membrane of this cells. Thus, HSP70 is considered a tumor biomarker and one way to modulate it activity is by using it cochaperones. The present work aims to evaluate the antitumor capacity of the HspBP1 in two tumor models and to evaluate changes in the profile of the immune system. Here we describe the methods of cloning, expression, purification and obtaining of the HspBP1 and its peptide 1-136. Analyzes by mass spectrometry and determination of the oligomeric state of the protein are also presented. A bioassay was performed to evaluate the presence of endotoxins in proteins. Analysis of the antitumor effect of HspBP1 and peptide 1-136 on melanoma and breast cancer models shows a reduction in tumor volume. The immunological cell phenotypes of the tumor infiltrate and the draining lymph node, by flow cytometry, showed a modulation in response to treatment. In short, our research reveals the ability of HspBP1 to induce a reduction in tumor volume and to modulate the adaptive immune system. Knowledge of HspBP1 ability to modulate the immune system will be useful in assessing this as a possible new antineoplastic drug.

**Key words:** HSP70, HspBP1, cancer, recombinant protein, flow cytometry

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-136 – Peptídeo 1-136 da HspBP1

ATP – Adenosina trifosfato

CD – Cluster de diferenciação

DC – Células Dendríticas

FoxP3 – Forkhead box P3

HSP – Proteínas de choque térmico

HSP70 – Proteínas de choque térmico de 70 kDa

HspBP1 – Proteína de ligação à HSP70 1

IL-10 – Interleucina 10

LPS - Lipopolisacarídeo

NBD – Domínio de ligação ao nucleotídeo

NEF – Fator de troca de nucleotídeo

NK – Células *Natural Killers*

NSG – Camundongos *Nod Scid Gamma*

PBS – Solução tamponada de fosfato

PMA – Acetato de miristato de forbol

SBD – Domínio de ligação ao substrato

T<sub>reg</sub> – Células T regulatórias

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura e Organização dos domínios da HSP70.....  | 2  |
| Figura 2 - Organização atômica do estado aberto e fechado da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) .....  | 3  |
| Figura 3 - Representação esquemática das diferentes localizações e funções da HSP70.....   | 5  |
| Figura 4 - Organização e estrutura cristalográfica da HspBP1.....  | 6  |
| Figura 5 - Balança entre imunidade tumoral e progressão tumoral.....   | 8  |
| Figura 6 – Expressão, purificação e análise do estado oligomérico da proteína HspBP1.....  | 18 |
| Figura 7 – Purificação do peptídeo 1-136 da HspBP1.....  | 18 |
| Figura 8 – Bioensaio para avaliar endotoxinas.....   | 19 |
| Figura 9 - Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intraperitoneal.....                                      | 21 |
| Figura 10 - Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intravenosa.....   | 21 |
| Figura 11 - Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após uma dose de HspBP1 1,46 $\mu$ M.....                                       | 23 |
| Figura 12 - Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 1,46 $\mu$ M.....                                     | 25 |
| Figura 13 - Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 1,46 $\mu$ M e do peptídeo 0,72 $\mu$ M.....          | 28 |
| Figura 14 - Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 em animais Nod Scid Gamma (NSG).....   | 30 |
| Figura 15 - Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 em animais BALB/c Fox1n <sup>-/-</sup> .....   | 31 |
| Figura 16 - Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intravenosa, em modelo de câncer mama.....               | 32 |
| Figura 17 - Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 e do peptídeo 1-136, no modelo de câncer de mama..... | 34 |
| Figura 18 - Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo em modelo de câncer de mama. 1-136 em animais Nod Scid Gamma (NSG).....                      | 36 |
| Figura 19 - Análise da expressão de HSP70 nos extratos proteicos dos tumores tratados com a proteína HspBP1 e com PBS.....                                 | 37 |

## SUMÁRIO

### Capítulo 1

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Família de Proteínas de choque térmico (HSPs) e Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ..... | 1         |
| 1.2 HSP70 e Câncer.....  | 3         |
| 1.3 HspBP1.....  | 5         |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>11</b> |
| 3.1 Objetivo Geral.....  | 11        |
| 3.2 Objetivos Específicos.....   | 11        |

### Capítulo 2

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>4. METODOLOGIA.....</b> | <b>12</b> |
|----------------------------|-----------|

### Capítulo 3

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>5. RESULTADOS.....</b> | <b>17</b> |
|---------------------------|-----------|

### Capítulo 4

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Artigo “Qualitative evaluation of HSP70 expression and localization in different tumor lines <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>” .....</b> | <b>38</b> |
|--|-----------|

### Capítulo 5

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b> | <b>66</b> |
| REFERÊNCIAS.....                    | 69        |

### ANEXO A

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Carta de aprovação da CEUA..... | 73 |
|---------------------------------|----|

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação faz parte do requisito para obtenção do título de mestre do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. O corpo do trabalho pertence a um projeto guarda-chuva intitulado “HspBP1 – Desenvolvimento do fragmento 1-136 da HspBP1 como nova droga antitumoral” financiado pela Financiadora de Estudos e Projeto (FINEP), renovado até 2020, possuindo propriedade intelectual sob a patente WO 2001/81545. Neste trabalho focamos em avaliar a resposta imunológica resultante do tratamento da HspBP1, proteína inteira e seu peptídeo 1-136, em dois modelos tumorais: o de melanoma murino, transplantando com a linhagem celular B16F10, e de câncer de mama murino, transplantando com a linhagem celular 4T1. No entanto, ainda é preciso obter outros resultados para conseguirmos finalizar e publicar este trabalho. Dessa forma, para cumprir o requisito de submissão de artigo científico para publicação do programa de pós-graduação foi produzido o artigo “HSP70 expression and subcellular localization differs among tumor cell lines *in vitro*, *in vivo* and upon heat.” Este artigo foi submetido para a revista *Cell Biology International*.

# **Capítulo 1**

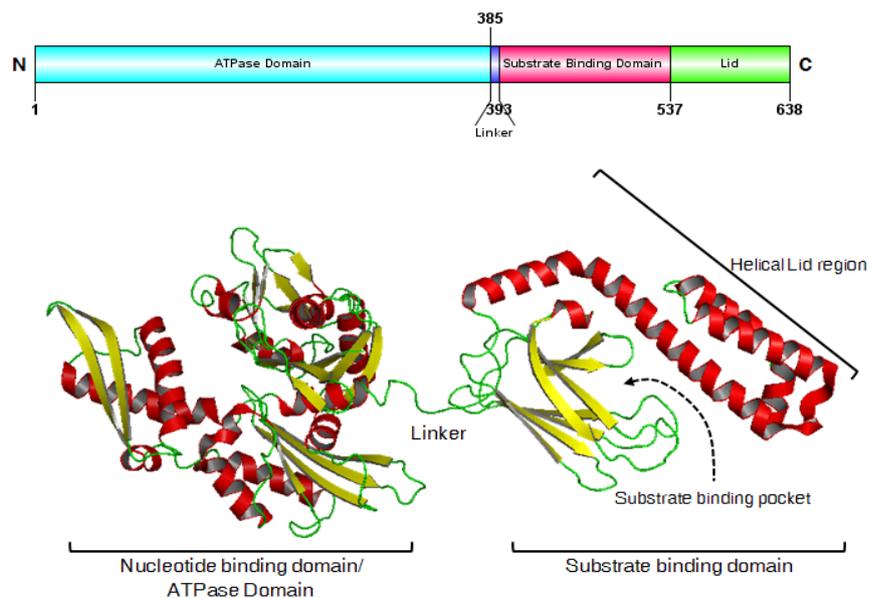
**Introdução**  
**Justificativa**  
**Objetivos**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família de Proteínas de Choque Térmico (HSP) e Proteínas de Choque térmico de 70 kDa (HSP70)

Todos os organismos encontram uma variedade de condições adversas, incluindo inesperados aumentos de temperatura, que danificam importantes estruturas celulares e interferem em funções essenciais. Em respostas a esses estresses, as células ativam uma via de sinalização levando à expressão de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSPs). As HSPs são chaperonas moleculares, cuja função é reverter ou inibir a desnaturação de proteínas celulares, facilitando o redobramento necessário para retorno da sua estrutura original. Elas desempenham, portanto, um papel protetor e fisiológico nas células, ao induzir a homeostase (1). A família HSP é dividida em seis subfamílias, de acordo com o seu peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, e pequenas proteínas choque térmico (*small heat shock proteins*) (2). Todas, com exceção das *small* HSPs, são proteínas dependentes de ATP com atividade ATPase (3).

A família HSP70, das proteínas de choque térmico de 70 kDa, é a classe de chaperonas mais bem estudada e conservada de procaríotos e eucaríotos (4). A HSP70 é uma máquina molecular, que depende das mudanças conformacionais abastecida pela hidrólise de ATP para auxiliar no redobramento proteico, desagregação e degradação (5). A estrutura básica de todos os 13 membros da família das HSP70 consistem em três domínios: (i) um domínio N terminal de ligação ao nucleotídeo com atividade ATPásica (NBD - Nucleotide Binding Domain) de cerca de 40kDa, (ii) um domínio C-terminal de ligação a substrato (SBD- Substrate Binding Domain) de cerca de 25 kDa e (iii) uma pequena porção denominado *linker*, responsável por conectar os outros dois domínios (6) (FIGURA 1).

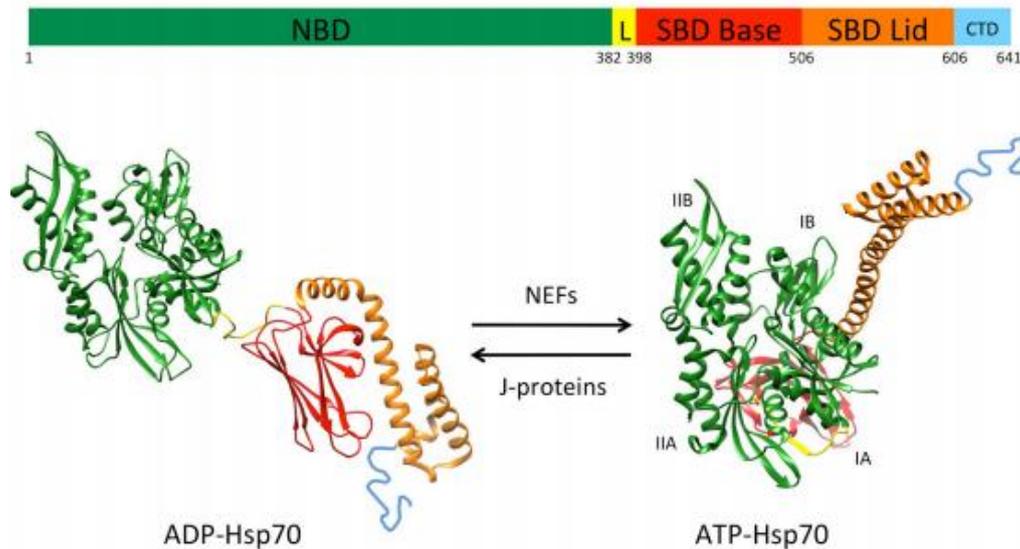


**Figura 1.** Estrutura e Organização dos domínios da HSP70. Fonte: LIU *et al.*, 2013 (7)

O SBD reconhece um motivo, composto por 5 resíduos de aminoácidos, presente na maioria das proteínas em um intervalo de 30 a 40 resíduos. Esse domínio é enriquecido em aminoácidos hidrofóbicos e é flanqueado por regiões com resíduos predominantemente carregados positivamente. Essas seqüências de resíduos estão localizadas no core da proteína e sua acessibilidade sinaliza uma conformação incorreta (8). O SBD pode adotar duas conformações: aberta e fechada (FIGURA 2). Ligação de ATP ao NBD induz a conformação aberta do SBD pela separação de seus subdomínios folha beta (SBD $\beta$ ) e alfa-hélice (SBD $\alpha$ ), uma conformação que apresenta uma baixa afinidade para a ligação de proteína clientes. A hidrólise de ATP induz a conformação fechada, ocorre o rearranjo estrutural originado no NBD sendo transmitido via *linker* para induzir a aproximação dos subdomínios SBD $\beta$  e SBD $\alpha$  e assim segurando a proteína cliente com alta afinidade. O *linker* flexível contata o NBD no estado aberto e separa dele na conformação fechada (5) (FIGURA 2).

A atividade ATPase basal das proteínas HSP70 é baixa podendo ser estimulada ou inibida por suas co-chaperonas. A proteína J (HSP40) leva proteínas clientes à HSP70 e ao mesmo tempo estimula a atividade de ATPase segurando de forma eficiente a proteína cliente (9). A liberação da proteína cliente necessita da dissociação de ADP, na qual é dirigida pela ação de outro

grupo de co-chaperonas, os fatores de troca de nucleotídeo (NEFs – *Nucleotide Exchange Factors*) (10) (FIGURA 2). Assim, proteínas J induzem hidrólise de ATP e potencializam a conformação fechada, enquanto as NEFs facilitam a troca ADP/ATP e conseqüentemente a conformação aberta.



**Figura 2:** Modelo estrutural do estado aberto (PDB 2KHO) e fechado (PDB 4JNE) da proteína de choque térmico de 70kDa (HSP70). Subdomínios do NDB estão referidos como IA, IIA, IB e IIB. Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018 (5)

## 1.2 HSP70 e Câncer

O envolvimento da HSP70 em diversas doenças em humanos, como em doenças neurodegenerativas, cardíacas e no desenvolvimento e progressão do câncer já vem sendo estudado. (11-17).

Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, que são caracterizadas por células anormais que conseguem crescer descontroladamente, ignorando as regras normais da divisão celular. Isso acontece porque as células tumorais conseguem desenvolver autonomia em relação aos sinais que controlam a divisão e diferenciação celular, a tal ponto que pode ser fatal devido a magnitude das disfunções biológicas (18).

Atualmente, os tratamentos para o câncer envolvem cirurgias, removendo a massa tumoral, radioterapia para destruir o tumor ou impedir que suas células aumentem, transplante de medula óssea, quimioterapia, e mais

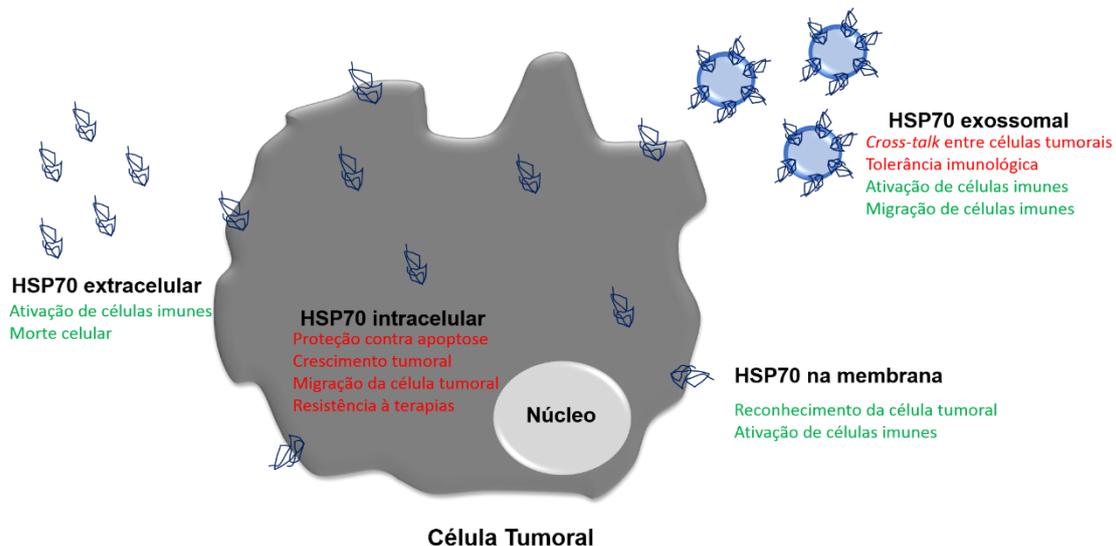
recentemente a utilização de imunoterapia, provendo a estimulação do sistema imunológico (18 e 19).

As HSPs desempenham um papel importante durante o processo de malignização (1, 16, 20, 21). A HSP70 possui uma função na progressão da doença pelo aumento da proliferação e diminuição da apoptose das células cancerígenas (22). Níveis elevados de HSP70 tumoral foram atribuídos a altas concentrações de oncoproteínas mutadas ou mal enoveladas que dirigem oncogênese, ou pela alteração de vias sinalizadoras induzindo a expressão das HSP durante a malignidade (23). Mais recentemente, foi descrita a formação de um complexo da HSP70 com a proteína inibitória de apoptose BAG3, que regula a sinalização de diferentes vias oncogênicas, especialmente Src (24).

Cinco membros da família HSP70 possuem uma forte associação com o câncer: as HSP70s que são induzidas por algum tipo de estresse, incluindo HSP70 (também conhecido como HSPA1 ou HSP72) e HSPA6 (HSP70B); e as HSP70s que são constitutivamente expressas, incluindo HSC70 (HSPA8, localizado no citosol), mortalina (HSPA9, GRP75, ou mtHSP70, localizado na mitocôndria), e GRP78 (HSPA5, BIP, localizado no retículo endoplasmático) (25, 26). WU e colaboradores observaram que todos os 13 membros da família HSP70 possuem um papel na promoção da tumorigênese, proliferação e sobrevivência das células tumorais, autofagia, e na prevenção do processo apoptótico dessas células (22).

Durante o desenvolvimento do câncer, as HSP70s são expressas em níveis elevados em células tumorais. Estas proteínas promovem a carcinogênese ao atuar em fatores de sobrevivência devida a sua expressão associada ao tumor e pelos efeitos anti-apoptóticos (27). Já foi proposto o papel das HSP70s no desenvolvimento do câncer, e a sua superexpressão foi correlacionada com o aumento do grau do tumor e a um prognóstico ruim (28, 29). Em relação a sua localização, embora a HSP70 seja uma proteína intracelular, pode ser encontrada na membrana plasmática de algumas células tumorais associadas à *lipid rafts* (30). Ademais, HSP70 e outras chaperonas podem ser secretadas para o meio extracelular, e a presença de HSP70 é amplamente visualizada em vesículas extracelulares, com papel ativo na comunicação intercelular (FIGURA 3) (31-34). Dessa forma, proteínas da

família HSP70 são consideradas importantes biomarcadores de células tumorais sendo assim possíveis alvos terapêuticos.



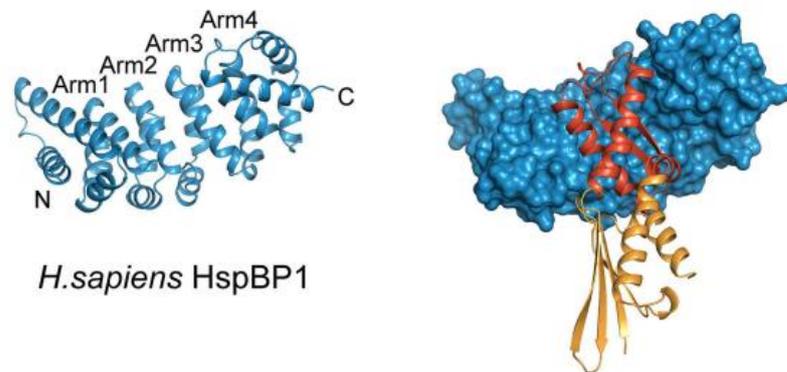
**Figura 3:** Representação esquemática das diferentes localizações e funções da HSP70 no citosol, no plasma, na membrana, livre no espaço extracelular e exossomal. Verde indica atividades antitumorais e vermelho indica atividades pró-tumorais. Adaptado de: SHEVTSOV *et al.*, 2017 (35).

### 1.3 HspBP1

A proteína de ligação a HSP70, a HspBP1 é uma co-chaperona da HSP70, o qual consegue se ligar e regular a atividade da mesma. A primeira vez em que observaram a interação da HspBP1 com a HSP70 foi através da técnica de sistema de levedura de duplo híbrido, utilizando o domínio ATPase da HSP70 como isca, de uma biblioteca de cDNA de coração humano. Sua expressão não é restrita a um tipo tecidual, sendo observada uma alta expressão no cérebro, coração, músculo esquelético e pâncreas (36).

A HspBP1 é classificada como um fator de troca nucleotídica (NEF), conseguindo inibir ou estimular a ATPase da HSP70, dependendo das condições do ensaio. A ligação da HspBP1 à HSP70 no citoplasma de células tumorais, resulta na mudança de conformação do domínio ATPase, inibindo o redobramento de proteínas feito pela HSP70 (37). A proteína possui dois domínios estruturais, domínios I e II, sendo que o domínio II é suficiente para inibir a atividade de chaperona da HSP70 (38). A sua estrutura é composta por

quatro repetições de Armadillo tampado a cada extremidade com pares de  $\alpha$ -hélice (FIGURA 4).



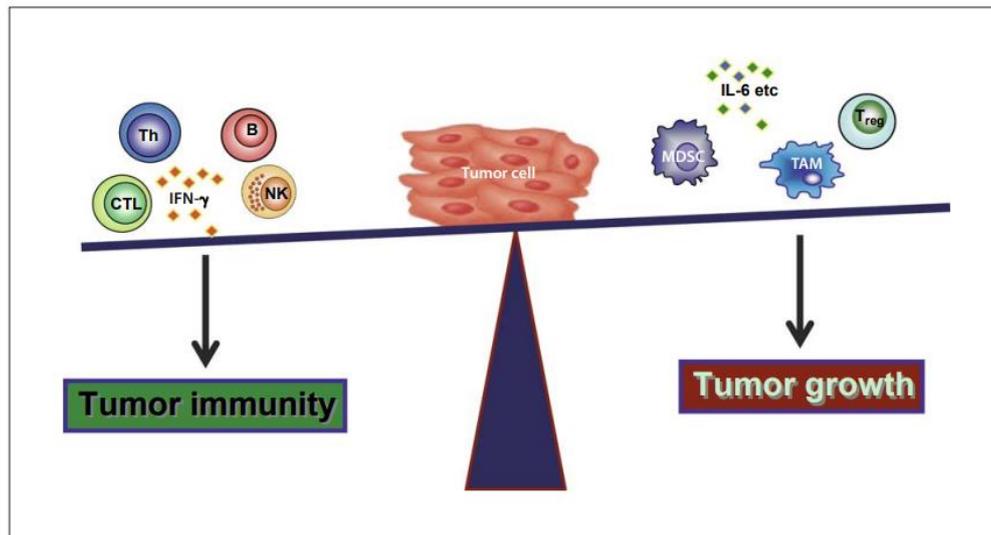
**Figura 4:** Organização e estrutura cristalográfica do domínio core da HspBP1 (esquerda) de *H. sapiens* e interação entre o domínio core da HspBP1 (azul) com o fragmento do NDB da Hsp70 (laranja) com o subdomínio IIB destacado (vermelho) (direita). Fonte: Shomura et al., 2005 (36) (PDB: 1XQR, 1XQS)

A HSP70 e proteínas da sua família são possíveis alvos terapêuticos para o tratamento do câncer. Por isso, utilizar suas co-chaperonas para inibir as funções oncogênicas da HSP70 seria uma abordagem interessante. Para isso, é necessário um melhor entendimento da biologia básica dos mecanismos pelos quais essas co-chaperonas atuam durante o desenvolvimento e progressão das células tumorais.

Em nosso laboratório, um estudo realizado por Souza e colaboradores observou aumento da expressão da HspBP1 no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama, semelhante ao observado com a HSP70. Também foi observado uma diminuição na quantidade da HspBP1 no plasma desses pacientes, correlacionando com um pior prognóstico (39). Em outro estudo, analisando modelo de carcinoma de pulmão e de neuroblastoma também se observou um aumento da expressão de HspBP1 (40). Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa no modelo de melanoma murino B16F10, revelaram que as células da linhagem B16F10-1 transfectadas para superexpressão de HspBP1 apresentaram um crescimento tumoral significativamente reduzido quando comparado ao grupo de animais que foram tratados com células transfectadas com o vetor sem inserto. Transfecção com

o gene para expressão de HspBP1 não apresentou efeito sobre células de melanoma *in vitro*.

