

**ESTUDO FUNCIONAL DA EXPRESSÃO DE STI1/HOP
E PROTEÍNAS DA CASCATA DE SUMOILAÇÃO EM
GLIOMAS: CORRELAÇÃO COM PROLIFERAÇÃO
CELULAR E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-
PATOLÓGICAS**

NICOLLE GILDA TEIXEIRA DE QUEIROZ

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dr^a. Vilma Regina Martins

**Co-orientadores: Dr^a Marilene Hohmuth Lopes,
Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Queiroz, Nicolle Gilda Teixeira de

Estudo funcional da expressão de STI1/HOP e proteínas da cascata de SUMOilação em gliomas: correlação com proliferação celular características clínico-patológicas / Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz – São Paulo, 2011.

72p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. GLIOMA. 2. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS. 3. TUMORES DE CÉLULAS GLIAIS. 4. SUMOILAÇÃO. 5. PRÍONS. 6. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.

*(...) If you can dream - and not make dreams your master;
If you can think - and not make thoughts your aim;
If you can meet with Triumph and Disaster
And treat those two impostors just the same;
If you can bear to hear the truth you've spoken
Twisted by knaves to make a trap for fools,
Or watch the things you gave your life to, broken,
And stoop and build 'em up with worn-out tools:*

*If you can make one heap of all your winnings
And risk it on one turn of pitch-and-toss,
And lose, and start again at your beginnings
And never breathe a word about your loss;
If you can force your heart and nerve and sinew
To serve your turn long after they are gone,
And so hold on when there is nothing in you
Except the Will which says to them: 'Hold on!'*

*If you can talk with crowds and keep your virtue,
' Or walk with Kings - nor lose the common touch,
if neither foes nor loving friends can hurt you,
If all men count with you, but none too much;
If you can fill the unforgiving minute
With sixty seconds' worth of distance run,
Yours is the Earth and everything that's in it,
And - which is more - you'll be a Man, my son!*

Rudyard Kipling

*Esta tese é dedicada à Yuliya.
Tudo o que eu fiz, faço e farei
é sempre para você. Obrigada
por lembrar a mamãe a cada
dia que o importante mesmo
nesta vida é sorrir.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por terem sempre cultivado em casa o ambiente perfeito para os estudos e por me mostrarem que uma boa educação é o caminho para todos os sonhos. Agradeço o apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, o amor e, sobretudo, o respeito permanente ao meu trabalho. Aos meus irmãos Daniela e Flaviano, pelas fantásticas aulas de anatomia à mesa do jantar, discussões de casos de pacientes e ajuda nas tarefas. Vocês me ensinaram a vida, estimularam meu interesse pela área médica e ajudaram a alcançar todos meus objetivos. Agradeço aos meus cunhados Andréia e Carlos, e às minhas lindas pequenas Rafaela, Giovana, Sophia e Sarah, pela companhia e carinho.

Agradeço ao Rossen por ser muito mais do que meu esposo, por ser meu melhor amigo, conselheiro, colaborador científico e eventual terapeuta. Obrigada pela paciência, pela compreensão nos momentos de ausência e mau humor e por assumir as responsabilidades de pai e mãe quando eu precisei retornar ao trabalho. Sem o seu estímulo e o seu amor eu teria desistido antes mesmo de começar.

À Dra. Vilma Martins, por ter me aceitado como parte de seu grupo de pesquisa excepcional. Por acreditar no meu potencial e na minha capacidade de atingir melhores resultados com dedicação e preciosismo. Por estar sempre disposta a discutir experimentos e dados, respeitando as opiniões dos seus alunos.

À Dra. Marilene Lopes, por sua co-orientação ativa, sendo minha mentora, sempre atenta à necessidade de ajuda e um exemplo de profissionalismo. Obrigada pela amizade em todos os momentos e pelos valiosos conselhos de maternidade.

Ao Dr. Fernando Soares, agradeço por permitir que este projeto fosse realizado com a cooperação essencial do Departamento de Anatomia Patológica e seus funcionários.

À Dra. Isabela Werneck da Cunha, por sua disposição em revisar as amostras de gliomas e por colaborar na árdua tarefa de padronizar as reações de imunoistoquímica. Ao Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, por sua contribuição inestimável na revisão do grau histológico das amostras de gliomas.

À Dra. Suely Marie, Dra. Sueli Oba, Dra. Priscila Carvalho e Dra. Miyuki Uno e demais alunas e funcionárias do LIM-15, pela colaboração nos experimentos de PCR quantitativo, pela educação, doçura e carinho que sempre recebi nas minhas visitas.