Uma comunicação bidirecional entre células e o seu microambiente é crítico para manter a homeostase do tecido normal, podendo auxiliar também no crescimento tumoral. Interações entre células e o seu estroma influenciam fortemente a iniciação, progressão e prognóstico da doença (41, 42). O microambiente tumoral é composto por diferentes células que se comunicam constantemente. Por exemplo, fibroblastos associados secretam fatores que auxiliam no crescimento de células cancerígenas, fatores de crescimento e quimiocinas, intensificando a proliferação e invasão de células cancerígenas. A matriz extracelular, composta por células imunológicas e inflamatórias, sistema circulatório sanguíneo e linfático e presença de nervos, também impacta o crescimento tumoral (43). Entre as células imunológicas encontradas no microambiente tumoral existem células derivadas da medula óssea, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras derivadas do mieloide e células tronco mesenquimais (42). A simples quantidade ou presença de certas subpopulações de células imunes no microambiente tumoral nem sempre correlaciona com um bom ou mau prognóstico para pacientes com tumores. A mesma subpopulação celular pode estar influenciando positivamente ou negativamente o crescimento tumoral. Por exemplo, células T CD4+, macrófagos e células *Natural Killers* (NK) possuem tanto propriedade supressoras como potencializadoras de tumores, e o fator limitante para definir a propriedade em que essas células irão atuar depende do contexto tecidual ou dos estímulos celulares locais (44,45). A presença de determinadas células do sistema imunológico juntamente com certos fatores secretados frequentemente altera o balanço entre o crescimento ou imunidade tumoral (FIGURA 5). Existe uma grande procura tanto de testes diagnósticos como fármacos que possam respectivamente prever e influenciar o prognóstico do paciente, baseados em indicadores e mecanismos imunológicos.



**Figura 5:** Representação esquemática do equilíbrio entre imunidade e progressão tumoral induzido por diferentes células do sistema imunológico inato e adaptativo. Imunidade contra o tumor é induzida pelo aumento de células *Natural Killers* (NK), células B, células T CD4 *helper* (Th), células T citotóxicas CD8 (CTL) e aumento de liberação de Interferon- $\gamma$ ; O crescimento tumoral pode ser induzido por células T regulatórias (Treg), Macrófagos associados ao tumor (TAM), Células mieloides supressoras (MDSC) e liberação de interleucina 6. Fonte: Korangy *et al.*, 2010 (46)

O fato de a HspBP1 ser detectada no plasma de pacientes com câncer de mama sugere que essa proteína possua funções extracelulares. Nosso grupo de pesquisa buscou desenvolver um novo tratamento tumoral baseado na ligação da co-chaperona HspBP1 nas células tumorais, projeto aprovado pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Nossa hipótese de trabalho foi a de que HspBP1 extracelular liga-se à HSP70 presente na superfície externa da maioria das células tumorais, modulando-a negativamente. Ao aumentar artificialmente os níveis circulante de HspBP1, através de injeções intravenosas em camundongos com tumor, observamos uma redução no crescimento tumoral. Nosso grupo identificou o segmento ativo da HspBP1 com a atividade antitumoral, esse segmento é composto pela região de aminoácidos 1-136, descrito na patente WO 2001/81545, este segmento foi selecionado por estar na região da HspBP1 em que se liga à HSP70. Em estudos preliminares, observamos que células B16F10 transfectadas com HspBP1 e com o peptídeo 1-136 foram capazes de inibir o crescimento tumoral, demonstrando que não há necessidade da proteína inteira para

ocorrer o efeito. Ao tratar, pela via intratumoral, com HspBP1 e o peptídeo 1-136 produzidos de forma recombinante, ambos reduziram o volume do tumor, com o peptídeo mostrando uma maior eficiência na redução do tumor. Em adição foi observado que o peptídeo inibe o crescimento tumoral e ativa caspase 3 nos tumores, no entanto, esse foi um resultado preliminar tendo uma necessidade de repetição para confirmar essa ativação. Os mecanismos de ação envolvidos no processo antitumoral pelo tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 não se encontram elucidados sendo relevante avaliar a capacidade do tratamento em modular o sistema imunológico, já que o tratamento *in vivo* foi o que apresentou resultado antitumoral.

## 2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das maiores causas de morte do mundo, com uma estimativa de 12,7 milhões de casos pelo mundo afetando igualmente ambos os gêneros. É esperado um aumento desse número para 21 milhões de pessoas até 2030. No Brasil estima-se a ocorrência de mais de 569 mil pessoas com a doença. Um dos biomarcadores presente na membrana em diversos tipos de células tumorais são as proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70s), e sua alta expressão leva a uma progressão da doença pelo aumento da proliferação e diminuição do processo de apoptose, sendo correlacionada com o aumento do grau do tumoral, a um prognóstico ruim e resistência a quimioterápicos. Uma forma de modular a atividade das HSP70s é pela ação das suas co-chaperonas, que irão se ligar a HSP70 regulando positivamente ou negativamente a sua atividade. Uma dessas co-chaperonas é a HspBP1, um fator de troca de nucleotídeo, que apresenta, em alguns tipos de células tumorais, uma expressão elevada semelhante ao observado com a HSP70. No plasma de pacientes com câncer de mama níveis reduzidos de HspBP1 foram relacionados com um prognóstico ruim. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa no modelo de melanoma murino B16F10, revelaram que as células da linhagem B16F10-1 transfectadas para superexpressão de HspBP1 apresentaram um crescimento tumoral significativamente reduzido quando comparado ao grupo de animais que foram tratados com células transfectadas com o vetor sem inserto. Transfecção com o gene para expressão de HspBP1 não apresentou efeito sobre células de melanoma *in vitro*. O mecanismo pela qual a proteína HspBP1 apresenta esse efeito antitumoral ainda não está elucidado, portanto há uma necessidade de um melhor entendimento da ação da HspBP1 no ambiente tumoral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os mecanismos da atividade antitumoral da proteína HspBP1 e do seu peptídeo 1-136.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1 Produção e purificação da proteína HspBP1 e do peptídeo HspBP1 1-136;

3.2.2 Determinação da concentração *in vivo* da proteína HspBP1 e do peptídeo HspBP1 1-136 com efeito antitumoral

3.2.3 Investigação da relação do efeito do tratamento com a HspBP1 e do peptídeo 1-136 com a resposta imune

# **Capítulo 2**

## **Metodologia**

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Produção e purificação da proteína HspBP1 e do peptídeo HspBP1 1-136

A proteína inteira (41 kDa, GeneID: 23640) e o seu peptídeo 1-136 (18 kDa) foram clonados no vetor de clonagem pUC57, resistência a ampicilina, e subclonados no plasmídeo de expressão pET30(+), resistência a canamicina, pela empresa GenScript Biotech (China). Esses clones foram transformados em *Escherichia coli* XL1-blue para obter o DNA plasmidial utilizando PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para seguir ao sequenciamento, com o intuito de confirmar identidade, integridade e ausência de mutações dos genes clonados. Após a confirmação, os clones foram transformados em *Escherichia coli* BL21 (DE3) para iniciar os testes de expressão.

Após a identificação das melhores condições dos testes de expressão, as proteínas foram produzidas em uma escala maior e seguiram para o processo de purificação. A purificação das proteínas foi dividida em duas etapas: a primeira etapa foi utilizada a coluna His GraviTrap™ (GE Healthcare Life Sciences), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Na segunda, foi utilizado o sistema AKTA FPLC de cromatografia com a coluna HiPrep FF 16/10 com Ni Sefarose (GE Healthcare Life Sciences). As concentrações das proteínas foram determinadas utilizando o kit Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen), na qual foi lido em um Qubit® Fluorímetro (Invitrogen). A sua integridade foi analisada por Western Blot utilizando um anticorpo anti-HspBP1 (PA5-35155, Invitrogen, EUA), e a proteína foi caracterizada por espectrometria de massas (LTQ Orbitrap Discovery, Thermo, USA).

### 4.2 Avaliação de endotoxinas na proteína HspBP1 e no peptídeo 1-136

Após as etapas de purificação e caracterização, foi realizado um teste de bioensaio para avaliar presença de endotoxinas na HspBP1 e no peptídeo 1-136. O motivo dessa análise foi para eliminar possíveis respostas imunológicas contra esse lipopolissacarídeo. Sabe-se que células dendríticas (CD11c+)

aumentam a expressão dos níveis de CD86 após 6 horas de uma injeção intravenosa de LPS. Dessa forma, foi injetado nos animais C57BL/6 25µg de LPS, 30 µg da proteína HspBP1, do peptídeo 1-136 e PBS, como controle negativo. Após 6 horas foi analisado a expressão de CD86 nas células CD11c+ dos esplenócitos por citometria de fluxo. Os anticorpos conjugados com fluorocromo usados para essa análise foram CD11c (HL3 – APCH7), B220 (RA3-6B2 - FITC) e CD86 (GL1 - PE).

#### 4.3 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6, BALB/c e camundongos fêmeas e machos BALB/c Foxn1-/- entre 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 15-20g. Estes animais foram obtidos de uma colônia mantida no Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CeMBe) – PUCRS. Todos os animais foram alojados no biotério do CeMBe com água e comida *ad libitum*. Camundongos Nod Scid Gamma (NSG) foram fornecidos pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vivian Vasconcelos (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil). Todos os procedimentos nos animais foram realizados de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sobre o protocolo ID CEUA 8466 (ANEXO A).

#### 4.4 Linhagens Celulares

As linhagens de melanoma murino metastático B16F10 (ATCC CRL-6475) foi cultivada em meio Dulbeccol's Eagle's (DMEM – Gibco, USA), suplementado com 10% de soro bovino inativado (SFB – Gibco, USA), 2 mM L-glutamina e 1% penicilina/streptomicina. A linhagem de câncer de mama murino 4T1 (ATCC CRL-2539) foi cultivado em meio RPMI 1640, suplementado com 10% SFB inativado, 2 mM L-glutamina e 1% penicilina/streptomicina. As culturas celulares foram mantidas em uma estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.5 Modelos tumorais *in vivo*

As células B16F10 e 4T1 foram tripsinizadas e as células viáveis foram selecionadas utilizando Tripán Blue. Para a inoculação do tumor,  $1 \times 10^5$  células foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS e injetados na região do flanco esquerdo dos animais C57BL/6, para a linhagem B16F10, ou na terceira mama do lado esquerdo dos animais BALB/c, para linhagem 4T1.

#### 4.6 Avaliação do efeito antitumoral *in vivo*

Para avaliar a melhor concentração da HspBP1 com um efeito antitumoral, foi analisado três diferentes concentrações da proteína nos animais em que foi gerado os modelos tumorais. As doses estipuladas foram de 0,48 $\mu\text{M}$ , 0,97 $\mu\text{M}$  e 1,46 $\mu\text{M}$  em PBS, utilizando 5 animais por grupo e realizando dois experimentos individuais. Analisamos duas vias de administração: intravenosa (i.v) e intraperitoneal (i.p). As concentrações foram estipuladas de acordo com resultados não publicados pelo nosso grupo de pesquisa, presentes na patente WO 2001/81545, em que ao tratar animais com o modelo de melanoma com 0,97 $\mu\text{M}$  da proteína HspBP1 foi observado uma diminuição no crescimento tumoral.

Os animais foram tratados nos dias 10 e 16 após o implante tumoral, onde no 10º dia já era possível observar um volume tumoral de  $\sim 150 \text{ mm}^3$ . O volume do tumor (V) ( $\text{mm}^3$ ) foi calculado utilizando a fórmula  $V = d^2 \times D \times 0,5$ , em que d= diâmetro menor e D = diâmetro maior da massa do tumor (47). O peso e o volume foram avaliados a cada dois dias, utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo). A análise final do efeito antitumoral ocorreu no dia 25, após o implante tumoral, através da análise final do volume tumoral e da avaliação do peso dos animais.

#### 4.7 Análise do fenótipo imunológico

Para avaliar mudanças no perfil imunológico foram realizados dois desenhos experimentais: o primeiro foi avaliar mudanças após o tratamento com uma dose da HspBP1 no dia 10, após a injeção tumoral, e no dia 14

realizar a análise; o segundo, foi avaliar mudanças após três doses da HspBP1 nos dias 10,12 e 14, após a injeção tumoral, e no dia 17 os animais foram analisados. Durante o período de tratamento, nos dois desenhos experimentais, foi avaliado o volume do tumor e peso dos animais, a cada dois dias. A análise foi realizada por citometria de fluxo nos dias 14 e 17 após a injeção tumoral, de acordo com o primeiro e o segundo desenho experimental, respectivamente. Todas estas análises avaliaram as células do sistema imunológico no infiltrado tumoral e no linfonodo drenante. Para avaliar o fenótipo das células e a produção de citocinas através da citometria de fluxo foram utilizados os anticorpos conjugados com fluorocromo anti-CD4 (RM4-5 – APC-H7), anti-CD8 (53-6.7 – PE-Cy7), anti-FoxP3 (MF23 - PE), anti-IL-10 (JES5-16E3 - FITC), anti-Ki67 (SolA15 - PerCP), anti-CD11c (HL3 – PE-Cy7), anti-CD11b (M1/70 – APH-H7), anti-IA<sup>B</sup> (AF6-120.1 - FITC), anti-B220 (RA3-6B3 - PerCP), anti-F4/80 (BM8 - APC). As suspensões celulares do tumor foram bloqueadas com FcBlock por 20 minutos no gelo, e para a marcação de superfície as células foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos. Para a marcação do Ki-67, IL-10 e FoxP3 foi realizado a permeabilização celular, utilizando o kit de Fixação/Permeabilização (eBioscience). Para detecção de IL-10, as suspensões celulares foram pré-incubadas por 4 horas com 50 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e GolgiStop (BD Biosciences) em RPMI com 10% de SFB. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, USA). A análise dos dados foi realizada utilizando FlowJo software (versão 7.5, Tree Star Inc., Ashland, US).

#### 4.8 Western Blot de HSP70

Os tumores foram lisados com tampão de lise contendo inibidor de protease. As amostras (20 µg) foram aplicadas a um gel de poliacrilamida 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após a etapa de bloqueio (incubação de 1 hora em PBS contendo 5% de leite em pó) a membrana foi incubada com o anticorpo primário HSP70 biotilado (C92F3A-5). Todas as bandas imunorreativas nos blots foram reveladas utilizando o anticorpo secundário Streptoavidina-HRP (Zymed) e revelados com Amersham

ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Para análise da intensidade das bandas foi utilizado o programa ImageJ (NIH).

#### 4.9 Análise Estatística

Diferenças entre pontos específicos foram determinados pelo teste t de Student. O teste de análise de variância (ANOVA) foi usado para determinar diferenças entre grupos e para comparações múltiplas foi utilizado o teste *posthoc* Tukey. Para analisar sobrevivência o teste Kaplan-Meier foi utilizado. Resultados foram considerados significativos quando o valor p era menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ). Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (Graphpad Software Inc.)

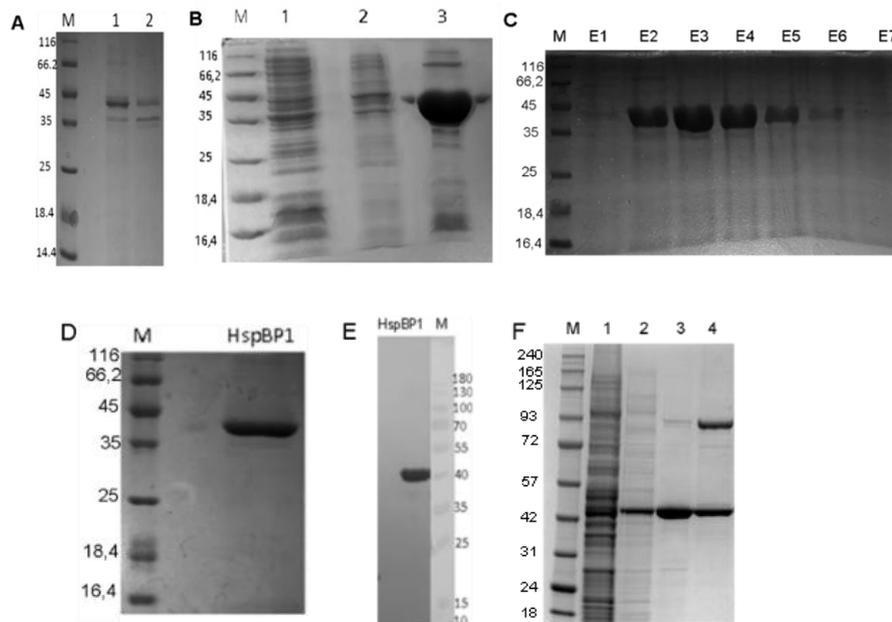
# **Capítulo 3**

## **Resultados**

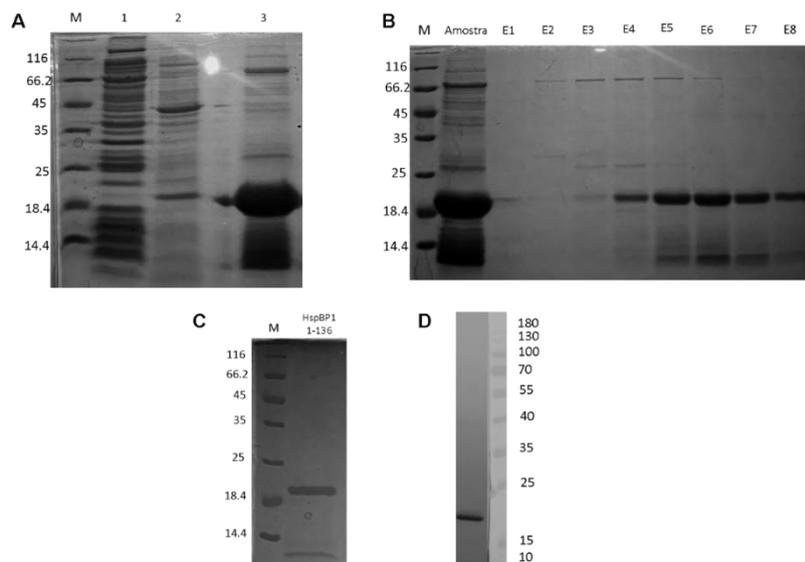
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expressão e Purificação da HspBP1 e do peptídeo 1-136

As sequências da HspBP1 inteira (41 kDa) e do seu peptídeo 1-136 (18 kDa) foram subclonados no vetor de expressão pET30(+), e pelo sequenciamento da clonagem foi confirmada a identidade e a ausência de mutações. A melhor condição experimental para a expressão da proteína inteira foi observada em *E. coli* BL21 (DE3), em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina, após 6 horas de crescimento com indução de 1mM de isopropil β-D-1-tio galactopiranoside (IPTG), à 37°C, na porção solúvel do extrato celular (Figura 6A). Para o peptídeo 1-136 permaneceu as mesmas condições, no entanto, só foi observado a sua expressão quando a incubação ocorreu a 30°C. Após as etapas de purificação a análise por gel de SDS-PAGE mostrou somente bandas nas regiões entre 35-45 kDa, para a proteína inteira, e entre 18.4-25 kDa para o peptídeo (Figura 6C-D e 7A-C). Confirmamos que essas bandas presentes na purificação eram as de interesses ao realizar um western blot com um anticorpo primário anti-HspBP1 (Figura 6E e 7D). Para confirmar a integridade foi realizado espectrometria de massas. As bandas de aproximadamente ~41kDa e ~18kDa foram retiradas do SDS-PAGE e submetidos ao protocolo de digestão com tripsina, os peptídeos obtidos foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), em triplicada. A identidade tanto da proteína inteira quando do peptídeo 1-136 foram confirmadas, com a identificação de 49 peptídeos únicos e uma cobertura de sequência de 70%, para a proteína inteira. Para o peptídeo 1-136 foi identificado 17 peptídeos únicos com uma cobertura de sequência de 65%. Para determinar o estado oligomérico da HspBP1 inteira foi realizado um SDS-PAGE na qual o tampão não possuía β-Mercaptoetanol. Observamos que em solução PBS, a HspBP1 forma um dímero (Figura 6F), já observado por Shomura, *et al.*, 2005 (36).



**Figura 6:** SDS-PAGE da expressão, purificação e análise do estado oligomérico da proteína inteira. **A.** Análise da etapa de expressão em *E. coli* BL21 (DE3), em 1 – extrato proteico porção solúvel e 2 – extrato proteico porção insolúvel; **B.** Purificação com a coluna His GraviTrap™, em que 1- porção que não interagiu com a coluna, 2 – lavagem, 3 – porção que foi eluída; **C** – Purificação com a coluna HiPrep FF 16/10 com Ni Sefarose, em que E1-E7 equivale as eluições, a cada 3 mL, em um gradiente de imidazol; **D.** SDS-PAGE da junção das porções eluídas do gel **C**; **E** – Western Blot, utilizando um anticorpo anti-HspBP1; **F.** Análise do estado oligomérico, em que 1- lisado proteico, 2 – purificação, 3 – HspBP1 em um tampão com  $\beta$ - Mercaptoetanol e 4 – HspBP1 em um tampão sem  $\beta$ - Mercaptoetanol. **M** – Marcador de peso molecular.

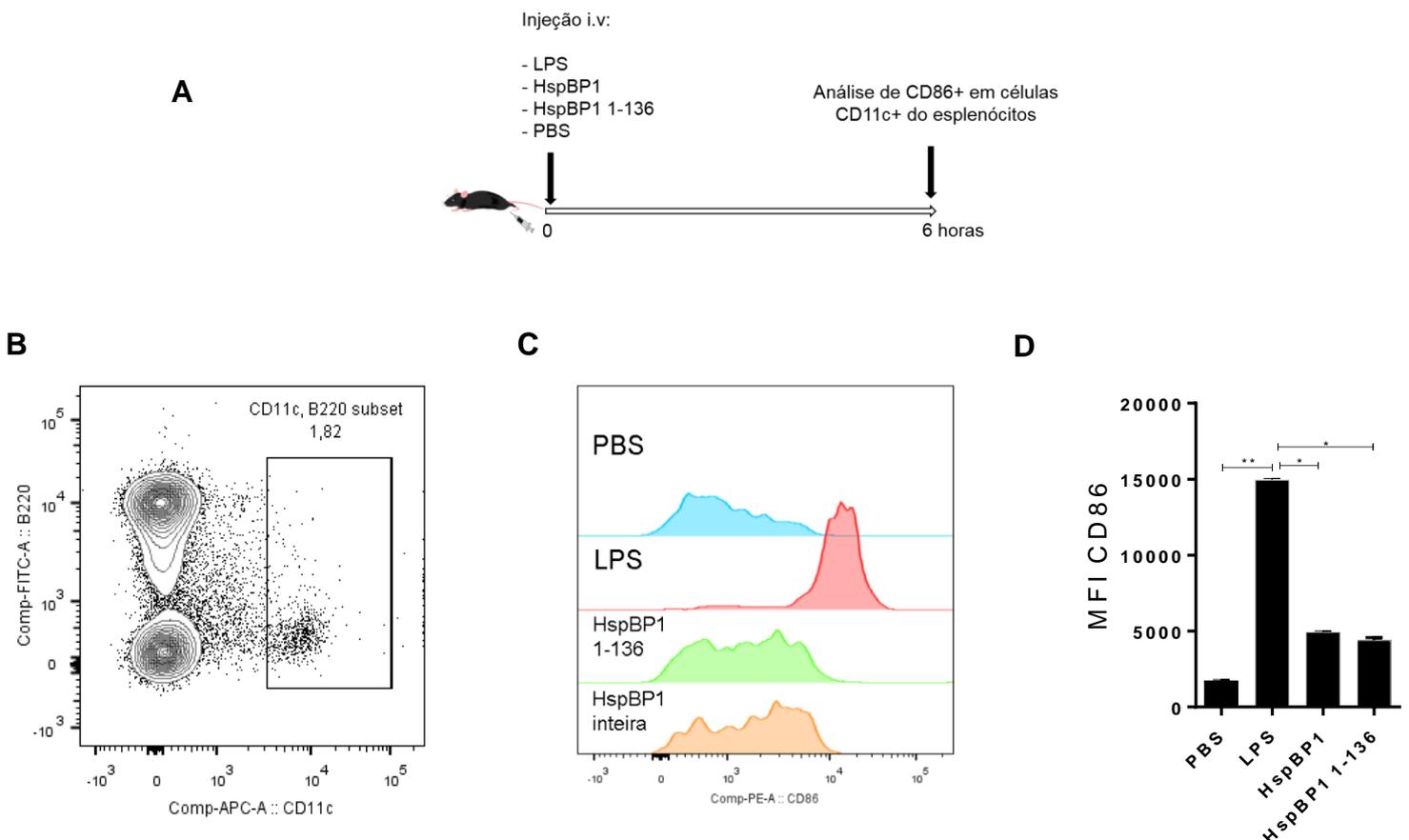


**Figura 7:** SDS-PAGE da purificação do peptídeo HspBP1 1-136. **A.** Purificação com a coluna His GraviTrap™, em que 1- porção que não interagiu com a coluna, 2 – lavagem, 3 – porção

que foi eluída; **B** – Purificação com a coluna HiPrep FF 16/10 com Ni Sefarose, em que E1-E8 equivale as eluições, a cada 3 mL, em um gradiente de imidazol; **C**. SDS-PAGE da junção das porções eluídas do gel **C**; **D** – Western Blot, utilizando um anticorpo anti-HspBP1. **M**– Marcador de peso molecular.

## 5.2 Análise da presença de endotoxinas

Sabe-se que proteínas produzidas de forma recombinante podem apresentar componentes bacterianos, um desses componentes são as endotoxinas. Uma proteína recombinante que possui endotoxinas pode estimular uma resposta imunológica em animais, contra a mesma. Para eliminar a possibilidade de que ocorram alterações no sistema imunológico após o tratamento com a proteína e o peptídeo 1-136, por causa dessas toxinas, nós realizamos um bioensaio para verificar a presença de LPS (FIGURA 8A). Após 6 horas da injeção de LPS, PBS, HspBP1 inteira e do peptídeo 1-136 foi observado um aumento da expressão de CD86 apenas nos animais em que foi injetado LPS. A expressão do CD86 nos animais que foram injetados com a proteína inteira e com o peptídeo 1-136 não houve diferença estatística em relação aos animais injetados com o PBS. (FIGURA 8C-D). Dessa forma, podemos concluir que qualquer resultado subsequente em relação a alterações no sistema imunológico não será pela presença de LPS.

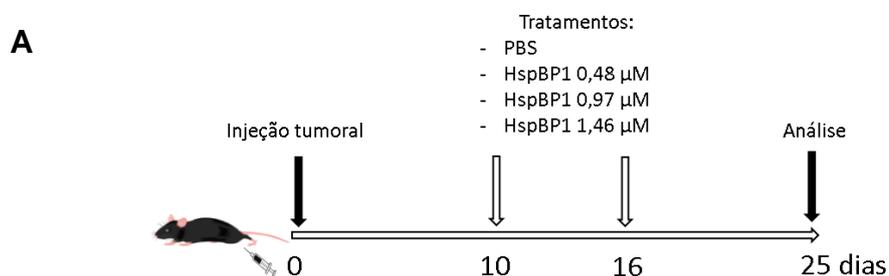


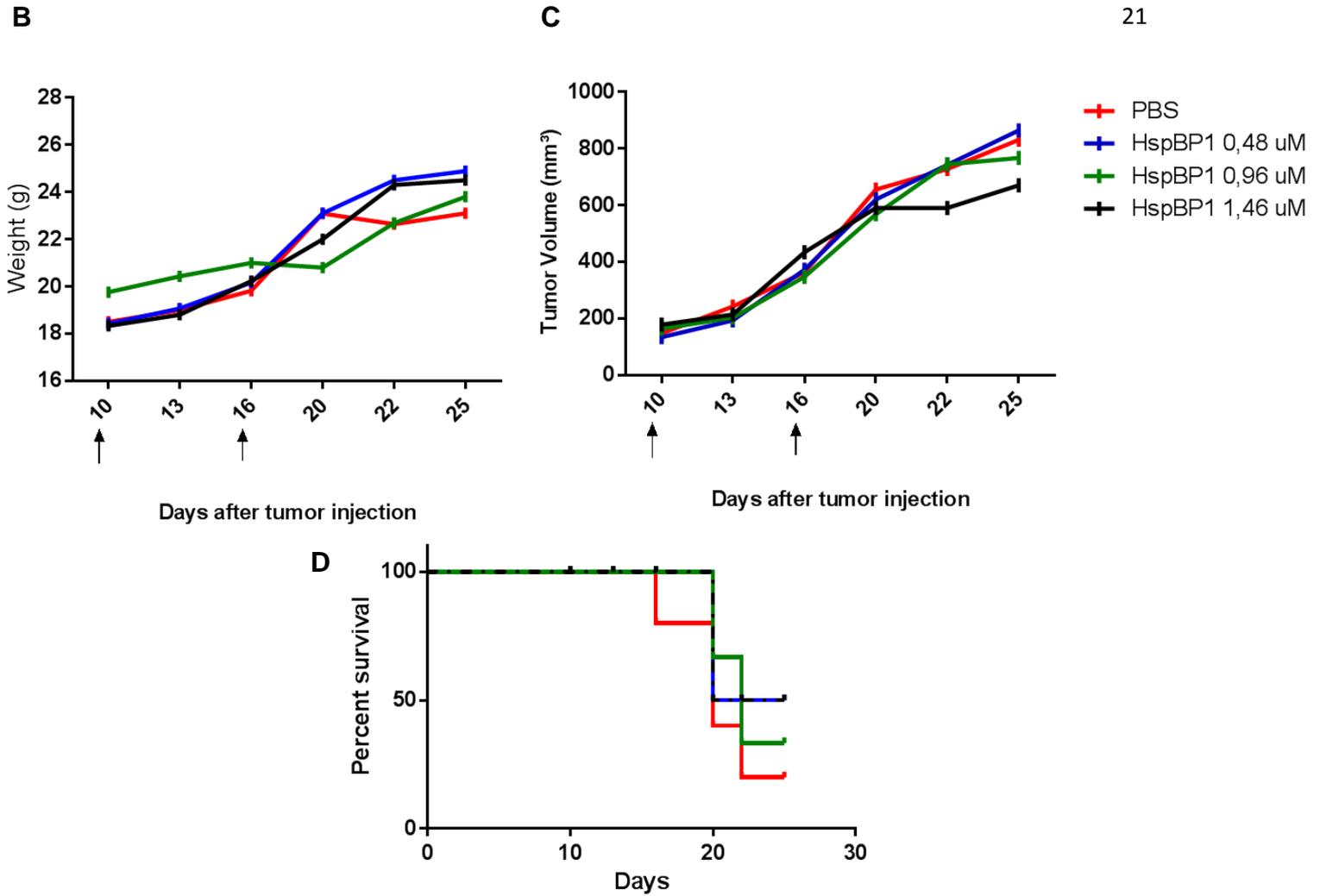
**Figura 8:** Bioensaio para avaliar presença de LPS nas proteínas HspBP1 e no peptídeo 1-136. **A.** Desenho experimental; **B.** Gate em células dendríticas ( $CD11c^+B220^+$ ), na análise por citometria de fluxo; **C.** Histograma da expressão de CD86 em células CD11c+; **D.** Representação em gráfico de barras dos histogramas em **C.** Resultados (média  $\pm$  SD, n = 3 por grupo) estão representados em gráficos de barras. A significância entre os grupos é mostrada como \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .

### 5.3 Análise do efeito antitumoral da proteína

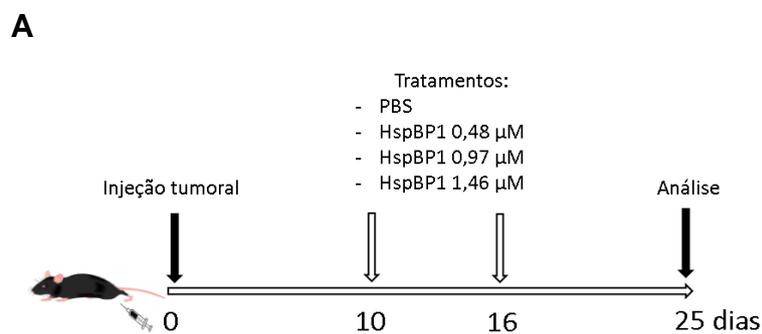
Para avaliar o efeito do tratamento com a proteína inteira em relação ao efeito antitumoral, os animais com o modelo de melanoma metastático foram transplantados com a linhagem celular B16F10-1, pela injeção de  $1 \times 10^5$  células no flanco esquerdo. Os animais foram tratados com três doses diferentes da proteína inteira HspBP1 (0,48  $\mu$ M, 0,97  $\mu$ M e 1,46  $\mu$ M) nos dias 10 e 16 após o implante tumoral, onde era possível observar um volume tumoral de  $\sim 150 \text{mm}^3$  em todos os animais. Os tratamentos foram realizados em duas vias de administração, intraperitoneal e intravenosa (Figura 9 e 10).

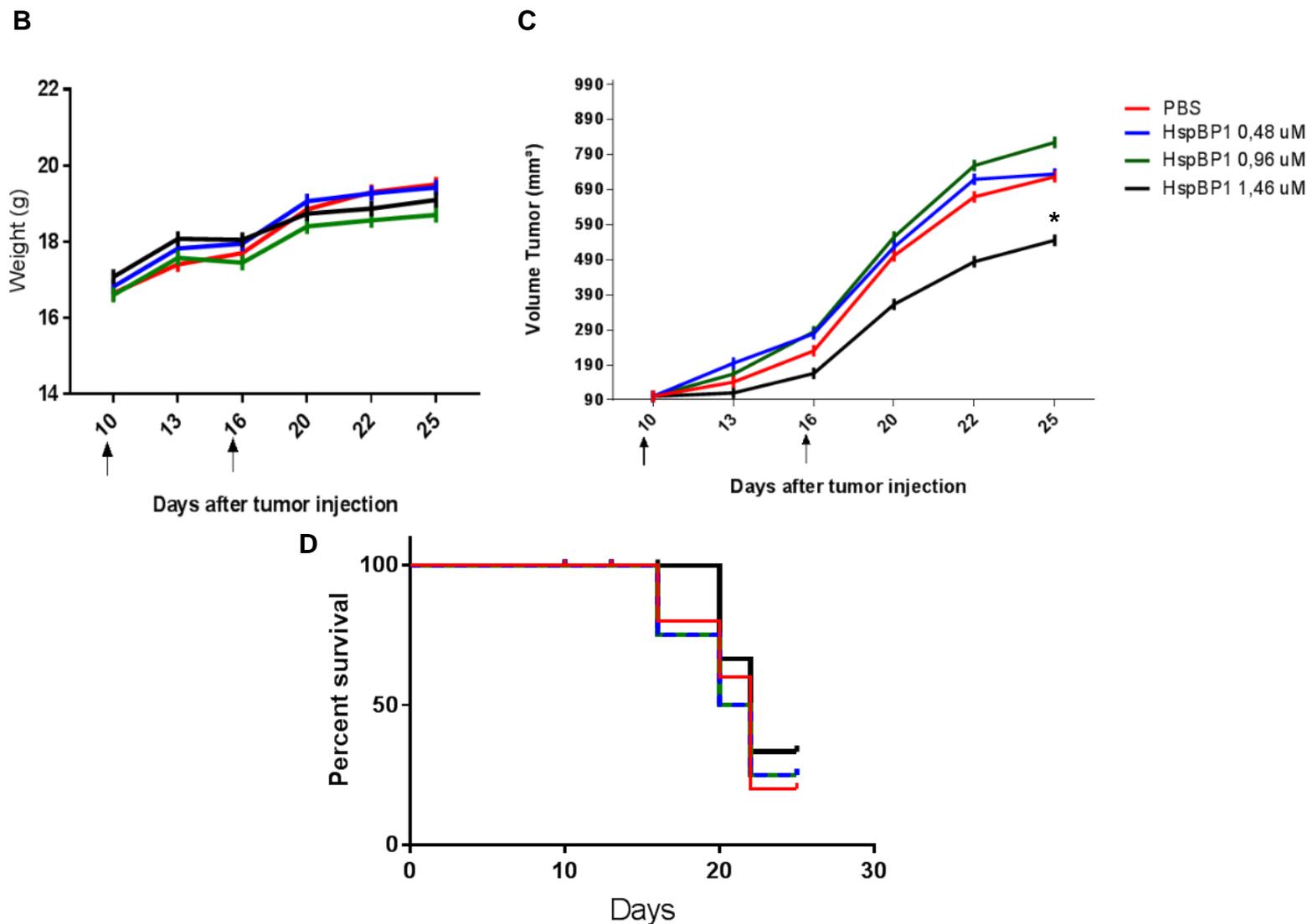
Em ambas as vias foi observado que o tratamento com a maior concentração de HspBP1 (1,46  $\mu$ M) apresentou uma tendência em reduzir o volume tumoral comparado com o grupo PBS (Figuras 9C e 10C). Não foram observadas diferenças em relação ao peso e sobrevivência dos animais (Figuras 9B,D e 10B,D).





**Figura 9.** Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intraperitoneal, em animais C57BL/6 no modelo de melanoma. A – Desenho experimental; B - Peso dos animais (g); C- Volume do tumor (mm<sup>3</sup>),  $p=0.08$ ; D- Sobrevivência. Flecha = dia do tratamento;





**Figura 10.** Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intravenosa, nos animais C57BL/6 no modelo de melanoma. A – Desenho experimental; B - Peso dos animais (g); C- Volume do tumor (mm<sup>3</sup>); D- Sobrevivência. Flecha = dia do tratamento; A significância entre os grupos é mostrada como \*p<0.05 em relação ao grupo HspBP1 0,96 μM.

Portanto, optamos por tratar os animais com a dose de 1,46 μM da proteína nos experimentos subsequentes, utilizando a via intravenosa.

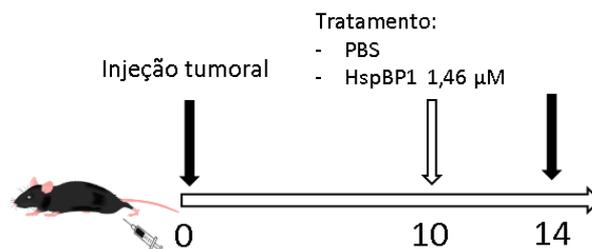
#### 5.4 Análise do perfil imunológico no infiltrado tumoral e linfonodo drenante

Por resultar em uma tendência em diminuir o volume tumoral comparado ao grupo PBS, os animais foram tratados com uma dose da HspBP1 e então

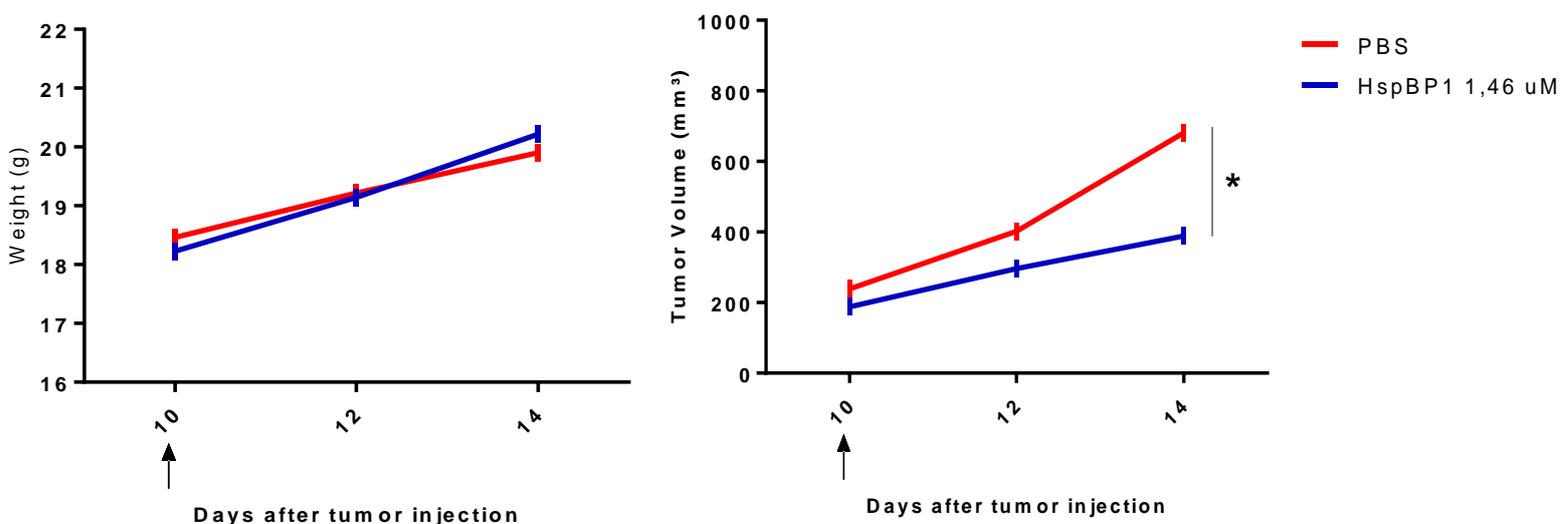
analisado o perfil imunológico das células do infiltrado tumoral e do linfonodo drenante. Os animais com o modelo de melanoma foram tratados com a HspBP1 10 dias após a injeção tumoral. O volume do tumor e peso dos animais foi avaliado a cada dois dias. O perfil das células do sistema imunológico inato e adaptativo analisado por citometria de fluxo foi avaliado no dia 14 (FIGURA 11A).

Com uma dose da HspBP1 foi observado uma diminuição no volume tumoral em relação ao grupo PBS e não foi observado diferença entre os pesos dos animais (FIGURA 11B – C). Na análise das células através da citometria de fluxo foi observado uma diminuição na frequência das células T regulatórias (células  $CD4^+FoxP3^+$ ) tanto no tumor quanto no linfonodo drenante. Na análise do sistema inato, o tratamento com a HspBP1 reduziu a porcentagem de células dendríticas (DCs) totais no tumor.

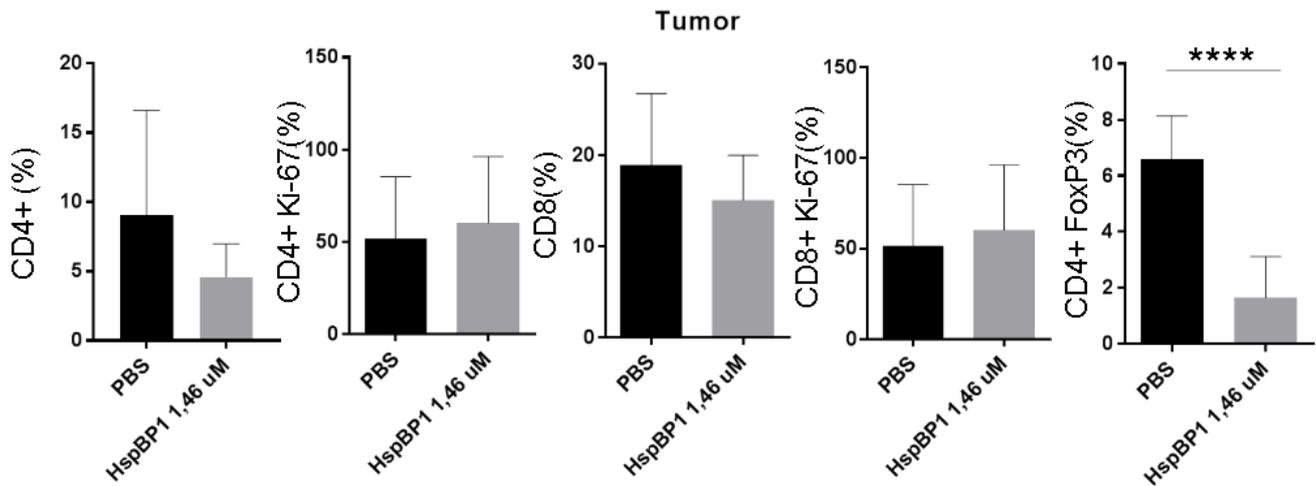
**A**



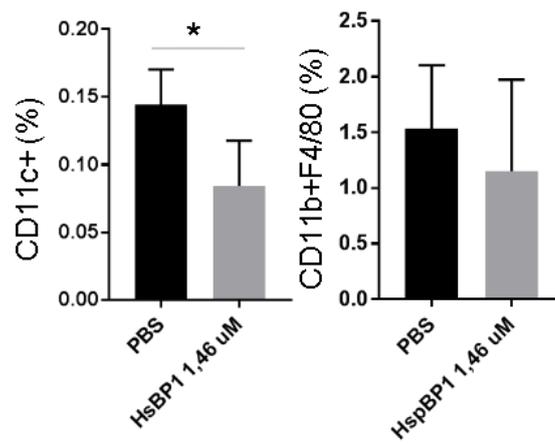
**B**



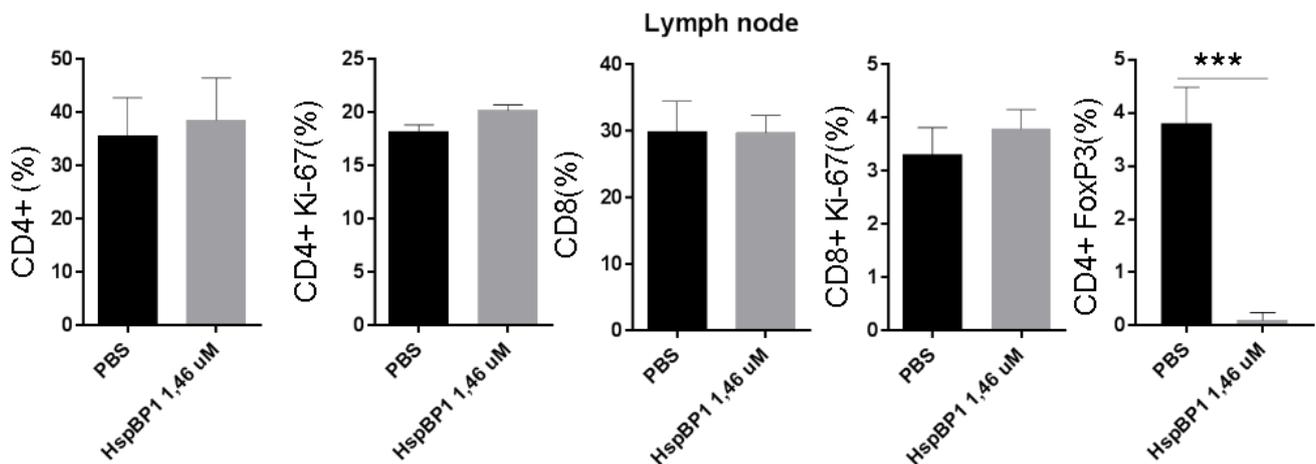
C



D



E

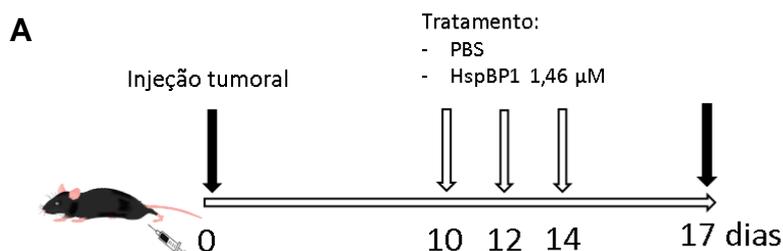


**Figura 11.** Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após uma dose de HspBP1 1,46  $\mu$ M, em animais C57BL6 no modelo de melanoma. A – Desenho experimental; B – Peso dos animais e Volume do tumor; C- Células T do tumor: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3+; D- Células do sistema inato do tumor: células dendríticas CD11c+, macrófagos CD11b+F4/80+. E – Células T do linfonodo drenante: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células

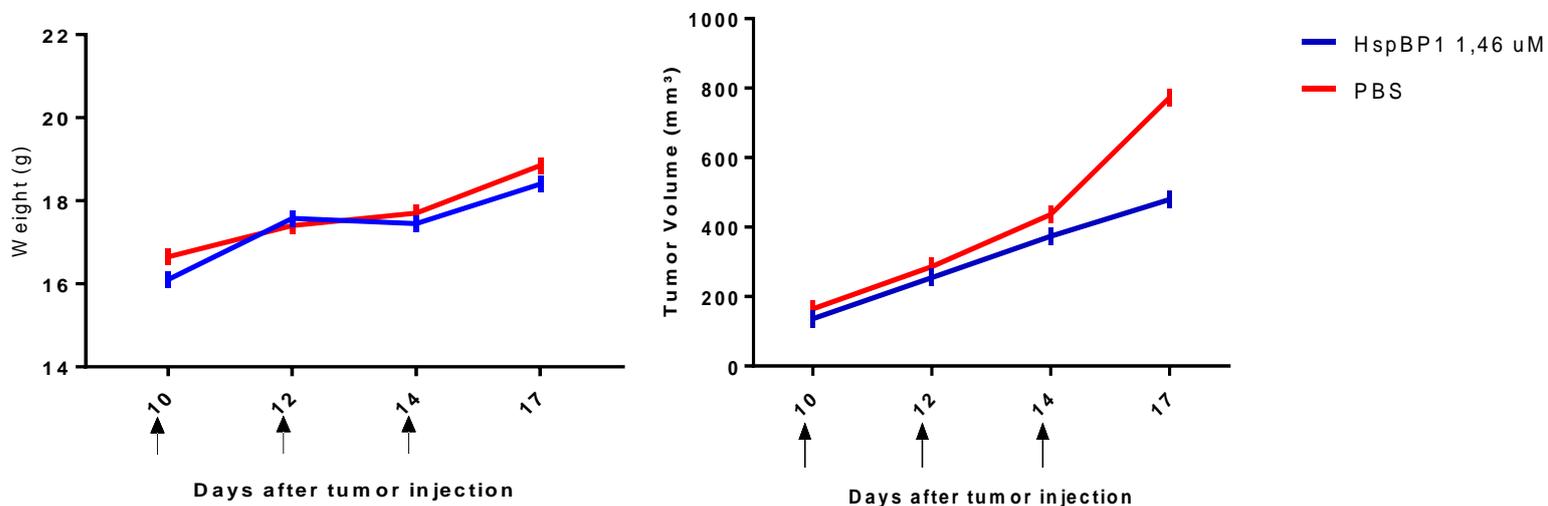
CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Flecha = dia do tratamento; Resultados (média  $\pm$  SD, n = 5 por grupo) estão representados em gráficos de barras. A significância entre os grupos é mostrada como \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 e \*\*\*\*p<0,0001.