Aos pacientes que generosamente doaram as amostras de células e tecidos utilizados neste trabalho. Aos médicos, patologistas, pesquisadores e técnicos que permitiram que estas amostras fossem apropriadamente processadas, caracterizadas e organizadas.

Aos amigos Tiago e Bruno, companheiros de mesa e de bancada, obrigada por todos os debates sobre resultados, sugestões e ideias. Pelas brincadeiras, pelas conversas, pelas contagens de células e colaboração durante as provações impostas por experimentos impossíveis.

Aos amigos de laboratório Ana Paula, Camila, Cleiton, Dominique, Michele, Glaucia, Flávio e Iara por sempre acrescentarem informações relevantes, ajudando a tornar meu trabalho mais completo e preciso. Obrigada pelo afeto e pela companhia durante o dia – e às vezes até tarde da noite.

Ao mestrando Arthur, agradeço sua imensa ajuda e calma para a padronização das imunistoquímicas e pelas conversas de assuntos diversos.

Às mestrandas Bruna e Giovanna e aos alunos de iniciação científica Fernanda, Pedro, e Juliana, que por me permitirem auxiliar nos seus projetos fizeram com que eu aprendesse muito além do que aprenderia sozinha.

Ao novo amigo Marcos, pela companhia na sala de cultura e laboratório, pelas ajudas, por compartilhar seu conhecimento e por ouvir e respeitar sugestões e idéias de experimentos.

Ao Felipe, pelos cuidados fundamentais à sala de cultura de células, pelo preparo de reagentes e pelo auxílio na compra dos mesmos.

À FAPESP pelo suporte financeiro e por apoiar a apresentação deste trabalho em congressos nacionais e internacionais.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer que por três anos foi não somente um local de trabalho, mas uma segunda casa, e a todos os seus funcionários e alunos.

Ao Hospital A. C. Camargo e ao CIPE, pelas excelentes condições de estudo e trabalho durante este doutorado.

Às funcionárias da pós-graduação Ana, Luciana e Vanuza, por sua cordialidade e atenção, e a Suely e funcionários da biblioteca pelo cuidado na formatação desta tese.

RESUMO

Queiroz NGT. **Estudo funcional da expressão de STI1/HOP e proteínas da cascata de SUMOilação em gliomas: correlação com proliferação celular e características clínico-patológicas.** São Paulo; 2011 [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Os gliomas são tumores originados das células gliais e são classificados de acordo com sua agressividade em graus I a IV. Este último, também chamado de glioblastoma multiforme (GBM), é pouco responsivo a qualquer abordagem terapêutica conhecida. Sabe-se que o prognóstico destes tumores está diretamente relacionado com sua atividade proliferativa e invasiva. Portanto, a identificação de proteínas envolvidas na manutenção da proliferação destas células tumorais é bastante relevante. Resultados anteriores do grupo mostraram que a co-chaperona STI1/HOP é secretada por células de GBM e funciona como um fator autócrino, promovendo a proliferação por meio da ligação com a proteína príon celular (PrP^C) ancorada no lado externo da membrana plasmática. No presente trabalho demonstramos que STI1/HOP é mais expressa em gliomas malignos quando comparados a tumores de baixo grau ou a tecido cerebral não tumoral. Nossos resultados mostraram ainda que o peptídeo STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅, que representa o domínio de ligação de STI1/HOP à PrP^C, compete pela ligação entre estas proteínas e inibe a proliferação de células de GBM U87MG *in vitro*. O silenciamento do gene de PrP^C em células U87MG não afetou sua proliferação *in vitro*, entretanto quando estas células foram transplantadas em camundongos *nude*, o crescimento tumoral foi bastante comprometido. Além disso, a expressão protéica de PrP^C em GBM é superior a sua expressão em todos os demais graus de gliomas e tecidos não tumorais. Estes resultados indicam um papel importante do complexo STI1/HOP-PrP^C em gliomas de alto grau de malignidade. O conhecimento dos mecanismos que regulam a atividade e secreção de STI1/HOP é muito importante uma vez que esta pode modular a proliferação celular pela ligação a PrP^C. Resultados anteriores de colaboradores do grupo, usando duplo híbrido de levedura mostraram que STI1/HOP