No segundo desenho experimental os animais foram tratados com três doses da HspBP1 nos dias 10, 12 e 14 após o implante tumoral e no dia 17 foi avaliado mudanças no perfil imunológico do tumor e do linfonodo drenante por citometria de fluxo (FIGURA 12A). O peso e o volume do tumor foram analisados a cada dois dias.

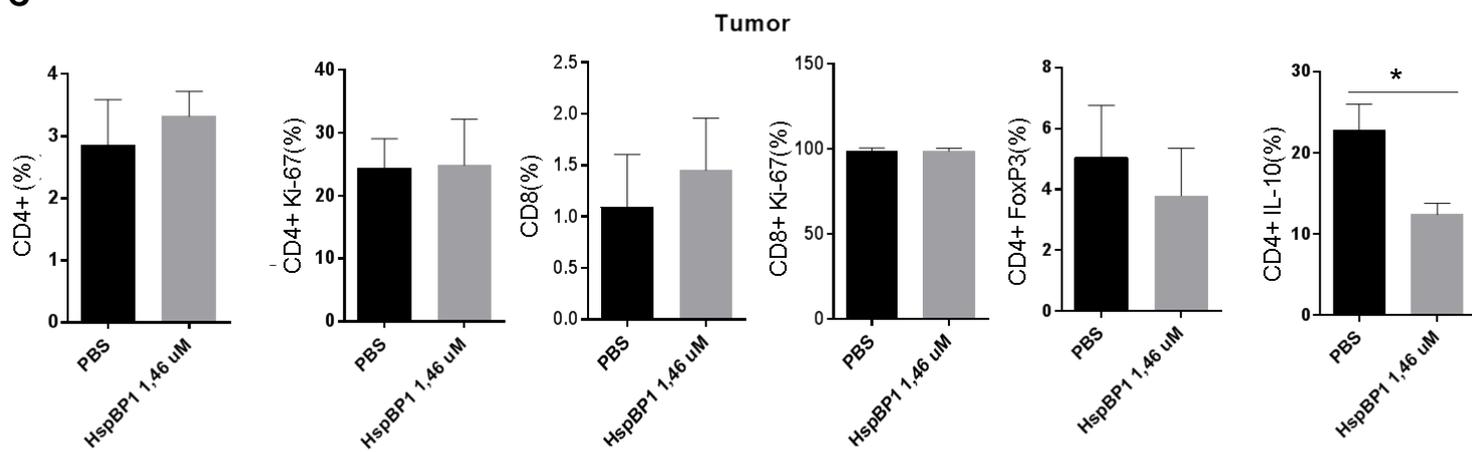
Após o tratamento com três doses da HspBP1 ainda foi observado uma tendência de diminuição do volume tumoral. Na citometria de fluxo foi possível observar uma tendência de diminuição de células T<sub>regs</sub> (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), e uma diminuição da secreção de IL-10 no tumor e no linfonodo drenante.



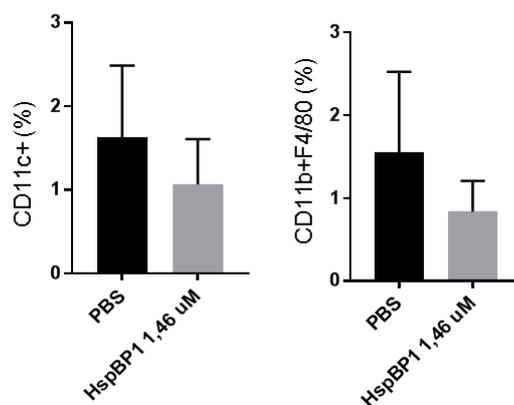
**B**



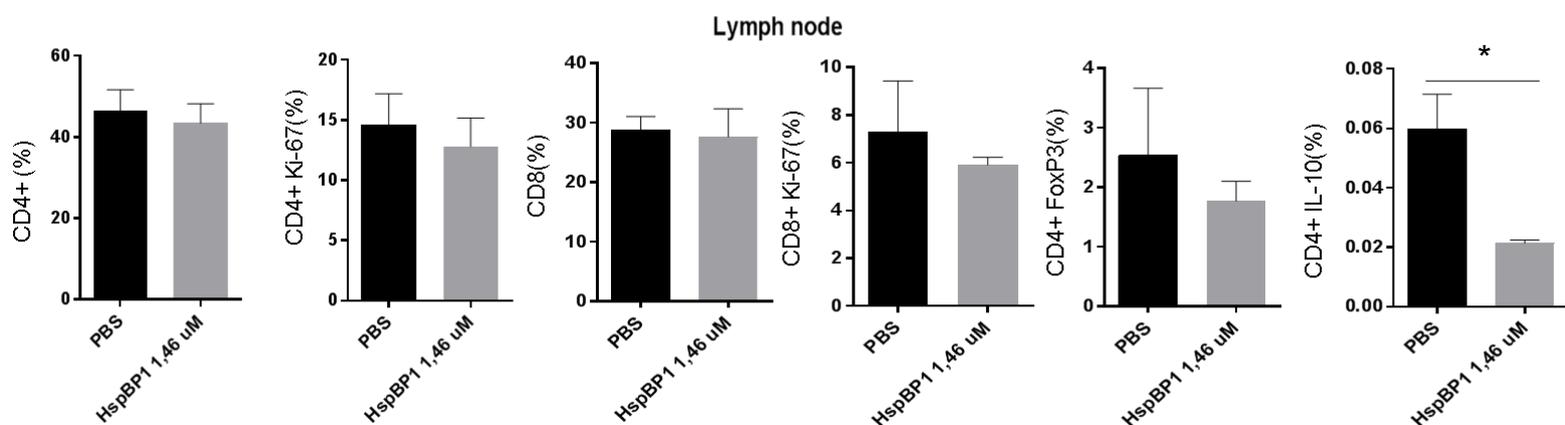
C



D



E



**Figura 12.** Análise do perfil imunológico no tumoral e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 1,46 μM, em animais C57BL6 no modelo de melanoma. A – Desenho experimental; B – Peso dos animais e Volume do tumor,  $p=0.78$ ; C- Células T do tumor: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3+; D- Células do sistema inato do tumor: células dendríticas CD11c+, macrófagos CD11b+F4/80+. E – Células T do linfonodo drenante: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3. Flecha = dia do tratamento; Resultados (média ± SD, n = 5 por grupo) estão representados em gráficos de barras. A significância de diferença entre os grupos é mostrada como \* $p<0.05$

Dessa forma, podemos concluir que ao tratar os animais, em que foi gerado o modelo de melanoma metastático, com a proteína HspBP1 há um efeito na redução no crescimento do volume do tumor e ocorre uma modulação nas células T<sub>regs</sub>. No entanto, há uma necessidade em repetir este experimento aumentando a quantidade de pontos e estendendo o tempo de análise para avaliar se tendência se mantêm.

### 5.5 Análise do efeito antitumoral do peptídeo HspBP1 1-136

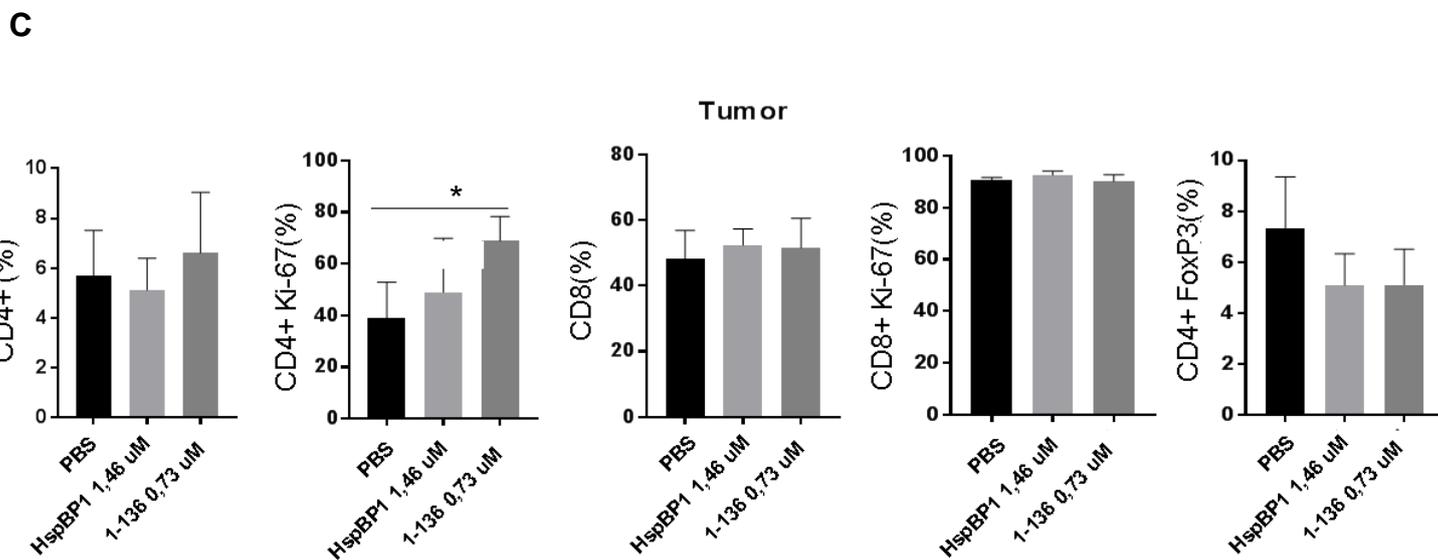
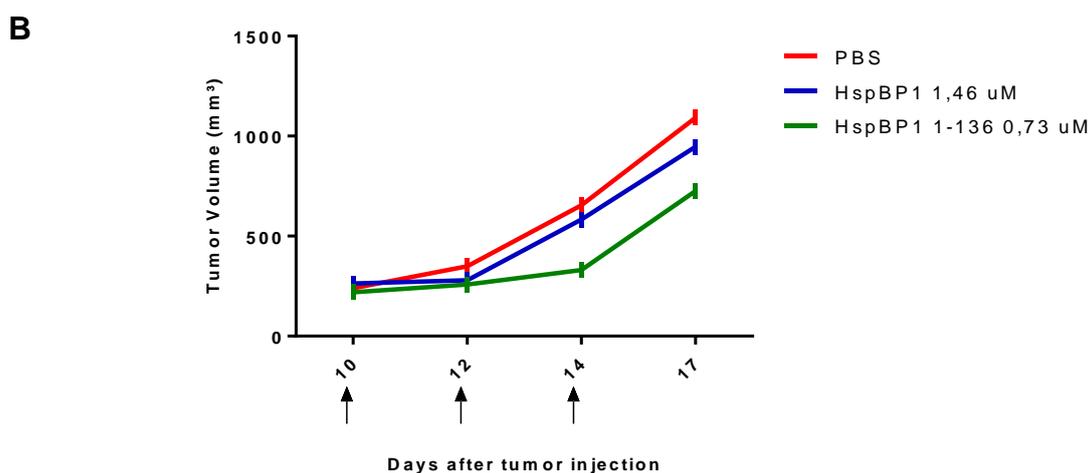
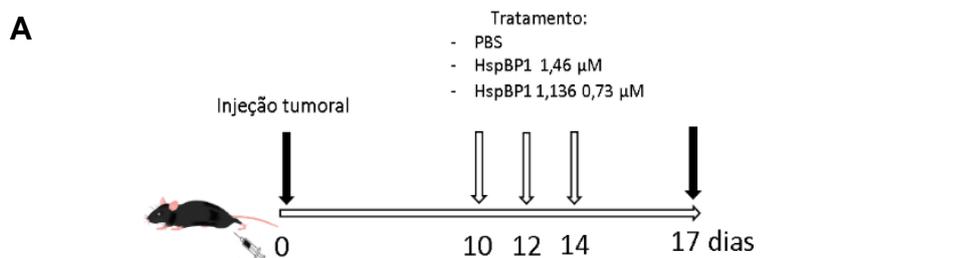
Resultados presentes na patente WO 2001/81545 mostram que o efeito antitumoral da HspBP1 está na região do peptídeo 1-136. Acredita-se que o mecanismo de ação antitumoral da HspBP1 depende da ligação desta porção com a proteína HSP70 interferindo desde modo na vantagem de sobrevivência que a HSP70 confere a célula tumoral. Dessa forma, decidimos tratar os animais com o modelo de B16F10 com o peptídeo 1-136.

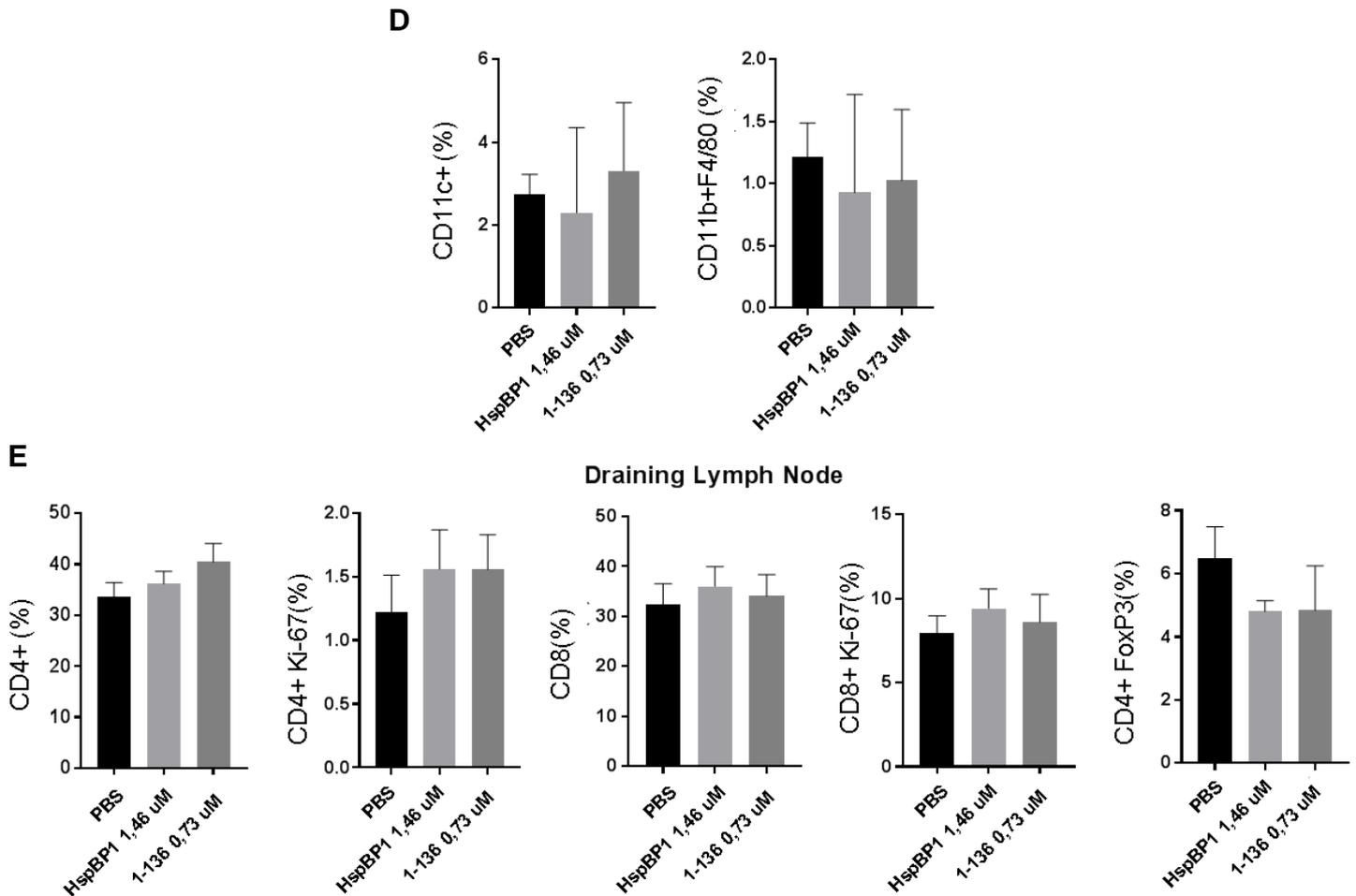
Os animais foram tratados nos dias 10,12 e 14 dias após a injeção tumoral com a proteína inteira e o peptídeo 1-136 0,73  $\mu$ M. Usamos como controle negativo PBS e controle positivo a proteína inteira 1,46  $\mu$ M. A concentração do peptídeo foi determinada previamente com a análise de uma curva, o peptídeo 1-136 na concentração de 0,73  $\mu$ M apresentou um melhor efeito antitumoral. O volume do tumor foi medido a cada dois dias, e a citometria de fluxo para analisar o perfil de células no tumor e no linfonodo drenante foi realizada no dia 17 (FIGURA 13A).

Ao tratar com a menor dose do peptídeo os animais apresentaram uma tendência de crescimento do volume tumoral reduzido comparado com o grupo tratado com o PBS e com a proteína inteira, confirmando assim os dados presentes na patente (FIGURA 13B). Da mesma forma que a análise com a proteína inteira também será necessário aumentar o tempo para analisar se tendência se mantêm e avaliar outros desenhos experimentais de tratamento.

Na análise por citometria foi observado que os animais tratados com o peptídeo apresentaram mudanças no perfil imunológico similar ao da proteína

inteira, com uma tendência em diminuir as células  $CD4^+FoxP3^+$  e aumentar a proliferação das células T  $CD4^+$  no tumor e no linfonodo drenante (FIGURA 13C e 13E). Indicando que o peptídeo 1-136 possui uma função em modular o sistema imunológico similar à proteína inteira.





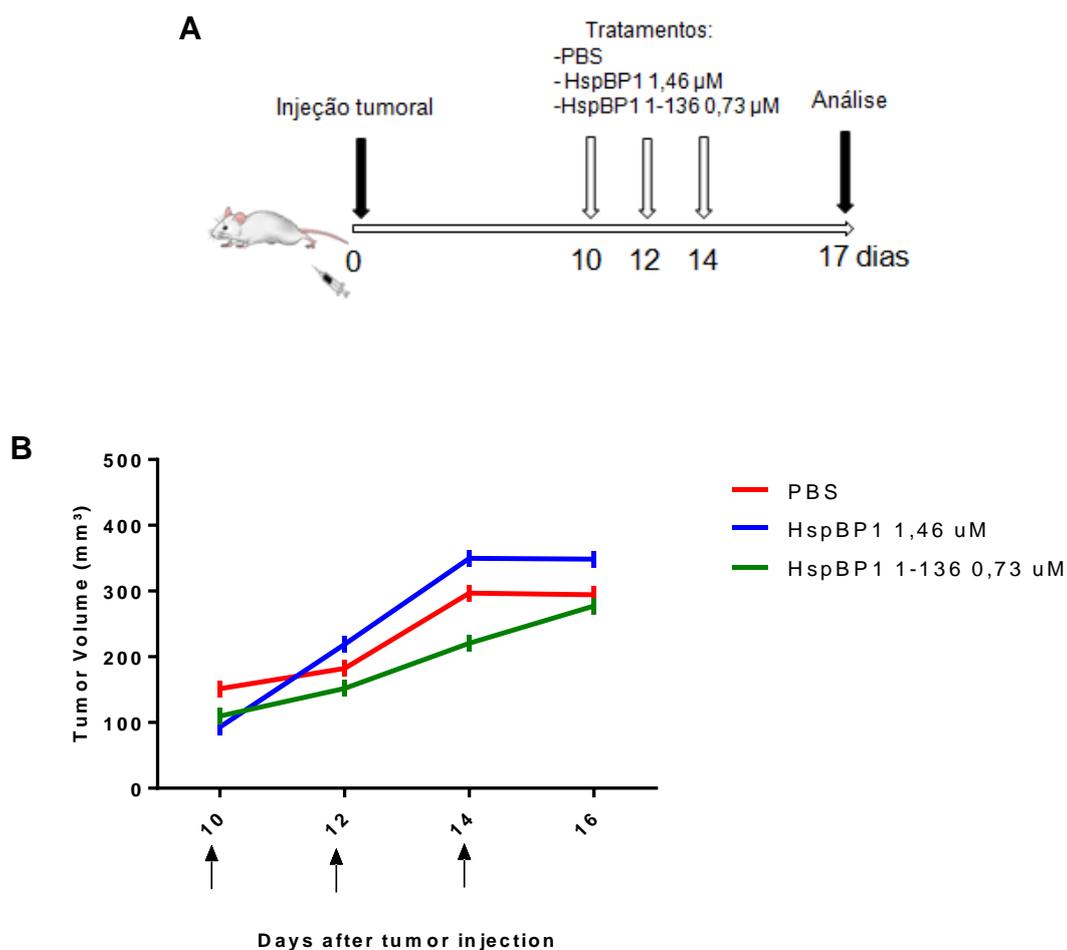
**Figura 13.** Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 1,46  $\mu$ M e do peptídeo 0,72  $\mu$ M, em animais C57BL6 no modelo de melanoma. A – Desenho experimental; B – Volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ),  $p=0059$ ; C- Células T do tumor: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3+; D- Células do sistema inato do tumor: células dendríticas CD11c+, macrófagos CD11b+F4/80+. E – Células T do linfonodo drenante: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3+. Flecha = dia do tratamento; Resultados (média  $\pm$  SD,  $n = 5$  por grupo) estão representados em gráficos de barras. A significância de diferença entre os grupos é mostrada como  $*p<0.05$ .

## 5.6 Análise da necessidade do sistema imune adaptativo para o efeito antitumoral da HspBP1

Na análise do perfil imunológico realizado por citometria de fluxo foi observado uma modulação principalmente nas células do sistema imunológico

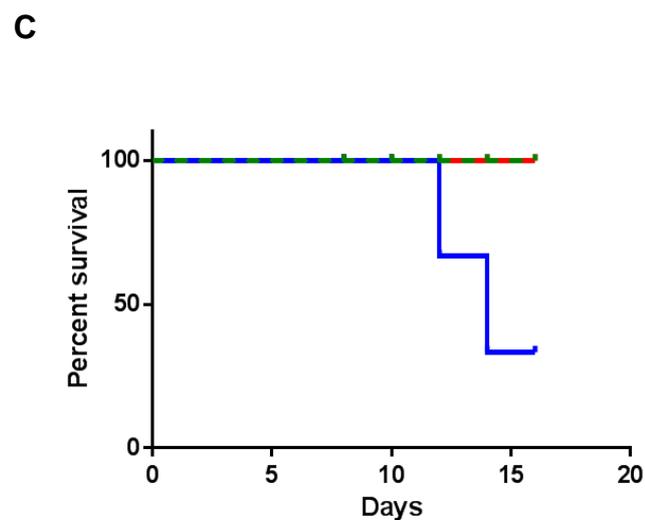
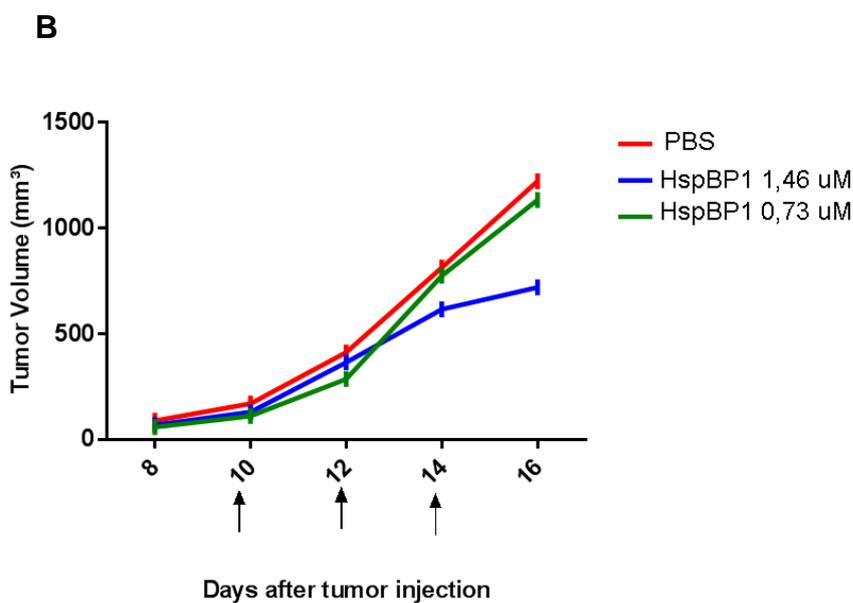
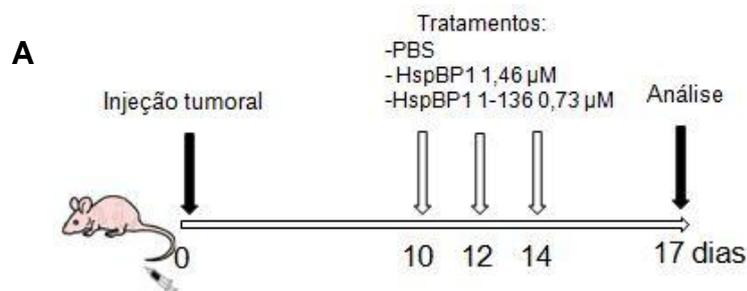
adaptativo. Dessa forma, nos perguntamos se ao tratar animais que não possuem sistema imunológico adaptativo com a HspBP1 e o peptídeo 1-136, se observaríamos diminuição no volume tumoral. Para esse experimento foi utilizado os camundongos *Nod-scid IL2rgnull* (NSG), um dos animais mais imunodeficientes disponível, eles não possuem em células T, células B e células NK e possuem deficiência em citocinas de cadeia  $\gamma$ .

Os camundongos NSG foram tratados com a HspBP1 nos dias 10,12 e 14 após a implantação do tumor. No dia 17 foi realizada a última análise do volume do tumor, esse medido a cada dois dias (FIGURA 14A). Nestes animais não foi observado diferença no volume do tumor dos grupos tratados com PBS e tratados com peptídeo (FIGURA 14B). Esses resultados indicam que o efeito antitumoral da HspBP1 é dependente do sistema imunológico adaptativo.



**Figura 14.** Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 em animais Nod-scid IL2rnull (NSG) no modelo de melanoma. A - Desenho experimental; B- Volume do Tumor ( $\text{mm}^3$ ),  $p = 0.38$ .

Para tentar identificar quais células do sistema adaptativo são as responsáveis pelo efeito antitumoral da HspBP1, foram utilizados os animais BALB/c Foxn1<sup>-/-</sup>, os camundongos nudes, que não possuem células T. Os animais foram tratados da mesma forma que os animais NSG, nos dias 10,12 e 14 com a proteína e com o peptídeo 1-136. No dia 17 foi realizada a última análise do volume tumoral (FIGURA 15A). Como observado nos animais NSG, também não foi observado um efeito antitumoral nos animais tratados com a HspBP1 e com o 1-136 (FIGURA 15B-C). No grupo tratado com a HspBP1 1,46  $\mu\text{M}$  houve duas mortes, durante a análise. Esses resultados indicam que a HspBP1, tanto inteira quanto o peptídeo, modulam as células T do sistema adaptativo para o seu efeito antitumoral.

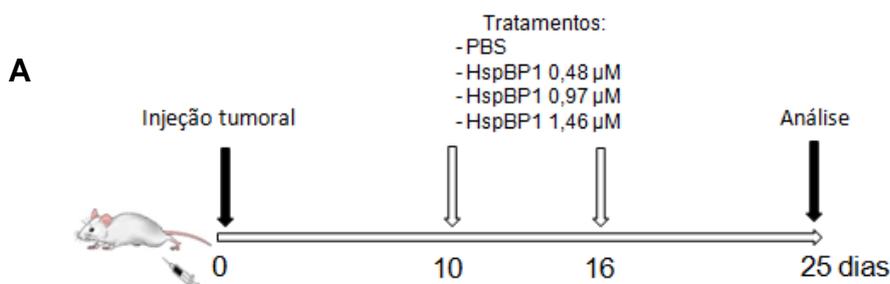


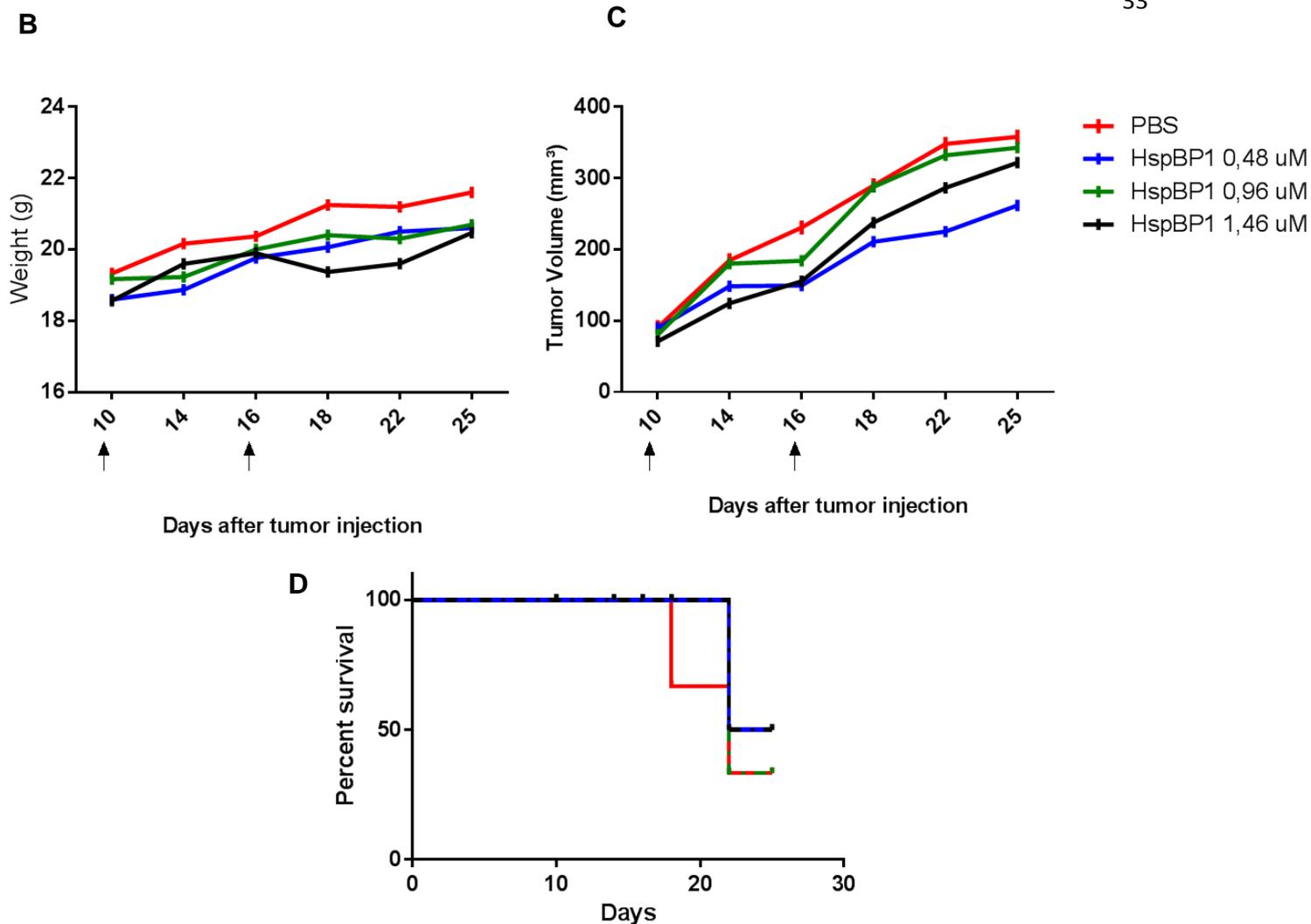
**Figura 15.** Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 em animais BALB/c Fox1n<sup>-/-</sup> no modelo de melanoma. A - Desenho experimental; B- Volume do Tumor (mm<sup>3</sup>), p=0,47; C- Gráfico de sobrevivência.

### 5.7 Efeito antitumoral da HspBP1 e do peptídeo 1-136 em modelo de câncer de mama

No modelo de melanoma metastático foi observado que o tratamento com a proteína HspBP1 e com o peptídeo 1-136 induziu um efeito antitumoral. Decidimos avaliar se era possível observar esse efeito em outros modelos dessa forma, tratamos animais com o modelo de câncer de mama, utilizando células da linhagem 4T1. Para esse modelo foi injetado  $1 \times 10^5$  células na terceira mama dos animais BALB/c. Os animais foram tratados com HspBP1 (0,48  $\mu$ M, 0,97  $\mu$ M e 1,46  $\mu$ M) nos 10 e 16 após a injeção das células tumorais e no dia 25 foi realizado a última análise do peso e do volume do tumor dos animais, estes analisados a cada 3 dias (FIGURA 16A).

Neste modelo observamos que os animais tratados com a menor concentração da HspBP1 foram os que apresentaram uma tendência de crescimento tumoral reduzido comparado com o grupo PBS. As concentrações maiores, no entanto, induziram um crescimento tumoral similar dos animais controles (FIGURA 16B). Sugerindo assim, que o efeito da HspBP1 pode ser diferente em cada modelo tumoral, tendo que ser tratado com concentrações diferentes da proteína. Decidimos assim utilizar a dose de 0,48  $\mu$ M nesse modelo.





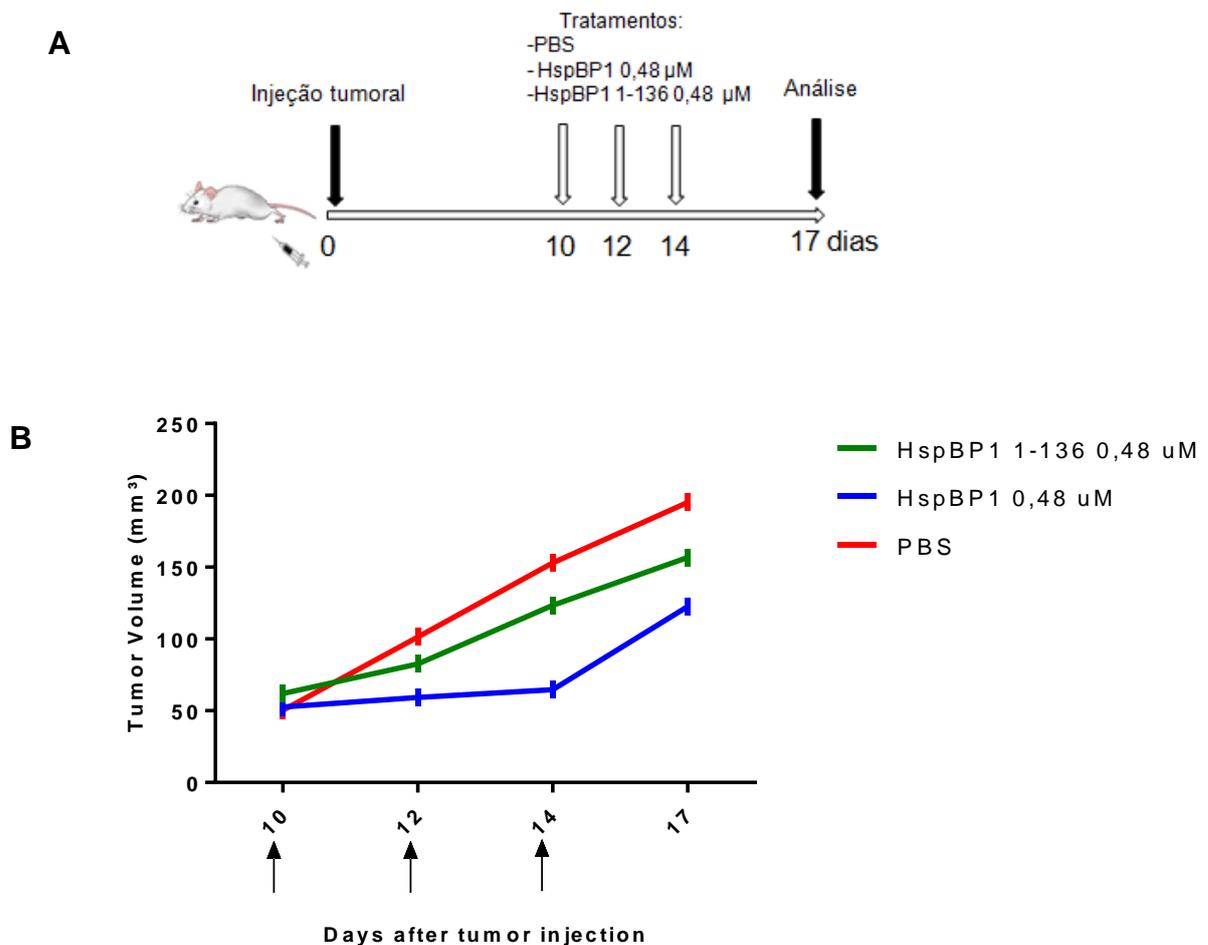
**Figura 16.** Avaliação do efeito antitumoral após tratamento com três concentrações de HspBP1, via intravenosa, em modelo de câncer mama transplantado com células 4T1. A – Desenho experimental; B - Peso dos animais (g); C- Volume do tumor (mm<sup>3</sup>),  $p=0.31$ ; D- Sobrevida. Flecha = dia do tratamento;

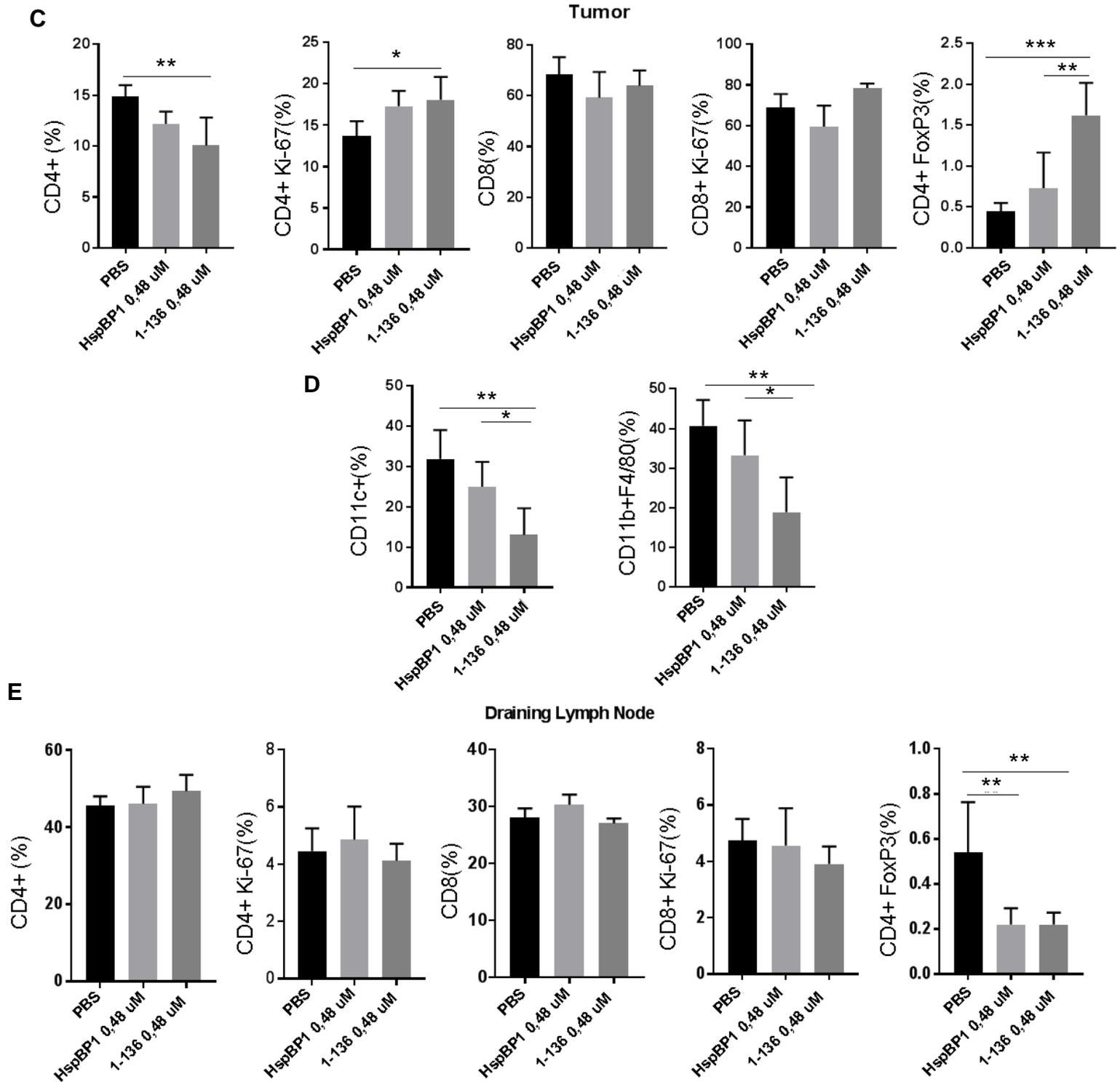
Para avaliar o efeito do peptídeo 1-136 decidimos tratar os animais com concentrações iguais da proteína inteira e o peptídeo 1-136 nos dias 10, 12 e 14. No dia 17 foi realizada a última análise do volume do tumor e a análise do perfil imunológico do tumor e do linfonodo drenante (FIGURA 17A).

Na análise do volume do tumor, o tratamento com o peptídeo resultou em uma tendência de diminuição do volume tumoral comparado ao grupo PBS, no entanto o efeito da proteína inteira foi mais eficaz. (FIGURA 17B). Similar ao modelo de melanoma há uma necessidade em repetir este experimento aumentando a quantidade de pontos e estendendo o tempo de análise para

avaliar se tendência se mantêm e estabelecer outros desenhos experimentais de tratamento.

Em relação à análise por citometria de fluxo, observamos alguns resultados diferentes dos obtidos no modelo de melanoma. O tratamento com a proteína inteira e com o peptídeo induziu uma diminuição, no tumor, de células  $CD4^+$ . No entanto, essas células  $CD4^+$  apresentaram uma proliferação mais elevada quando comparada com os animais tratados com PBS. Já em relação às células  $T_{regs}$  no tumor também foi observado um aumento nos animais tratados com a proteína e com o peptídeo (FIGURA 17C). Na análise das células do sistema inato foi observado que o tratamento diminuiu da frequência tanto nas DCs totais quanto nos macrófagos (FIGURA 17D). No linfonodo drenante o tratamento com as proteínas induziu uma diminuição das células  $T_{regs}$  (FIGURA 17E), esse resultado similar ao observado no modelo de melanoma.



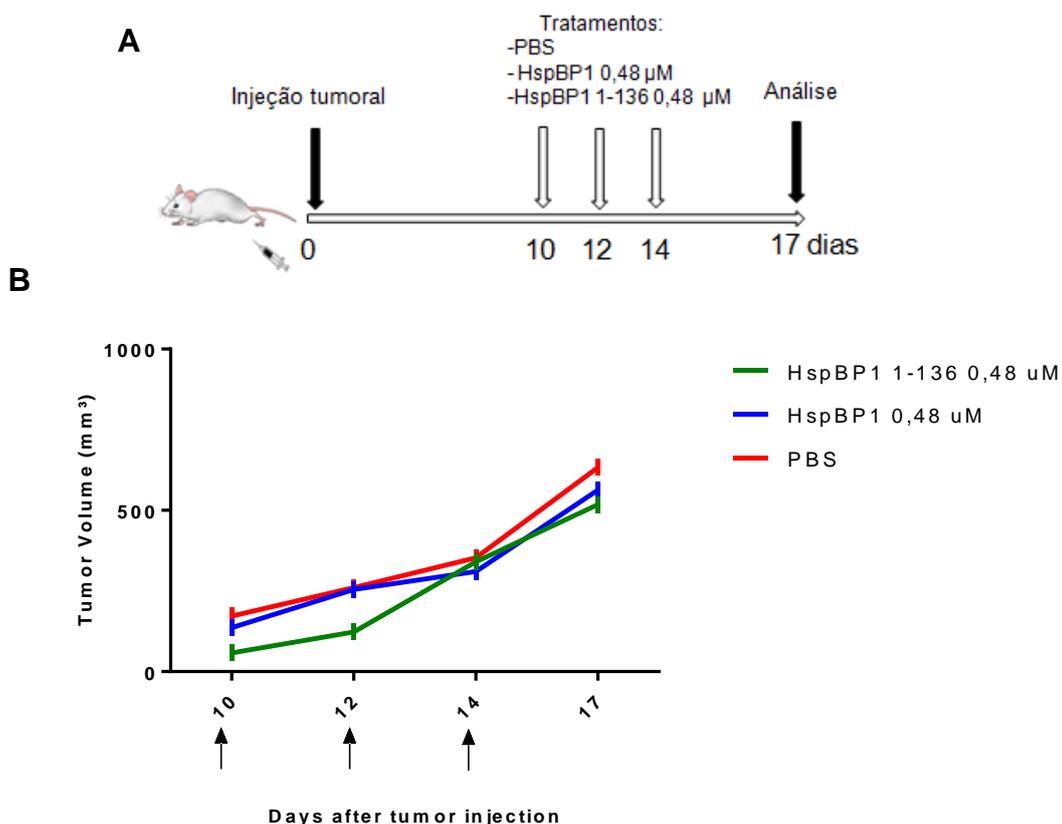


**Figura 17.** Análise do perfil imunológico no tumor e no linfonodo drenante após três doses de HspBP1 e do peptídeo 1-136, em animais BALB/c no modelo de câncer de mama. A – Desenho experimental; B – Volume do tumor,  $p=0,70$ ; C- Células T do tumor: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de células CD8+ e células CD4+FoxP3+; D- Células do sistema inato do tumor: células dendríticas CD11c+, macrófagos CD11b+F4/80+. E – Células T do linfonodo drenante: CD4+, proliferação de células CD4+, CD8+, proliferação de

células CD8<sup>+</sup> e células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Resultados (média  $\pm$  SD, n = 5 por grupo) estão representados em gráficos de barras. A significância de diferença entre os grupos é mostrada como \*p<0.05, \*\*p<0.01 e \*\*\*p<0.001.

Pelos resultados da citometria de fluxo observamos modulação nas células do sistema imunológico, tanto no inato quanto no adaptativo, após o tratamento com a proteína e o peptídeo. Dessa forma, decidimos avaliar se o efeito antitumoral observado nos animais era dependente das células do sistema adaptativo, como previamente observado no modelo de melanoma.

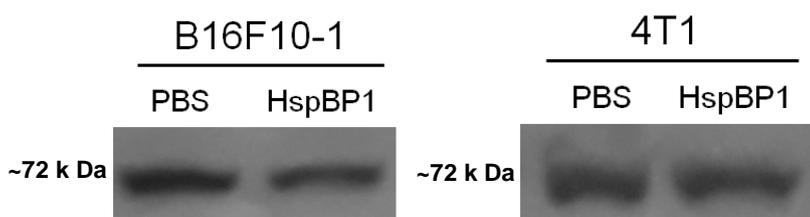
Tratamos os animais NSG com a proteína inteira e o peptídeo na concentração de 0,48  $\mu$ M nos dias 10, 12 e 14. No dia 17 foi realizada a última análise do volume tumoral. O tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136 não mostrou diferença no volume do tumor comparando com os animais tratados com PBS sugerindo assim, a necessidade da presença do sistema imunológico adaptativo para o efeito antitumoral da HspBP1 tanto no modelo de melanoma quanto no modelo de câncer de mama.



**Figura 18:** Avaliação do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo em modelo de câncer de mama. 1-136 em animais Nod-scid IL2rgnull (NSG). A - Desenho experimental; B- Volume do Tumor, p=1.0.

### 5.8 Western Blot HSP70

Após a avaliação das mudanças e da confirmação da necessidade do sistema imunológico adaptativo nos animais tratados com a HspBP1 para haver o efeito antitumoral, avaliamos se o tratamento com a proteína alterava a expressão de HSP70 no tumor dos animais. Observamos que o tratamento com a HspBP1 no modelo de melanoma induziu uma redução de 1.48 vezes da expressão de HSP70. Já no modelo de câncer de mama o tratamento não houve alteração na expressão da HSP70.



**Figura 19.** Análise da expressão de HSP70 nos extratos proteicos dos tumores tratados com a proteína HspBP1 e com PBS, realizado por Western Blot. A – Modelo de melanoma, transplantado com células B16F10; B – Modelo de câncer de mama, transplantado com células 4T1

Esse resultado demonstra que o efeito antitumoral com o tratamento utilizando a HspBP1 talvez não seja diretamente através da modulação da HSP70 nas células tumorais, e sim através da modulação do sistema imunológico, especificamente das células T do sistema imunológico adaptativo. No entanto, é necessário realizar outras análises para confirmar essa conclusão.