está associada a enzimas que promovem modificações pós-traducionais do tipo Ubiquitinação e SUMOilação, as quais podem alterar o tráfego de STI1/HOP. Sendo assim, conduzimos experimentos *in vitro* que confirmaram que STI1/HOP pode sofrer modificação pós-traducional por SUMOilação. A expressão de enzimas responsáveis pela SUMOilação foi ainda avaliada em tecidos de gliomas humanos graus I a IV. Ensaios de RT-PCR e imunistoquímica mostram que a expressão do mRNA e protéica da enzima Ubc9, a enzima E2 de conjugação exclusiva de SUMOilação, assim como da própria SUMO2, é maior em gliomas quando comparados a tecido não tumoral. Uma correlação positiva entre a expressão de HOP e SUMO2, bem como HOP e PrP^C foi encontrada em GBMs, sugerindo que a expressão de HOP bem como o processo de SUMOilação podem participar da tumorigênese de gliomas. Não foi encontrada correlação entre a expressão das proteínas estudadas neste trabalho e a sobrevida dos pacientes portadores de GBM fazendo-se necessárias, no futuro, a análise de outras variáveis clínicas e obtenção dos dados clínicos de mais pacientes serão necessárias para identificar possíveis relações entre estas proteínas e o perfil clínico dos pacientes.

SUMMARY

Queiroz NGT. [Functional study of STI1/ HOP and SUMOylation cascade proteins expression in gliomas: correlation to cell proliferation and clinico-pathological characteristics] São Paulo, 2011 [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Gliomas are tumors with origin on glial cells, which are categorized according to their aggressiveness into grades I to IV. The latter, also denominated glioblastoma multiforme (GBM), is barely responsive to any known therapeutic approach. It is described that these tumours prognostic is closely related to their proliferative and invasive activity. Therefore, the identification of proteins involved in the proliferation maintenance for tumour cells is highly relevant. Previous data of our group have shown that the co-chaperone STI1/HOP is secreted by GBM cells and acts as an autocrine factor, promoting proliferation through the binding to the cellular prion protein (PrP^C) anchored in the plasma membrane external side. In this present work we demonstrate that STI1/HOP is over expressed in malignant gliomas when compared to low grade gliomas or non-neoplastic brain tissue. Our results have also shown that the STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide, which represents STI1/HOP binding domain to PrP^C competes with STI1/HOP and inhibits proliferation in U87MG GBM cells *in vitro*. Silencing of the PrP^C gene in U87MG cells did not affect *in vitro* proliferation, however when the cells were transplanted into *nude* mice tumour growth was severely compromised. Such results indicate an important role for STI1/HOP-PrP^C complex in high grade gliomas. The knowledge over the mechanisms that regulate STI1/HOP secretion and activity is essential since this protein modulates cell proliferation via PrP^C. Earlier data from group collaborators using yeast two-hybrid system have demonstrated that STI1/HOP associates with enzymes which promote post-translational modifications such as Ubiquitination and SUMOylation, that can alter STI1/HOP traffic. Thus, we conducted *in vitro* experiments that confirmed that STI1/HOP is modified by SUMO. SUMOylation enzymes expression was assessed in human glioma grades I to IV tissues. RT-PCR and immunohistochemistry assays

revealed that Ubc9 mRNA and protein expression, E2 conjugation enzyme which is exclusive of SUMOylation, as well as the SUMO2 fragment mRNA and protein expression, is increased in gliomas when compared to non-neoplastic tissue. There is also a positive correlation between HOP and SUMO2 expression, and HOP and SUMO2 expression in GBMs, what may indicate that HOP expression and the SUMOylation process participate in glioma tumorigenesis. However it was not found any correlation between our proteins of interest expression and patients' overall survival, therefore the analysis of other clinical variables and clinical data from a larger number of patients shall be necessary to identify possible relationships between these proteins and glioma patients' clinical profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hipótese.....	6
Figura 2	Cascata de SUMOilação.....	7
Figura 3	Mapa do vetor pLenti4.....	15
Figura 4	Mapa do vetor pGCSIL-GFP.....	18
Figura 5	O peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ inibe a proliferação induzida por STI1 em células A172.....	27
Figura 6	O peptídeo de STI1 ₂₃₀₋₂₄₅ bloqueia a proliferação mediada por STI1 em células U87MG.....	27
Figura 7	O peptídeo HOP ₂₃₀₋₂₄₅ bloqueia a proliferação mediada por STI1...	28
Figura 8	Expressão de PrP ^C é silenciada em células U87MG por RNAi.....	30
Figura 9	Silenciamento da expressão de PrP ^C em U87MG impede o sinal de proliferação mediado por STI1.....	31
Figura 10	A expressão de STI1/ HOP pode ser silenciada por RNAi.....	33
Figura 11	Células U87MG silenciadas para a expressão de HOP possuem taxas de crescimento induzida por soro semelhantes às parentais.....	33
Figura 12	STI1 é SUMOilada <i>in vitro</i>	35
Figura 13	Ensaio de ubiquitinação <i>in vitro</i>	37