# Capítulo 3

## Artigo Científico

Artigo científico submetido ao periódico Cell Biology International intitulado “HSP70 expression and subcellular localization differs among tumor cell lines *in vitro*, *in vivo* and upon heat shock”

13-Feb-2019

Dear Ms. Lima:

Your manuscript entitled "HSP70 expression and subcellular localization differs among tumor cell lines in vitro, in vivo and upon heat shock" by Lima, Karina; Scomazzon, Sofia; Gassen, Rodrigo; De Souza, Ana Paula; Bonorino, Cristina, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Cell Biology International.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is CBIN.20190124.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail

address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin>.

Thank you for submitting your manuscript to Cell Biology International.

Sincerely,

Cell Biology International Editorial Office

[automatic email - ref: SE-6-a]

**HSP70 expression and subcellular localization differs among tumor cell lines *in vitro*, *in vivo* and upon heat shock**

Karina Rodrigues Lima<sup>a,b</sup> & Sofia Pizzato Scomazzon<sup>a</sup>, Rodrigo Benedetti Gassen<sup>a</sup>, Ana Paula Duarte de Souza<sup>c</sup>, Cristina Bonorino<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, School of Science of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology, School of Science of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, School of Medicine of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS)

<sup>d</sup> Laboratory of Immunotherapy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

**Corresponding Author:**

Cristina Bonorino

R. Sarmiento Leite, 245 – Centro Histórico. Postgraduate Program in Biosciences

Porto Alegre,RS – Brazil – 90050-170

Phone: (+55) 51-3303-8801

E-mail: [cristinabcb@ufcspa.edu.br](mailto:cristinabcb@ufcspa.edu.br)

## Abstract

Heat shock proteins (Hsps) are a powerful system of cytoprotective proteins that are induced upon an increase in temperature, as well as other cell stresses. Hsps act as molecular chaperones, binding to unfolded proteins and helping prevent protein denaturation. Some Hsps have signaling properties, forming complexes with other proteins and controlling the transcription of oncogenic pathway. More recently, Hsps have been shown to possess extracellular properties, localizing to cell membranes and being secreted in exosomes. Contrarily to normal cells that only express Hsps when stressed, cancer typically present a high expression of Hsps in different cellular compartments, including the nucleus, the cytosol and the plasma membrane, and this expression promotes tumor invasiveness and survival, sometimes positively correlating with poor prognosis. In this study, we focused on Hsp70, the most abundant and highly conserved Hsp. We comparatively analyzed the expression of HSP70 in different tumor cell lines when submitted to a heat shock protocol and compared it to the expression upon tumor transplantation to hosts, *in vivo*. B16F10-1, 4T1, MCF-7, MDA-MB-231, LL/2, A549, H292 and C33-A cell lines were submitted to a standard heat shock protocol. Almost all the cell lines upregulated the expression of Hsp70 after heat shock, however some of those showed a basal expression of this protein in control conditions. Upon transplantation to hosts, B16F10-1, 4T1 and LL/2 cells showed an increase in Hsp70 expression compared to what was observed *in vitro*. Analysis by flow cytometry allowed us to observe an increase of intracellular Hsp70 expression after heat shock, in some cell lines, but not on the cell surface. Confocal microscopy revealed that subcellular localization of Hsp70 varies greatly between tumor cell lines, especially after heat shock. We conclude that heat shock, as expected, induces an increase in Hsp70 expression, however, the mechanism of protection of Hsp70 on this stress might differ among cell lines.

**Key words:** HSP70, heat shock, cell stress, western blot, immunofluorescence, cytoplasmic and membrane expression

## Introduction

Cancer is one of the greatest causes of death in the world, with an estimate of 12.7 million cases worldwide. According to the World Health Organization (WHO), an increase of up to 21 million cases is expected by 2030 (WHO, 2019). Breast cancer, melanoma and lung cancer are the most frequently diagnosed cancers, with lung cancer leading the numbers of cancer incidence and mortality worldwide (Bray *et al.*, 2018). Today, the main treatments are the use of chemotherapy, radiotherapy, surgical removal of the tumor and, most recently, immunotherapy. Despite major advances, the current approach to face cancer treatments is still not fully effective in some cancer types (Zugazagoitia *et al.*, 2016). The target of single molecular abnormalities or cancer pathways has achieved good clinical responses and the knowledge of others possible targets is a great interest.

Heat shock proteins with a molecular weight of 70 kDa (HSP70) are a cytoprotective molecular chaperone family, evolutionarily conserved from bacteria to humans, working in reversing or inhibiting denaturation and unfolding of cellular proteins in response to a variety of stressor stimuli (Kampinga *et al.*, 2009). Elevated levels of HSP70 have been reported in a great number of tumors including breast, lung, cervical, prostate and renal comparing to normal tissue (Jagadish *et al.*, 2016; Grag *et al.*, 2010; So *et al.*, 2007; Ramp *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2017). Hsp70 is a potent cell death inhibitor; antisense RNA mediated selective inhibition of Hsp70 leads to death of tumor cells, but not of normal fibroblasts (Nylandsted *et al.*, 2000). Hsp70 binds to and inhibits different key molecules to prevent apoptosis (Beere *et al.*, 2000, Pang *et al.*, 2001). Nevertheless, aside from its chaperoning functions, Hsp70 has also signaling and extracellular functions. Chaperone properties of Hsp70 are regulated by association with co-chaperones, preventing associations that result in toxic aggregation. Signaling properties of Hsp70, more recently described, are pivotal in oncogenic pathways (Meng *et al.*, 2011) and necessary for stemness and metastasis (Gong *et al.*, 2015). Hsp70 oncogenic signaling is mostly regulated by complexing with BAG-3 (Colvin *et al.*, 2014). Hsp70-BAG-3 complexes mediate signaling through a range of pathways, most notably *Src* (Meriin *et al.*, 2018). Consistent with all these findings, Hsp70 is increased in

tumors, and associated with resistance to chemotherapy (Yang *et al.*, 2012), thus constituting a major target for cancer treatment. Furthermore, Hsp70 has been shown to be important not only in tumor cells for their survival, but also in stromal cells that support tumor growth *in vivo* (Gabai *et al.*, 2016). Strategies based on the use of Hsp70 inhibitors in oncology have been actively pursued but given Hsp70's pleiotropic roles on tumor progression, this can present a considerable challenge (Goloudina *et al.*, 2012).

The information collected by all the studies cited above has been produced in studies each focusing on different tumors and cell lines, however these properties are usually referred to as common among all types of tumors. In this study, we comparatively investigated expression and subcellular localization of Hsp70 in different tumor types, *in vivo* and *in vitro*, as well as in response to heat shock.

## **Methods**

### *Cell Lines and Heat Shock Protocol*

Cancer cell lines derived from murine melanoma (B16F10 – ATCC CRL-6475), mice breast carcinoma (4T1 – ATCC CRL-2539), human breast carcinomas (MCF-7 – ATCC HTB-22 - and MDA-MB-231 – ATCC HTB-26), mice lung carcinoma (LL/2 – ATCC CRL-1642), human lung carcinomas (A549 – ATCC CCL-185 - and H292 – ATCC CRL-1848) and human cervix carcinoma (C33-A – ATCC HTB-31) were used. All cell lines were cultured under standard conditions (humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) in its specific culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. For heating procedures, cells were subjected to heat shock at 43 °C for 40 minutes in precision water bath, with 4 hours of recovery at 37 °C.

### *Mice*

C57BL/6 and BALB/c mice were obtained from Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CEMBE PUCRS-Brazil). Six to eight-week-old

female animals weighing 15-20 g were used for experiments and were housed at the CEMBE animal facility with water and food *ad libitum*. All animal procedures were performed in accordance to protocols approved by the PUCRS University's Ethics Committee, under protocol ID CEUA 8466.

#### *In vivo tumor injection*

B16F10, LL/2, and 4T1 cells were trypsinized, and viable cells were counted by trypan blue dye exclusion. For tumor inoculation,  $1 \times 10^5$  live cells were suspended in 100  $\mu$ L of phosphate buffered saline (PBS). B16F10 and LL/2 cells were injected subcutaneously into the left flank regions of C57BL/6 mice. 4T1 cells were injected in the third mammary fat pad of BALB/c mice.

#### *Sodium Carbonate Extraction for membrane/cytoplasm separation*

The cells were lysed in 100 mM sodium carbonate by four freeze-thaw cycles and ultracentrifuged for 1h at 195,000 X g at 4 °C as described (Okamoto et al., 2001). The supernatant was concentrated with Amicon® Ultra-4 (30-kDa cut-off, Millipore). The pellet was resuspended in RIPA buffer to obtain membrane protein fraction.

#### *Western Blot*

Cell lines and tumors were lysed in protein extraction buffer (Tris-HCl pH 7.5, EDTA 0,5 M pH 8, MgCl<sub>2</sub>, PMSF 100 mM,  $\beta$ -Mercaptoethanol, glycerol) containing a protease inhibitor cocktail. After that, equal amounts of proteins (20  $\mu$ g) were separated by electrophoresis in 10% gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS), and subsequently electrotransferred onto nitrocellulose membrane. After the blocking step (1-hour incubation in PBS containing 5% fat-free dry milk), blots were probed with a primary HSP70 or with a HSP70 biotin antibody (Clone C92F3A-5, Enzo Life Sciences) diluted in PBS with 0.05% tween-20. All the immunoreactive bands on blots were developed using Streptavidin- peroxidase conjugated or anti-mouse-HRP secondary antibodies

and the enhanced chemiluminescence was revealed with Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Quantification of the bands was performed using ImageJ (NIH).

### *Immunofluorescence Staining*

Cells grown on cover-slips were fixed with 4% paraformaldehyde. After the blocking step (1-hour incubation in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA), cell preparations were treated with an Hsp70-biotin antibody (1:100, C92F3A-5 – Enzo Life Sciences) diluted in the blocking buffer. After a triple washing with PBS, the cell preparations were stained with the Streptavidin-FITC (554060 – BD Biosciences) secondary antibody. For nucleus staining, Hoechst (1:5000) were used. The fluorescence patterns were analyzed on a confocal microscope (Zeiss).

### *Flow Cytometry*

Fluorochrome-conjugated antibody used to verify expression of HSP70 intracellular and in the membrane, by flow cytometry, was HSP70-biotin as previously described. Cell lines were Fc blocked for 20 minutes on ice, and then surface markers were stained by incubation for 30 minutes. The intracellular staining was performed with Fixation/Permeabilization Kit (eBioscience). Streptavidin-FITC (554060 – BD Biosciences), as secondary antibody, was incubated for 30 minutes. Samples were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, USA). Data analysis was performed using FlowJo software (version 7.5, Tree Star Inc., Ashland, US), and graphs were made using GraphPad Prism 5 software (Graphpad Software Inc.).

## Results

### **HSP70 expression varies among different tumor cell lines *in vitro* and *in vivo***

We first analyzed by western blot the basal and induced expression of Hsp70 in seven different cell lines. For heat shock, cells were incubated in a water bath at 43 °C for 40 minutes. Followingly, they were transferred to an incubator at 37°C for 4 hours for recovery. Control samples were kept at 37 °C in the CO<sub>2</sub> incubator for the same time. Cell lines of human breast MCF-7 and MDA-MB-231, lung A549 and cervix carcinoma C33-A already express Hsp70 at 37 °C (Figure 1). However, after heat shock, the expression of Hsp70 increases in all cell lines, even in the ones in which we could not observe expression at 37 °C. As expected, all cell lines showed an increase in Hsp70 expression upon heat shock. Interestingly, MCF-7, MDA-231, A549 and C33-A express Hsp70 already at the control 37 °C conditions.

We next asked if we could observe the expression of Hsp70 *in vivo*, using whole protein extract of tumor masses and compare it to the same cell lines, in control and heat shock conditions. For the *in vivo* models of melanoma and lung cancer, cells were transplanted to syngeneic C57B6/2 mice, and for breast cancer model cells were transplanted to syngeneic BALB/c mice. After 17 days of tumor injection the tumor was excised, and the protein extract was analyzed by western blot. We observed an increase of 2.5-fold in B16F10-1 and 4T1 models and 1.47-fold in LL/2 model in the expression of Hsp70, comparing to the *in vitro* heat shocked samples (Figure 2). These results probably represent a response to common stresses faced by tumors growing *in vivo*, especially transplanted tumors, facing a shortage of nutrients and oxygen, as well as immune responses.

### **Changes in membrane-associated HSP70 after heat shock**

The search for tumor cell markers revealed that the Hsp70 is frequently expressed on the plasma membrane of primary tumor cells and distant metastases (Yu et al., 2013). Membrane-associated Hsp70 has been identified on a large variety of primary tumor types such breast, lung, head and neck,

colorectal, pancreas, brain, but not in corresponding normal cells and tissues (Hantschel et al., 2000; Pfister et al., 2007). In tumor cells, membrane Hsp70 is associated with aggressiveness and therapy resistance (WU et al., 2017; Yang et al., 2012). We next asked if the expression of membrane-associated Hsp70 would change upon heat shock. B16F10 and 4T1 cell lines were submitted to heat shock and control cells were kept 37 °C. Afterwards, cells were washed with PBS and NaCl 100 mM and then lysed in 100 mM of sodium carbonate following ultracentrifugation to obtain the membrane-free and membrane-associated fractions. (Figure 3). In the membrane-free fraction, it was possible to observe that with the heat shock cells increased the expression of Hsp70 compared with the control cells. However, in the membrane-associated fraction the opposite was observed, cells submitted to the heat shock protocol showed a decrease of the Hsp70 expression compared with the control cells.

#### **HSP70 expression in the plasma membrane can be detected by flow cytometry:**

The membrane associated fractions analyzed in the previous section included all cell (ER, mitochondrial, and plasma) membranes. We thus attempted to detect the presence of Hsp70 on the plasma membrane of the cell lines both in control (37 °C) and heat shock conditions by flow cytometry. First, the cells were grown and submitted to the heat shock protocol and after that, the cells were trypsinized and  $1 \times 10^6$  was plated in a 96 wells plate. The cells were stained with a viability dye to select only live cells, and then were stained with a HSP70-biotin antibody followed by staining with a Streptavidin-FITC as a secondary antibody. We used an IgG1  $\lambda$  isotype control to eliminate any background signal from the antibody. In B16F10 and 4T1 cell lines, we could detect Hsp70 in the surface of the cells, however we did not observe any significant difference with the induction by heat shock. In MDA-MB-231, LL/2 and A549 cells, we did not detect Hsp70 on the surface (Figure 4). We then decided to investigate if permeabilization would allow us to detect intracellular changes in Hsp70 expression upon heat shock. The cells were permeabilized and stained for intracellular Hsp70. In both cell lines, intracellular Hsp70 was detected; but only in the B16F10 cells the heat shock could we observe an

increase in Hsp70 expression by this methodology (Figure 5). This result corroborated what was observed in western blots, previously described, confirming that heat stress can increase the expression of intracellular, but not plasma membrane, Hsp70.

### **Hsp70 localization differs among cell in control as well as heat shock conditions:**

Although Hsp70 is an intracellular protein, it can be found in other cell compartments. Hsp70 has been reported in plasma membrane, extracellular medium and extracellular vesicles (Gehrmann et al., 2011; Broquet et al., 2003; Boudesco et al., 2018). In HeLa cells, translocation of Hsp70 from the cytoplasm to the nucleus after a heat stress was previously observed (Haddad et al., 2008; Neri et al., 1995). We attempted to determine if HSP70 would change its localization upon heat shock. For this analysis we used confocal microscopy (Figure 6). 4T1, A549, B16F10, LL/2 and MDA-MB-231 were grown on coverslips and submitted to the heat shock protocol previously described. Followingly, cells were fixed and analyzed by confocal microscopy. It was possible to observe differences between the cell lines in relation to the location of Hsp70 after heat stress. B16F10 cells showed a translocation of the cytoplasmic Hsp70 to the nucleus after the heat shock. In the 4T1 cells, there was no change after heat shock and Hsp70 remained largely cytoplasmic. MDA-MB-231 cells after heat shock presented alterations in the cellular morphology, a translocation of Hsp70 to the nucleus and an increase in the intensity in the cytoplasm. LL/2 cells did not present changes regarding the location of Hsp70; however, heat shock increased the size of the cells. Finally, in A549 cells the heat shock did not affect Hsp70 location, detectable in both cytoplasm and nucleus. These results show that Hsp70 may have different functions in each cell line after the heat shock.

### **Discussion**

Mapping Hsp70 expression is of great interest since Hsp70 can be located in the plasma membrane of cancer cells and had been suggested as a

biomarker (Hantschel et al., 2000). A good method to induce the expression of Hsp70 is by a heat shock protocol, a widely and well-known method used in literature (Song et al., 2014; Dressel et al., 2000). In this work, we analyze the expression of Hsp70 in tumor cell lines and tumor masses *in vivo*, as well as its location after the heat shock protocol.

In all the cell lines, as expected (Rossi et al., 2006; Andreeva et al., 2016; Rossi et al., 2014; Rossi et al., 2010), we could observe that with heat shock the expression of Hsp70 was increased. When the tumor masses of transplantation hosts were analyzed and compared with the cells induced by the heat shock, we observed that the tumor microenvironment induced an increase in Hsp70 expression of 2,5-fold for B16F10 and 4T1 models and 1,47-fold for LL/2. This happens because solid tumors are characterized by several other stress like nutrient deprivation, low pH, hypoxia and imbalance between production and removal of reactive oxygen species (Giampietri et al., 2015). The tumor microenvironment contributes for a higher expression of Hsp70 which, because of its cytoprotective functions, promotes an increase in tumor volume (by increasing the cancer survival) and induces resistance to chemotherapy (Gabai et al., 2016).

To further evaluate the presence of Hsp70 on the membrane of the cell lines, we performed a separation of membrane and cytoplasmic content. In the cytoplasm, the heat shock stress induces an increase in the expression of Hsp70, more in the B16F10 than in the 4T1 cell line, this result corroborate with the others results observed in this work. Surprisingly, in the membrane content, we observed the opposite, the heat shock reduces the expression of Hsp70 in both cell lines. Analysis by flow cytometry was not able to identify expression of Hsp70 in the cell surface, not even with the heat shock. This result can be a consequence of a few quantity of Hsp70 in the membrane of the cells. However, in the intracellular labelling, we observed an increase of the expression of Hsp70 with the heat shock protocol, similar result to that observed in the western blots. Perhaps the stress by heat is not enough to induce a transport of Hsp70 to the membrane, instead of what is shown in the literature that in primary tumor and cell lines treated with some types of drugs it was able to

observe expression of Hsp70 on the membrane (Breuninger et al., 2018; Farkas et al., 2003; Fucikova et al., 2011).

Results in HeLa cervical carcinoma cells in a stress of 42 °C for 1 hour observed an increase in the Hsp70 expression and translocation of Hsp70 from the cytoplasm to the nucleus (Neri *et al.*, 1995). In a clonal derivative of the parent HeLa cell line, the HeLa S3, in which under control conditions Hsp70 is distributed diffusely in the nucleus, including the nucleoli, and being found at reduced levels in the cytoplasm. After a mild heat shock of 42 °C for 90 minutes, the Hsp70 location became exclusively nuclear with a more prominent staining on the nucleoli. It was also possible to observe changes in the cell morphology in which the cells became rounder and the volume ratio of nucleus to cytoplasm was increased after a severe heat shock (Haddad *et al.*, 2008). Alastalo *et al* observed that HSF1, the transcription factor of Hsp70, under normal conditions is found in the cytosol and in the nucleus, whereas Hsp70 was found mostly in the cytosol. Upon heat shock of less than 1 hour, the increasing intensity and size of stress granules coincided with the ongoing translocation of Hsp70 into the nucleoli (Alastalo *et al.*, 2003). The significance of this rapidly translocation from the cytosol to the nucleus upon heat shock is poorly understood. Here, we show the process of subcellular translocation of Hsp70 in five other cell lines. It was observed that each cell line behaves differently with the heat shock protocol, similar to the results observed in the western blot. It was possible to observe cytoplasmic and nuclear localization of the HSP70. The 4T1 cell line was not able to increase the expression of HSP70 with the heat shock and did not present changes in the subcellular location and morphology. Otherwise, in the MDA-MB-231 cell line, the heat shock induced changes in the location of Hsp70, with a translocation to the nucleus, in the cell structure and an increase in intensity of Hsp70 in the cytoplasm.

Some years ago, it was proposed and published that Hsp70 mainly accumulated along with denatured substrates in the nucleus and nucleoli, being placed where Hsp70 chaperoning activity is performed during recovery of stressed cells in their normal growth temperature (Nollen *et al.*, 2001). This movement of Hsp70 in and out of the nucleus has been proposed to be associated with repair of heat-induced nucleolar damage (Pelham, 1984).

Knowlton demonstrate that the amino acids sequence 566-572 (KKKVLDK) is important for nuclear accumulation of Hsp70 in response to heat shock, and mutation in this sequence inhibited the increase in the nucleus (Knowlton, 2001). Some works correlate this translocation to the nucleus and nucleoli in order to regulate pathways involved in nucleoplasmic or ribosomal DNA quality and, moreover, in nucleolar integrity (Dastoor *et al.*, 2000; Nollen *et al.*, 2001). Protein-protein interactions between Hsp70 and PARP-1 facilitate the DNA repair molecules, accelerating the ability to compose molecular machines whose functioning leads to high-quality DNA, indicating that Hsp70 translocate to the nucleus and nucleolus during S-phase or during a heat shock, in order to participate in pathways involving the integrity and the accuracy of the DNA molecules (Kotoglou *et al.*, 2009). The results obtained in this work corroborate with those described. Indicating that, after a heat shock process Hsp70 goes to the nucleus, not to the plasma membrane, to have protective functions.

As mentioned before, the stress by heat is widely used to induce the expression of HSP70 but it is not the same stress caused by the tumor microenvironment, acting in different ways. Altogether, these results show that different cell lines have a basal expression of HSP70, in different quantities, in which the heat shock can stimulates the increase. However, this increase in protein expression is not as intense as in the tumor microenvironment, and the heat shock induces changes in subcellular locations and cell morphology. These changes may be related to a protective effect of DNA quality and nuclear integrity. However, more studies are needed to evaluate the differences between cell lines in relation to localization, translocation and expression of Hsp70 since in some cell lines, we did not observe difference after the heat shock.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from Brazilian grant agencies CAPES and FINEP [01.13.0429]. We are grateful for the expert technical help of Solon da Rosa, Michelle Viegas, and Rodrigo Dornelles.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Alastalo T.P, Hellesuo M, Sandqvist A, Hietakangas V, Kallio M, Sistonen L (2003). Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of Hsp70. *J Cell Sci.* 116(Pt 170): 3557-3570. <https://doi.org/10.1242/jcs.00671>
- Andreeva NV, Zatsepina O, Garbuz DG, Evgen'ev MB, Belyavsky A (2016). Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells. *Cell Stress Chaperones.* 21(4):727-733. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0691-7>
- Beere H.M, WOLF, B.B, CAIN K, MOSSER D.D, MAHBOUBI A, KUWANA T, TAILOR P, MORIMOTO R.I, COHEN G.M, GREEN, D.R (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2(8):469-475. <https://doi.org/10.1038/35019501>
- Boudesco C, Cause S, Jego, Garrido C (2018). Hsp70: A cancer Target Inside and Outside the Cell. *Methods Mol Biol.* 1709:371-396. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7477-1_27)
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistic 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breuninger S, Strangl S, Werner C, Sievert W, Lobinger D, Foulds G.A, Wagner S, Pickhard A, Piontek G, Kokowski K, Pockley A.G, Multhoff G (2018). Membrane Hsp70-A novel target for the isolation of circulating tumor cells after epithelial-to-mesenchymal transition. *Front Oncol.* 8:497. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00497>
- Broquet A.H, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M (2003). Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlated with its membrane delivery and release. *J Biol Chem.* 278(24):21601-21606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302326200>

Chatterjee S, Burns T (2016). Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci.* 18(9):1978. <https://doi.org/10.3390/ijms18091978>

Colvin T.A, Gabai V.L, Gong J, Calderwood SK, Li H, Gummuluru S, Matchuk O.N, Smirnova S.G, Orlova, N.V, Zamulaeva I.A, Garcia-Marcos M, Li X, Young Z.T, Rauch J.N, Gestwicki J.E, Takayama S, Sherman M.Y 2014. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res.* 74(17):4731-4740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0747>

Dastoor Z, Drever J (2000). Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *J Cell Sci.* (Pt 16):2845-2854

Dressel R, Elsner L, Quentin T, Walter L, Gunther E (2000). Heat Shock protein 70 is able to prevent heat shock-induced resistance of target cells to CTL. *J Immunol.* 164(5):2362-2371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2362>

Farkas B, Hantschel M, Magyarlaki M, Becker B, Scherer K, Landthaler M, Pfister K, Gehrmann M, Gross C, Mackensen A, Multohff G (2003). Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 13(2):147-152. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000056221.78713.57>

Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, Spisek R (2011). Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* 71(14):4821-4833. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0950>

Gabai V.L, Yaglom J.A, Yongmwei W, Meng L, Shao H, Kim G, Colvin T, Gestwicki J, Sherman M.Y (2016). Anti-cancer effects of targeting Hsp70 in tumor stromal cells. *Cancer Res.* 76(20):5926-5932. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0800>

Gehrmann M, Liebisch G, Schmitz G, Anderson R, Steinem C, De Maio A, Pockley G, Multohff G. (2011). Tumor-Specific Hsp70 Plasma Membrane Localization is Enabled by the Glycosphingolipid Gb3. *Plos One.* 3(4):e1925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001925>

Giampietri C, Petrunaro S, Conti S, Facchiano A, Filippini A, Ziparo E (2015). Cancer microenvironment and endoplasmic reticulum stress response. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2015/417281>

Goloudina A.R, Demidov O.N, Garrido C 2012. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. /Cancer Lett. 325(2):117-124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.003>

Gong J, Weng D, Eguchi T, Murshid A, Sherman M.Y, Song B, Calderwood S.K 2015. Targeting the hsp70 gene delays mammary tumor initiation and inhibits tumor cell metastasis. *Oncogene*. 34(43):5460-5471. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.1>

Grag M, Kanoja D, Saini S, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010). Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells. 116916):3785-96. <https://doi.org/10.1002/cncr.25218>

Haddad N, Paulin-Levasseur M (2008). Effects of heat shock on the distribution and expression levels of nuclear proteins in Hela S3 cells. *J Cell Biochem*. 105(6):1485-1500. <https://doi.org/10.1002/jcb.21968>

Hantschel M, Pfister K, Jordan A, Scholz R, Andreesen R, Schimitz G, Schmetzer H, Hiddemann W, Multhoff G (2000). Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemia patients. *Cell Stress Chaperones*. 5(5):438-442.

Jagadish N, Agarwal S, Gupta N, Fatima R, Devi S, Kumar V, Suri V, Rajive K, Suri V, Sadasukhi TC, Gupta A, Ansari AS, Lohiya N, Suri A (2016). Heat Shock protein 70-2 (HSP70-2) overexpression in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 35:150. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0425-9>

Kampina H.H, Hageman J, Vos M.J, Kubota H, Tanguay R.M, Bruford E.A, Cheetham M.E, Chen, B, Hightower L.E (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 14(1):105-111. [https://doi.org/10,1007/s12192-008-0068-7](https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7)

Knowlton A.A (2001). Mutation of amino acids 56-572 (KKKVLDK) inhibits nuclear accumulation of heat shock protein 7 after heat shock. *J Moll Cell Cardiol*. 33(1):49-55. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1274>

Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis L.K, Dantzer F, Jung J.U, Angelidis C (2009). Hsp70 translocated to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cells Stress Chaperones*. 14(4):391-406. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0093-6>.

Kumar S, Stokes J, Singh UP, Scissum GK, Acharya A, Manne U, Mishra M (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* 374(1):156-166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>

Meng L, Hunt C, Yaglom J.A, Gabai V.L, Sherman M.Y 2011. Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene.* 30(25):2836-2845. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.5>

Meriin A.B, Marayanan A, Meng L, Alexandrov I, Varelas X, Cissé I.I, Sherman M.Y 2018. Hsp70-Bag3 complex is a hub for proteotoxicity-induced signaling that controls protein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 15(30):E7043-E7052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803130115>

Neri L.M, Riederer B.M, Marugg R.A, Capitani S, Martelli A.M (1995). Analysis by confocal microscopy of the behavior of heat shock protein 70 within the nucleus and of a nuclear matrix polypeptide during prolonged heat shock response in HeLa cells. *Exp Cell Res.* 221(2):301-310. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1379>

Nollen E.A, Salomons F,A, Brunsting J.F, van der Want J.J, Sibon O.C, Kamping H.H (2001). Dynamic changes in the localization of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(21):12038-12043. <https://doi.org/10.1073/pnas.201112398>

Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activated a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2 (2000). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97(14):7871-7876. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.17.7871>

Okamoto T, Schwab RB, Scherer P, Lisanti M (2001). Analysis of the association of proteins with membranes. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 5: Unit 5.4. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0101s05>

Pang Q, Keeble W, Christianson T.A, Faulkner G.R, Bagby G.C 2001. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 20(16):4478-4489. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4478>

Pelham H.R (1984) Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* 3(13):3095-3100.

Pfister K, Radons J, Busch R, Tidball J.G, Pfeifer M, Freitag L, Feldmann H.J, Milani V, Issels R, Multhoff G (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer.* 110(4):926-935. <https://doi.org/10.1002/cncr.22864>

Ramp U, Mohotka C, Heikaus S, Shibata T, Grimm MO, Willers R, Gabbert HE (2007). Expression of heat shock protein 70 in renal cell carcinoma and its relation to tumor progression. *Histol Histopathol.* 22(10):1099-1107. <https://doi.org/10.14670/HH-22.1099>

Rossi A, Ciafrè S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santora GM (2006). Tareting the Heat Shock Factor 1 by RNA interference: A potent tool on enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res.* 66(15):7678-7685. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4282>

Rossi A, Riccio A, Coccia M, Trotta, La Fazia S, Santoro GM (2014).The Proteasome Inhibitor Bortezomib is a potent induced of zinc finger AN1-type Domain 2a Gene expression. *J Biol Chem.* 289(18):12705-12715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513242>

Rossi A, Trotta E, Brandi R, Arisi I, Coccia M, Santoro GM (2010). AIRAP, a new Human Heat Shock Gene Regulated by Heat Shock Factor 1. *J Biol Chem.* 285(18):13607-13615. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M109.082693>

So A, Hadaschik B, Sowery R, Gleave M (2007). The Role of Stress Protein in Prostate Cancer. *Curr Genomic.* 8(4):252-261. <https://doi.org/10.3390/ijms18091978>

Song H.M, Mu X.D, Gu D.E, Luo D, Yang Y.X, Xu M, Luo J.R, Zhang J.E, Hu Y.G (2014). Molecular characteristics of the HSP70 gene and its differential expression in female and male golden Apple snails (*Pomacea canaliculata*) under temperature stimulation. *Cell Stress Chaperones.* 19(4):579-589. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0485-0>

Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W (2012). Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarion cancer cells. *Cancer Lett.* 321(2):137-143. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.030>

Yu M, Bardia A, Wittner B.S, Stott S.L, Smas M.E, Ting D.T, Isakoff S.J, Ciciliano J.C, Wells M.N, Shah A.M, Conconnon K.F, Donaldson M.C, Sequist L.V, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber D.A, Maheswaran S (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 339(6119):580-584. <https://doi.org/10.1126/science.1228522>

Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L (2016). Current Challenes in Cancer Treatment. *Clin Ther.* 38(7):1151-1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>

World Health Organization (WHO): <https://www.who.int/> Accessed: January/2019

Wu PS, Chang YH, Pan CC (2017). High expression of heat shock proteins and heat shock factor-1 distinguishes an aggressive subset of clear cell renal carcinoma. *Histopathology*. 71(5):711-718. <https://doi.org/10.1111/his.13284>

## Figure legends

### **Figure 1 Western blot of Hsp70 expression in cell lines after heat stress.**

Cell lines were submitted to the heat shock protocol: 43°C for 40 minutes followed by 4 hours in 37 °C, for recovery. Control cells were kept at 37 °C for the same time. Expression of HSP70 was evaluated using the anti-HSP70 monoclonal antibody clone C92F3A-5. Heat shock induced the expression of HSP70 in all cell lines.

**Figure 2 Western blot of Hsp70 expression in tumors *in vivo*.**  $1 \times 10^5$  cells of B16F10-1, LL/2 and 4T1 were transplanted to host mice and 17 days later tumors were excised to evaluate the expression of HSP70 with an anti-HSP70 biotin monoclonal antibody (Clone C92F3A-5), compared to their counterparts *in vitro*.

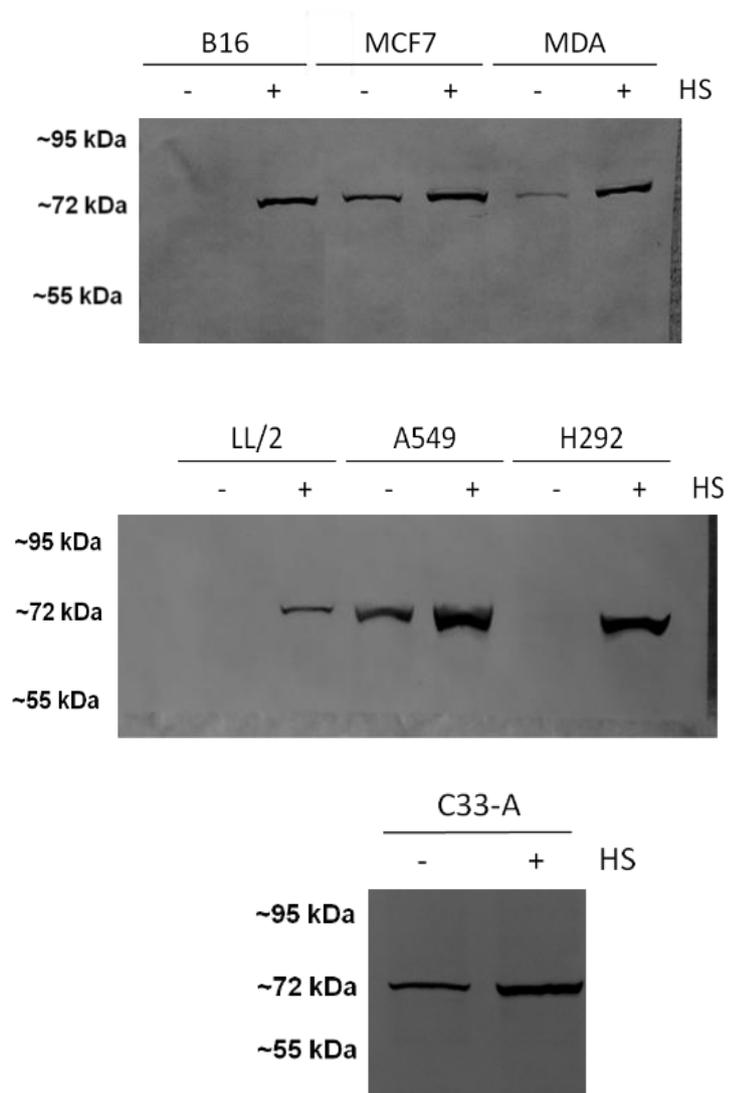
**Figure 3 Hsp70 under heat stress.** B16F10 and 4T1 cells were either submitted to the heat shock protocol or not followed by the fractionation to obtain the plasma membrane-associated or membrane-free content by ultracentrifugation. The levels of HSP70 were analyzed by Western blot using an anti-HSP70 biotin monoclonal antibody clone C92F3A-5.

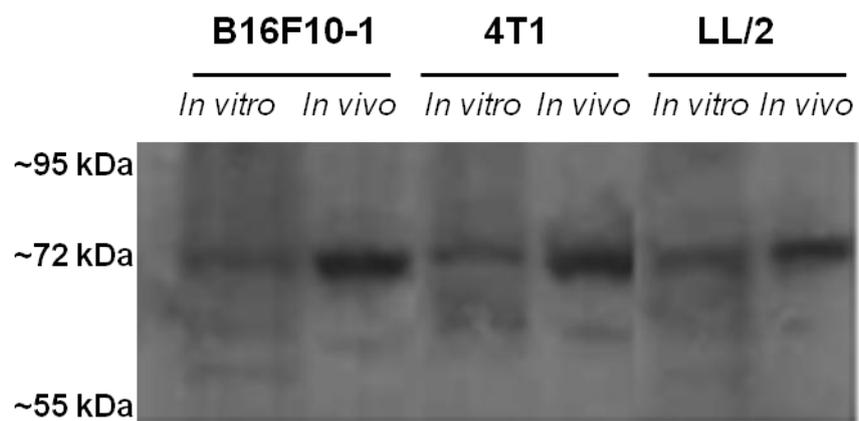
**Figure 4 Representative view of the Hsp70 surface expression.** B16F10, 4T1, MDA-MB-231, LL/2 and A549 cell lines were grown and submitted to the heat shock protocol. Cells without heat shock were in 37 °C for the same amount of time.  $1 \times 10^6$  cells were marked for HSP70 with an anti-HSP70 biotin and stained with a Streptoavidin-FITC. The IgG1 isotype-matched control is

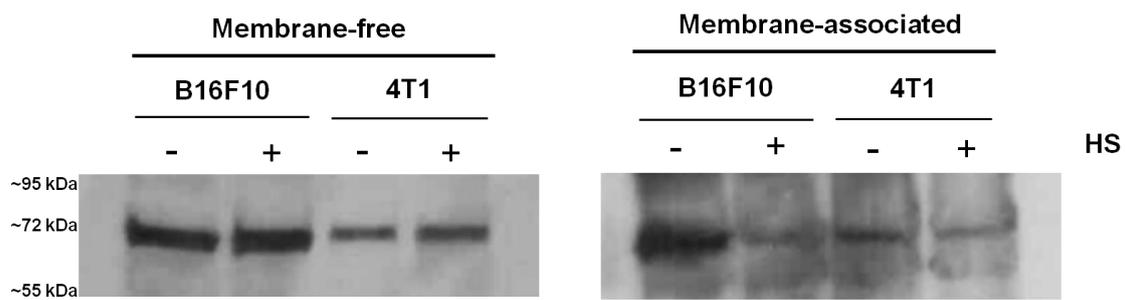
indicate in gray and membrane HSP70+ population is shown in black. The solid line indicates the control condition and the dotted line indicates the heat shock condition. Only viable (Viability dye) cells were gated and analyzed.

**Figure 5 Representative view of the Hsp70 intracellular expression by flow cytometry.** B16F10 and 4T1 cells were grown and submitted to the heat shock protocol. Cells without heat shock were in 37 °C for the same amount of time.  $1 \times 10^6$  were permeabilized and marked for HSP70 with an anti-HSP70 biotin and stained with a Streptoavidin-FITC. The IgG1 isotype-matched control is indicate in gray and membrane HSP70+ population is shown in black. The solid line indicates the control condition and the dotted line indicates the heat shock condition. Only viable (Viability dye) cells were gated and analyzed.

**Figure 6 Immunofluorescence for Hsp70 localization.** B16F10, 4T1, MDA-MB-231, LL/2 and A549 cell lines were grown in cover-slips and submitted to the heat shock protocol. Cells without heat shock were in 37 °C for the same amount of time. Cell were fixed, blocked and treated with an anti-HSP70 biotin (Clone C92F3A-5) and stained with the Streptavidin-FITC (green). For nucleus staining, Hoechst (1:5000) were used (blue).