Figura 14	Ensaio de ubiquitinação <i>in vitro</i> de STI1 com Hdm2 recombinante como E3 ligase.....	38
Figura 15	HOP é altamente expressa em glioblastomas.....	40
Figura 16	HOP encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de gliomas.....	41
Figura 17	Aumento da localização nuclear de STI1/HOP em gliomas.....	41
Figura 18	Expressão de HOP em tecido não neoplásico (NN) e em glioblastoma (GBM).....	42
Figura 19	HOP encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de glioblastomas.....	43
Figura 20	Aumento da localização nuclear de STI1/HOP em glioblastomas.....	43
Figura 21	A expressão relativa do mRNA de PrP ^C em GBMs parece estar reduzida em comparação a tecidos não neoplásicos.....	44
Figura 22	PrP ^C encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de gliomas, em TMA com seguimento clínico.....	45
Figura 23	PrP ^C encontra-se mais expressa no citoplasma de gliomas grau I cerebelares.....	46
Figura 24	GBMs expressam concentrações maiores de mRNA de Ubc9 que gliomas Grau II e tecido não neoplásico.....	47
Figura 25	Expressão de SUMO2 em GBMs é maior que em tecido não	

	neoplásico e gliomas grau III.....	48
Figura 26	Positividade nuclear de Ubc9 é maior em gliomas do que em tecido não neoplásico.....	48
Figura 27	Positividade nuclear de SUMO2/3 é maior em gliomas do que em tecido não neoplásico.....	49
Figura 28	A expressão de mRNA de HOP e Ubc9 correlaciona-se com a expressão de mRNA de SUMO2.....	50
Figura 29	Curvas de sobrevida global dos pacientes de GBM relativas à expressão dos mRNA de HOP, Ubc9 e SUMO2.....	51
Figura 30	Expressão citoplasmática de HOP correlaciona-se à positividade nuclear de HOP, em GBMs.....	52
Figura 31	Expressão citoplasmática de HOP correlaciona-se positivamente à expressão de PrP ^C em gliomas.....	53
Figura 32	As expressões das proteínas Ubc9 e SUMO2/3 no núcleo de células de tecidos de GBMs correlacionam-se significativamente.....	54
Figura 33	Curvas de sobrevida global dos pacientes de GBM relativas à expressão citoplasmática e nuclear de HOP e expressão de PrP ^C	55
Figura 34	Formas distintas de desequilíbrio na maquinaria de SUMOilação...	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma anaplásico
AKT	Proteína cinase serina/treonina
AOS1	Enzima ativadora de SUMO subunidade 1
Apaf-1	Do inglês <i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ATCC	Coleção americana de tipos de cultura
ATP	Adenosina tri-fosfato
Bcl-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcr-Abl	Proteínas fusionadas: do inglês <i>breakpoint cluster region</i> e <i>Abelson murine leukemia</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
CDK4	Do inglês <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CHIP	Do inglês <i>Carboxyl terminus of Hsc-70-Interacting Protein</i>
c-MET	<i>hepatocyte growth factor receptor (HGFR)</i>
DAPI	4',6' diamino-2-fenilindol
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium suplementado com Ham F12
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSB	Do inglês <i>Double Strand Breaks</i>
EDTA	Ácido Etilonodiamino tetraacético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK	Proteína cinase regulada por sinais extracelulares
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FLT1	VEGFR1, receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
HCl	Ácido Clorídrico
Hdm2	Do inglês <i>Human Double minute protein 2</i>
HER2	Do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>

HIF1	Do inglês <i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HIPK2	Do inglês <i>Homeodomain-interacting protein kinase 2</i>
HOP	Proteína organizadora de proteínas Hsp70 e Hsp90
HOP₂₃₀₋₂₄₅	Peptídeo de equivalente aos aminoácidos das posições 230 a 245 da proteína HOP
HOP₆₁₋₇₆	Peptídeo de equivalente aos aminoácidos das posições 61 à 76 da proteína HOP
HSF1	Do inglês <i>Heat shock factor protein 1</i>
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
hTERT	Do inglês <i>human Telomerase reverse transcriptase</i>
IGF-1	Do inglês <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Imunoglobulina tipo G
KAI1	Supressor de tumorigenicidade, CD82
kDa	<i>Quilo Daltons</i>
LCK	Do inglês <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
MMP2	Metaloproteinase 2
MMP9	Metaloproteinase 9
MOI	Do inglês <i>Multiplicity of Infection</i>
mTOR	Do inglês Mammalian Target of Rapamycin
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína 53
p60	STI1
PBS	Salina tamponada de fosfato
Pc2	Proteína do grupo <i>Polycomb 2</i>
PCR real-time	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Cinase
PIAS	Do inglês <i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>