**FIGURE 1**

**FIGURE 2**

**FIGURE 3**

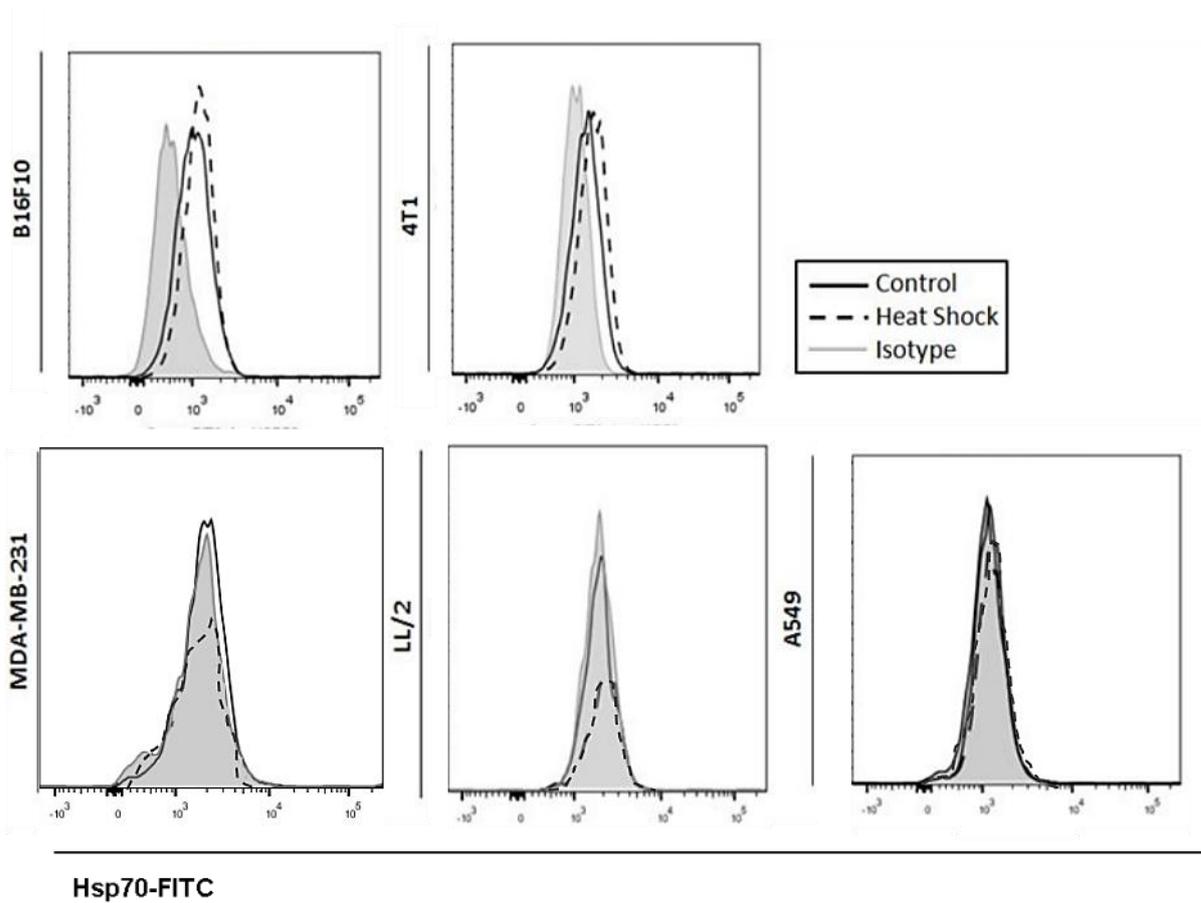


FIGURE 4

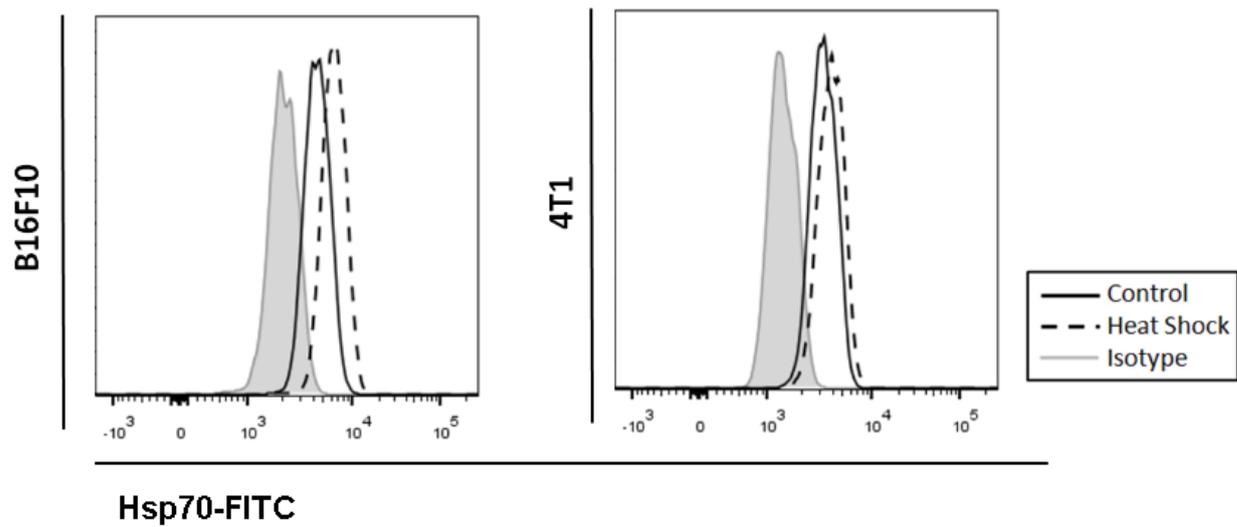
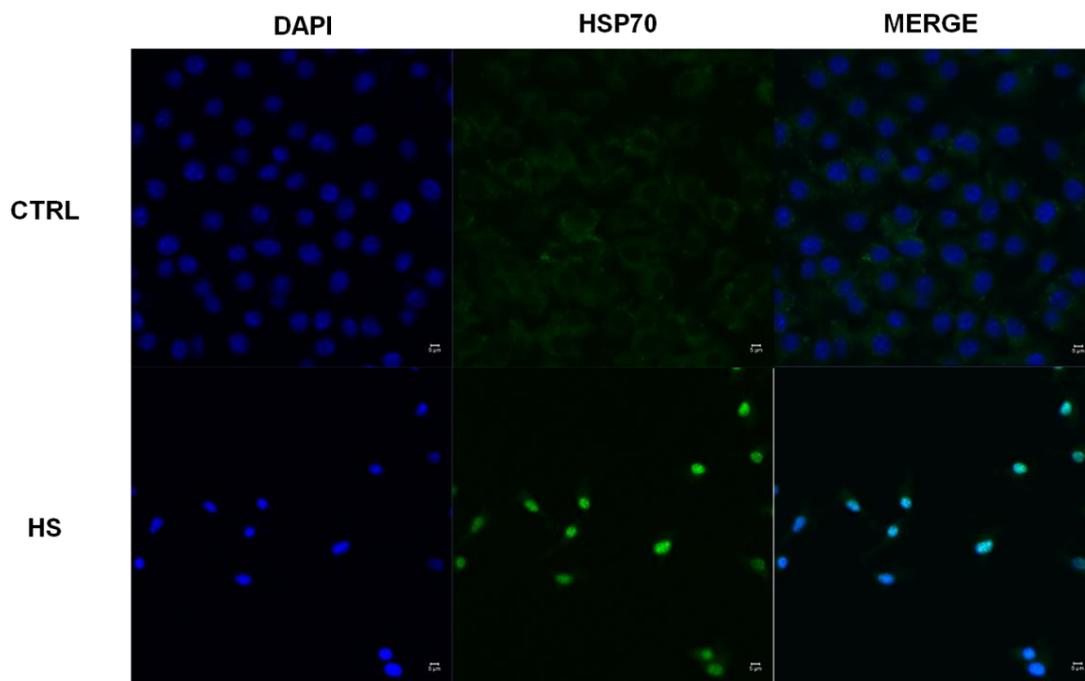
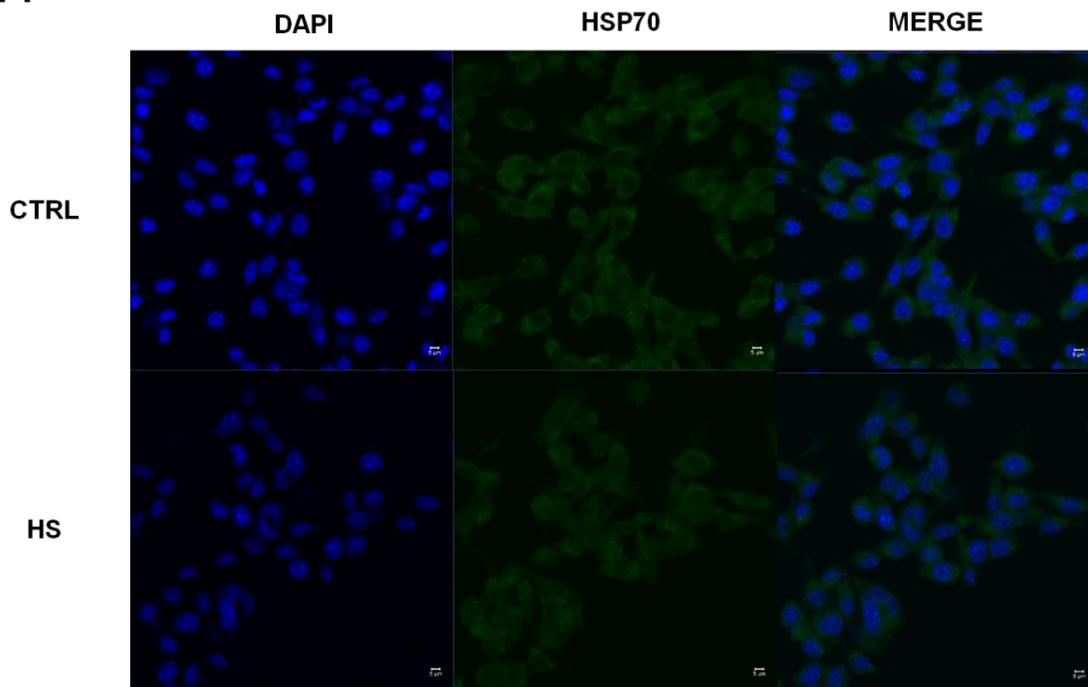
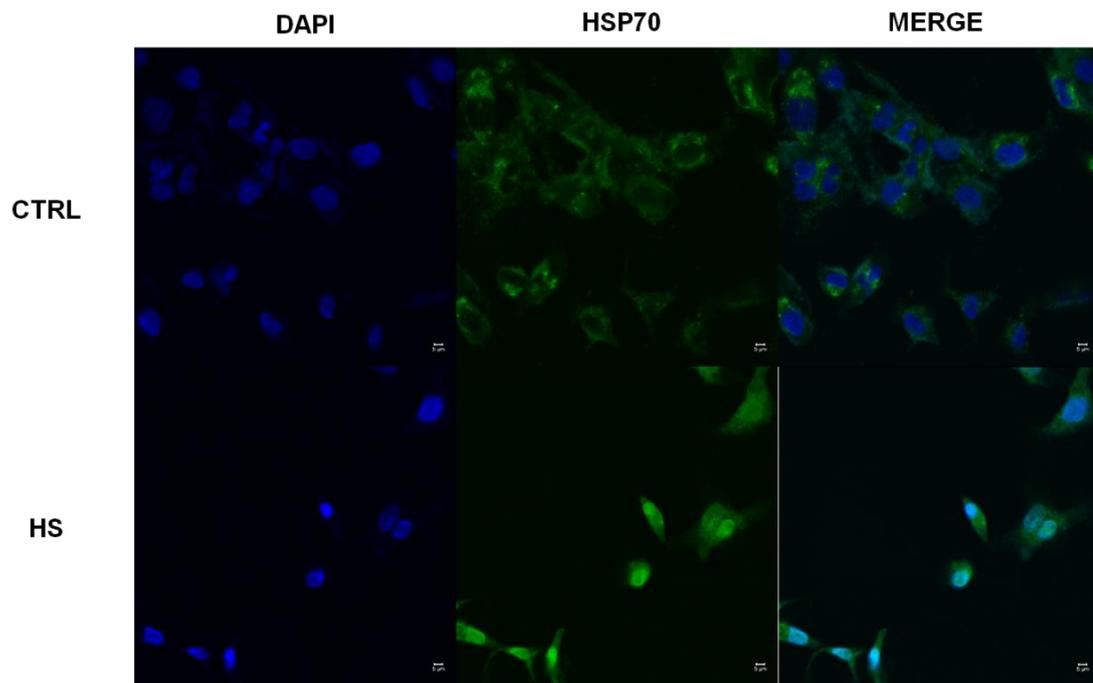
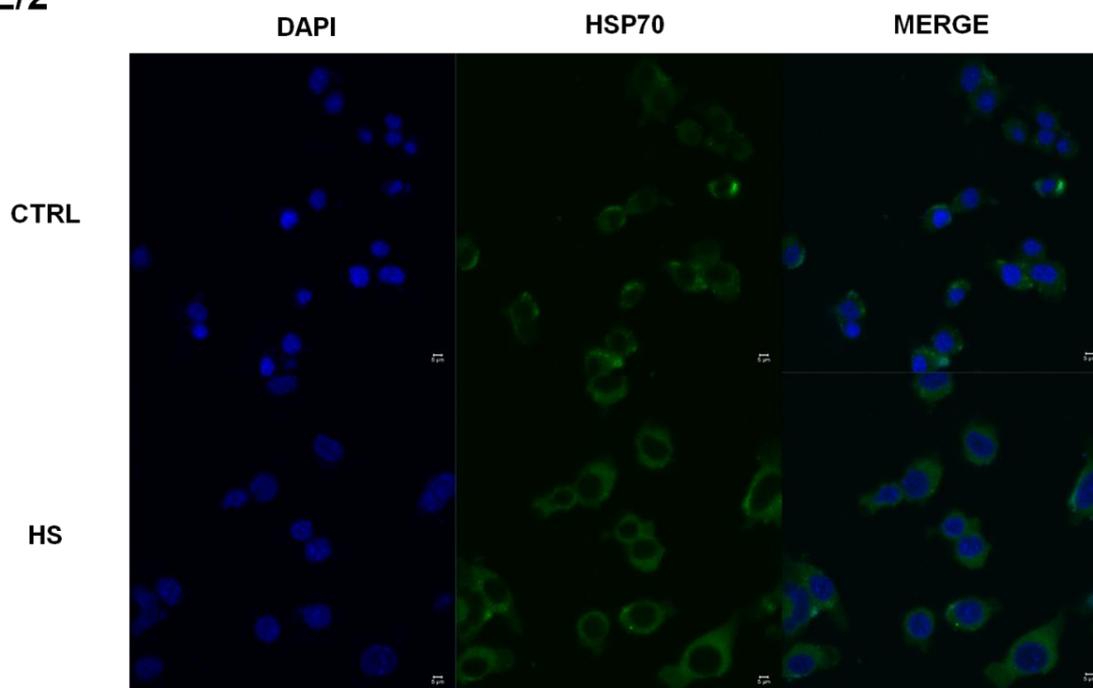
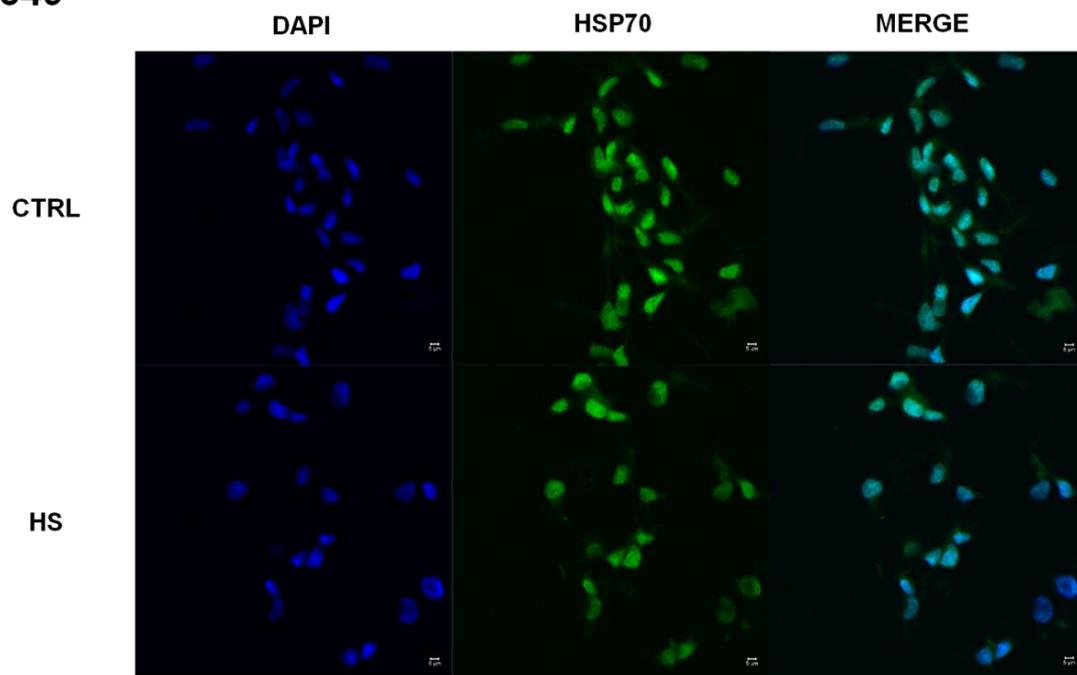


FIGURE 5

**B16F10****4T1**

**MDA-MB-231****LL/2**

**A549****FIGURE 6**

# **Capítulo 4**

## **Considerações Finais**

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína de choque térmico HSP70 possui uma alta expressão em diversos tipos de tumores (15). O conhecimento prévio da presença e nível de expressão desta proteína pode auxiliar no tratamento de pacientes, pelo conhecimento prévio da alta expressão de HSP70 na indução da resistência ao tratamento com quimioterápicos (48). As células tumorais são as únicas que possuem HSP70 na membrana esse, servindo como um biomarcador e um alvo terapêutico (49).

Dessa forma, no artigo “HSP70 expression and subcellular localization differs among tumor cell lines *in vitro*, *in vivo* and upon heat shock” foi analisada a expressão da HSP70 após um estresse térmico em diversas linhagens celulares e em modelos tumorais murino. Um aumento da expressão de HSP70, após um choque térmico de 43°C por 40 minutos, foi observado em sete linhagens celulares. No entanto, esse estresse não foi capaz de induzir uma expressão similar ao da massa tumoral. Ao analisar a localização da HSP70, após o choque térmico, foi observado um aumento da expressão no conteúdo citoplasmático e para nossa surpresa houve uma diminuição da expressão na membrana, indicando que esse estresse não é suficiente para induzir a presença de HSP70 para a membrana. Por imunofluorescência no entanto, se observou que o choque térmico induziu a translocação da HSP70 presente no citoplasma para o núcleo, em algumas linhagens celulares. Essa translocação já foi previamente observada em células da linhagem HeLa e sugerem que esse processo ocorre para auxiliar moléculas de reparo de DNA no núcleo com intuito de manter a sua integridade (50,51). Entretanto, há uma necessidade em avaliar o porque nas linhagens de câncer de mama (4T1) e de carcinoma de pulmão (LL/2) não há essa translocação de HSP70 para o núcleo.

Uma forma de controlar a função da HSP70, de induzir proliferação e reduzir o processo de apoptose nas células tumorais, seria utilizando suas co-chaperonas. Uma dessas co-chaperonas é a HspBP1, um fator de troca de nucleotídeo, capaz de regular a HSP70 ao inibir a atividade de ATPase.

Na primeira parte da dissertação foi realizada a clonagem, expressão e purificação da HspBP1 e do seu peptídeo não natural 1-136. Ocorreu a avaliação da capacidade dessas proteínas em induzir um efeito antitumoral e avaliar mudanças nas células do sistema imunológico em dois modelos tumorais murino, melanoma metastático e de câncer de mama.

No modelo de melanoma, foi observado que a concentração de 1,46  $\mu\text{M}$  da HspBP1 induziu uma tendência de diminuição do volume tumoral comparado com o grupo PBS. Ao tratar com o peptídeo 1-136, 0,73  $\mu\text{M}$ , o efeito antitumoral foi superior. Tanto a proteína inteira quanto o peptídeo modularam o sistema imunológico, ao induzir uma diminuição de células T regulatórias ( $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$ ), tanto no infiltrado tumoral quanto no linfonodo drenante. Células T regulatórias ( $T_{\text{regs}}$ ) compreendem diversos subconjuntos de células imunossupressoras que possuem um papel crítico em manter a homeostase imunológica e auto tolerância (52). Em câncer, as  $T_{\text{regs}}$  são capazes de suprimir respostas imunológicas antitumorais e assim contribuindo para o desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor, assim promovendo a evasão imunológica e a progressão do câncer (53, 54). As principais modificações imunológicas ocorreram em células do sistema imunológico adaptativo dessa forma, ao tratar animais deficientes desse sistema não se observou uma redução do volume do tumor, sugerindo a necessidade do sistema imunológico adaptativo para o efeito antitumoral. Para identificar quais células do sistema imunológico adaptativo são as responsáveis para o efeito, foi avaliado o tratamento em animais nudes, que não possuem células T, e da mesma forma não houve diminuição do volume tumoral. Sugerindo assim, que as células T são importantes para a atividade antitumoral da HspBP1.

Resultados similares foram observados no modelo de câncer de mama, uma diferença foi em relação à concentração da proteína com efeito de diminuição do volume tumoral, de 0,48  $\mu\text{M}$ . Diminuição nas células  $T_{\text{regs}}$  no linfonodo drenante foi observado, similar ao modelo de melanoma. E a necessidade do sistema imunológico adaptativo para o seu efeito foi confirmada. No entanto, há a necessidade de avaliar se o efeito do tratamento

com a HspBP1 é dependentes das células T, similar ao observado no modelo de melanoma.

Em relação à modulação da HSP70 presente no tumor, foi observado uma diminuição de 1.48 vezes na expressão no modelo de melanoma, não suficiente para concluir uma modulação na HSP70 pela HspBP1. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o efeito antitumoral da HspBP1 é consequência da modulação do sistema imunológico, mais especificamente das células T do sistema adaptativo.

É importante ressaltar que, só foi observada uma tendência de diminuição, com baixa ou nenhuma significância. Esse resultado pode ser devido ao protocolo de tratamento escolhido para este conjunto de experimentos. Nós optamos por tratar os animais sempre a partir do décimo dia, em que os animais apresentavam uma variação do volume tumoral entre eles (média ~150 mm<sup>3</sup>), e não a partir de um determinado volume tumoral, como é realizado em diversos estudos deste tipo. Assim, houve uma variabilidade nos tamanhos dos tumores, individualmente, dentro dos grupos, o que tornou a comparação entre tratamento difícil – e com pouco poder de resolução.

Como mencionado no início desta dissertação, este trabalho faz parte de um projeto guarda-chuva intitulado “HspBP1- Desenvolvimento do fragmento 1-136 da HspBP1 como nova droga antitumoral” que foi recentemente renovado até 2020. Dessa forma, esses resultados apresentados são os primeiros sendo necessário avaliar outros desenhos experimentais para avaliar o efeito do tratamento com a HspBP1 e o peptídeo 1-136. O projeto segue, avaliando o efeito do tratamento em animais *knockout* de HSP70 (*hsp*<sup>-/-</sup> PyMT mice), em células T regulatórias *in vitro* e avaliando a combinação do tratamento HspBP1 combinado com anticorpos monoclonais  $\alpha$ PD-1 e  $\alpha$ CTLA-4.

## REFERÊNCIAS

- 1 LIU, T.; DANIELS, C.K.; CAO, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology Therapeutics*. 136, 354–374. 2012
- 2- TAKAYAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*. 22(56):9041–9047. 2003
- 3 - BEPPERLING, A.; ALTE, F.; KRIEHLBER, T.; BRAUN, N.; WEINKAUF, S.; GROLL, M.; HASLBECK, M; BUCHNER, J. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 20407–20412. 2012
- 4 - KAMPINGA, H.H; HAGEMAN, J.; VOS, M.J; KUBOTA, H.; TANGUAY, R.M.; BRUFORD, E. A.; CHEETHAM, M.E.; CHEN, B.; HIGHTOWER, L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105–111. 2009
- 5 - FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.R. e VALPUESTA, J.M.Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000Research*. 7:1497.2018
- 7 - LIU, T.; DANIELS, C.K.; CAO, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology Therapeutics*. 136, 354–374. 2013.
- 8- RUDIGER, S.; GERMERTH, L.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *The EMBO Journal*. 16(7): 1501-1507. 1997
- 9 - KAMPINGA, H.H; CRAIG, E.A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(8):579-592. 2010
- 10 – HARRISON, C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress and Chaperones*. 8(3):218-224. 2003
- 11 – GORANTLA, N.V. e CHINNATHAMBI, S. Tau protein squired by molecular chaperones during Alzheimer’s disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 66(3):356-368. 2018
- 12 – CAMPANELLA, C.; PACE, A.; BAVISOTTO, C.C.; MARZULLO, P.; GAMMAZZA, A.M.; BUSCEMI, S.; PICCIONELLO, A.P. Heat Shock Proteins in Alzheimer’s Disease: Role and Targeting. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 19(9), 2603. 2018
- 13 – SONG, Y.J.; ZHONG, C.B.; WANG, X.B. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cellular Physiology*. 234:1190-1207. 2018
- 14 – LIANOS, G.D.; ALEXIOU, G.A.; MANGANO, A.; MANGANO, A.; RAUSEI, S.; BONI, L.; DIONIGI, G.; ROUKOS, D.H. The role of heat shock proteins in cancer. *Cancer Letters*. 360-114-118. 2015
- 15 – MURPHY, M.E. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 34(6)1181-1188. 2013

- 16- JUHASZ, K.; LIPP, A.M.; NIMMERVOLL, B.; SONNLEITNER, A.; HESSE, J.; HASELGRUEBLER, T.; BALOGI, Z. The complex function of Hsp70 in Metastatic Cancer. *Cancers*. 6-42-66. 2014
- 17- ; WU, J.; TUOEN, L.; RIOS, Z.; QIBING, M.; XIUKUN, L.; SHOUSONG, C. Heat Shock proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38(8)226-256 . 2017
- 18 - WEINBERG, R. A. The biology of Cancer. 2ª edição. Garland Science, 2014. 876
- 19 – Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2019. <https://www.inca.gov.br/>. Acessado: Janeiro/2019.
- 20 – WANG, X.; CHEN, M.; ZHOU, J.; ZHANG, X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *International Journal of Oncology*. 45, 18–30. 2014
- 21 - LEE, A.S. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Research*. 67, 3496–3499. 2007
- 22 - WU, J.; LIU, T.; RIOS, Z.; MEI, Q.; LIN., X.; CAO, S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38, 226-256. 2017
- 23 – COLVIN, T.A.; GABAI, V.L.; GONG, J.; CALDERWOOD, S.K.; LI, H.; GUMMULURU, S.; MATCHUK, O.N.; SMIRNOVA, S.G.; ZAMULAEVA, I.A.; GARCIA-MARCOS, M.; LI, X.; YOUNG, Z.T.; RAUCH, J.N.; GESTWICKI, J.E.; SHERMAN, M.Y. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks.
- 24- CALDERWOOD, S.K. STEVENSON, M. A.; MURSHID, A. Heat shock proteins, autoimmunity, and cancer treatment. *Autoimmune diseases*. doi: 10.1155/2012/486069. 2012
- 25 - KAMPINGA, H.H; HAGEMAN, J.; VOS, M.J; KUBOTA, H.; TANGUAY, R.M.; BRUFORD, E. A.; CHEETHAM, M.E.; CHEN, B.; HIGHTOWER, L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105–111. 2009
- 26 - ARISPE, N. & DE MAIO, A. ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 30839–30843. 2000
- 27 - RÉROLE, A.L.; JEGO, G.; GARRIDO, C. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Methods in molecular biology*. 787:205-230. 2011
- 28 - JAATELA, M.; WISSING, D.; BAUER, P.A.; LI, G.C.; Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO Journal*. 11:3507-3512. 1992
- 29 - CHARTTERJEE, S.; BURNS, T.F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(9). 2017

30 - GEHRMANN, M.; LIEBISCH, G.; SCHMITZ, G.; ANDERSON, R.; STEINEM, C.; DE MAIO, A. Tumor-Specific Hsp70 Plasma Membrane Localization is Enabled by the Glycosphingolipid Gb3. *PLoS ONE*. 3(4). 2011

31 - BORGES, T. J.; LANG, B. J.; LOPES, R. L.; BONORINO, C. Modulation of alloimmunity by heat shock proteins. *Frontiers in Immunology*. 2016

32 - BROQUET, A.H.; THOMAS, G.; MASLIAH, J. TRUGNAN, G.; BACHELET, M. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(24): 21601-21606. 2003

33 - LANCASTER, G.I.; FEBBRAIO, M.A. Exosome-dependent trafficking of HSP70: A novel secretory pathway for cellular stress proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 280(24): 23349-23355. 2005

34 – BOUDESCO, C.; CAUSE, S.; JEGO, G.; GARRIDO, C. Hsp70: A cancer target inside and outside the cell. *Methods in molecular biology*. 1709:371-396.

35 - SHEVTSOV, M.; HUILE, G.; MULTHOFF, G. Membrane heat shock protein 70> a theranostic target for cancer therapy. *Philosophical Transactions B*. 373(1738)>20160526. 2017 et al., 2017

36 - RAYNES, D.A.; GUERRIERO, V. Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 273:32883–32888. 1998

37 - SHOMURA, Y.; DRAGOVIC, Z.; CHANG, H.C; TZVETKOV, N.; YOUNG, J.C.; BRODSKY, J.L.; GUERRIERO, V.; HARTL, F.U.; BRACHER, A. Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Molecular Cell*. 173: 367–379. 2005

38 - McLELLAN, C.A.; RAYNES, D.A.; GUERRIERO, V. HspBP1, an Hsp70 cochaperone, has two structural domains and is capable of altering the conformation of the Hsp70 ATPase domain. *Journal of Biological Chemistry*. 278:19017–19022. 2003

39 - SOUZA, A.P; ALBUQUERQUE, C.; TORRONTÉGUY, C.; FRASSON, A.; MAITO, F.; PERREIRA, L.; SILVA, V.D.; ZERWES, F.; RAYNES, D; GUERRIERO, V.; BONORINO, C. HspBP1 levels are elevated in breast tumor tissue and inversely related to tumor aggressiveness. *Cell stress and Chaperone*. 14:301-310. 2009

40 - RAYNES, D.A.; GRANER, M.W.; BAGATELL, R.; McLELLAN, C.; GUERRIERO, V. Increased expression of the Hsp70 cochaperone HspBP1 in tumors. *Tumour Biology*. 24:281–285. 2003

- 41 - QUAIL, D. e JOYCE, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 19:1423-1437. 2013
- 42 - JOYCE, J. e POLLARD, J. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Review Cancer*. 9(4):293-252. 2009
- 43 - KALLURI R. e ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Review Cancer*. 6(5):392-401. 2006
- 44 - DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Review Cancer*.6(1):24-37. 2006
- 45 - OSTRAND-ROSENBERG, S. Cancer and complement. *Nature Biotechnology*. 26(12):1348-1349. 2008
- 46 – KORANY, F.; HOCHST, B.; MANNS, M.P.; GRETEN, T.F. Immune responses in hepatocellular carcinoma. *Digestive Diseases*. 28(1):150-154. 2010
- 47 - FAUSTINO-ROCHA, A.; OLIVEIRA, P.A.; PINHO-OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA-GUEDES, C.; SOARES-MAIA, R.; COSTA, R.G.; COLAÇO, B.; PIRES, M.J.; COLAÇO, J.; FERREIRA, R.; GINJA, M. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Animal*. 42(6):217-224. 2013
- 48- GABAI, V.L.; YAGLOM, J.A.; YONGMWEI, W.; MENG, L.; SHAO, H.; KIM, G.; COLVIN, T.; GESTWICK J.; SHERMAN M.Y. Anti-cancer effects of targeting Hsp70 in tumor stromal cells. *Cancer Research*. 76(20):5926-5932. 2016
- 49- HANTSCHHEL, M.; PFISTER, K.; JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; ANDREESEN, R.; SCHIMITZ, G.; SCHMETZER, H.; HIDDEMANN, W.; MULTHOFF, G. Hsp70 plasma membrane expression on primart tumor biopsy material and bone marrow of leukemia patients. *Cell Stress Chaperones*. 5(5):438-442. 2000
- 50 – NERI, L.M.; RIEDERER, B.M.; MARUGG, R.A.; CAPITANI, S.; MARTELLI, A.M. Analysis by confocal microscopy of the behavior of heat shock protein 70 within the nucleus and of a nuclear matrix polypeptide during prolonged heat shock response in HeLa cells. *Experimental Cellular Research*. 221(2):301-310. 1995
- 51 – KOTOGLOU, P.; KALAITZAKIS, A.; VERYRAKI, P.; TZAVARAS, T.; MICHALIS, L.K.; DANTZER, F.; JUNG, J.U.; ANGELIDIS, C. Hsp70 translocated to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones*. 14(4):391-406. 2009
- 52 – SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immunotolerance. *Cell*. 133(5):775-787. 2008
- 53 – ELKORD, E.; ALCANTAR-OROZCO, E.M.; DOVEDI, S.J.; TRAN, D.Q.; HAWKINS, R.E.; GILHAM, D.E. T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 10(11):1573-1586. 2010
- 54 – NISHIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology*. 27:1-7. 2014

**ANEXO A**  
**Carta de aprovação do CEUA**



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 8466

Porto Alegre, 10 de janeiro de 2018.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou o Subprojeto de Pesquisa "Avaliação in vivo do potencial antitumoral da co-chaperona HspBP1 produzidos de forma recombinante" coordenado por CRISTINA BEATRIZ C BONORINO, vinculado ao Projeto Guarda-Chuva "7136 - Desenvolvimento de inovações para prevenção e/ou tratamento de câncer: desenvolvimento do fragmento 1-136 da hspbp1 como nova droga antitumoral" coordenado por CRISTINA BEATRIZ C BONORINO.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

| Nº de Animais | Espécie | Duração do Projeto      |
|---------------|---------|-------------------------|
| null          | null    | 10/01/2018 - 10/01/2019 |

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)