PKA	Proteína Cinase A
PKC	Proteína Cinase C
PrP^C	Proteína príon celular
RAF1	Proteína Cinase serina/treonina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
SDS	Duodecilsulfato de sódio
SENP	Do inglês <i>Sentrin Specific Peptidase</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	Do inglês <i>small interference RNA</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Src/SFK	Sarcoma/ Src family kinases
STAT3	Do inglês <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STI1	Do inglês <i>Stress inducible protein 1</i>
SUMO	Do inglês <i>Small Ubiquitin-like MOdifiers</i>
TBST	Solução contendo Tris, NaCl e Tween 20
TGF-β1	Do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i>
TMA_s	Micro arranjos de tecidos
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Ubc9	Enzima de conjugação de SUMO, UBE2I
UbcH10	Enzima de conjugação de ubiquitina 10
VHL	Proteína Von Hippel Lindau

LISTA DE MATERIAIS

Material	Fabricante
293FT	Invitrogen
A172	ATCC
Ácido Bórico	Merck
Advance HRP Enzyme	Dako
Advance HRP Link	Dako
Albumina sérica bovina	Sigma
Anticorpo anti-Actina	Sigma
Anticorpo anti-BrdU conjugado a biotina	Chemicon
Anticorpo anti-HOP monoclonal	Stressgen
Anticorpo anti-PrP ^C 6H4 monoclonal	Prionics
Anticorpo anti-PrP ^C policlonal (H1)	Próprio (ZANATA et al. 2002)
Anticorpo anti-STI1 policlonal	Próprio (ZANATA et al. 2002)
Anticorpo anti-SUMO2/3	Abcam
Anticorpo anti-Ubc9	Abcam
Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Ficoeritrina (PE)	Dako
Anticorpos secundários conjugados com peroxidase	Amersham
Aparelho Scanscope	Aperio
Azul de bromofenol	Merck
B-mercaptoetanol	Merck
Bradford	Bio-rad
BrdU	Sigma
Citrato de sódio	EMD
DAPI	Sigma
Deoxicolato de sódio	DIFCO Laboratories
DMEM	Gibco-BRL
DMEM-F12	Gibco-BRL
EDTA	Merck

Enzima recombinante Hdm2	Enzo/ BIOMOL
Estreptavidina-HRP (extravidin)	Sigma
Etanol	Sigma
FACSCalibur	BD Biosciences
Filtro concentrador Minicon	Millipore
Formaldeído	Merck
Glicerol	Merck
HCl	Merck
Hematoxilina	Merck
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Kit ECL Western blotting analysis system	Amersham
Kit SUMOilação (BML-UW8955)	Enzo/ BIOMOL
Kit Ubiquitinação (BML-UW9920)	Enzo/ BIOMOL
Kit ViraPower	Invitrogen
Lipofectamina	Invitrogen
Membranas de Nitrocelulose	Amersham
Metanol	Merck
Molico	Nestlè
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Merck
NP-40	Sigma
Peptídeos STI/HOP ₂₃₀₋₂₄₅ e STI1/HOP ₆₁₋₇₆	Genscript
Peróxido de Hidrogênio	Merck
PFA	Sigma
Ponceau	Sigma
Primers de RT-PCR	Sigma
SDS	Merck
Sistema Trans-Blot Semi-Dry	Bio-Rad
Software Graphpad Prism	Graphpad Software, Inc
Software ImageScope	Aperio
Software Scion Image	Scion Corporation
Soro de Cavalo	Gibco-BRL
Soro fetal bovino	Vitrocell
STI1 recombinante	Própria (ZANATA et al. 2002)

Streptavidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488/546	Molecular Probes
Substrate-Chromogen (DAB)	Dako
SYBR-Green Power Mix	Applied biosystems
TRIS	Invitrogen
Triton	Sigma
Tween 20	Sigma
U87MG	ATCC
Vetores lentivirais para STI1/HOP	EZBiolab
Xilol	Roche
Zeocina	Invitrogen

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gliomas	1
1.2	Papel de STI1/HOP e PrP ^C na proliferação glial e no processo tumoral	2
1.3	Modificações pós-traducionais: Ubiquitinação e SUMOilação	6
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Cultura de células A172 e U87MG	13
3.2	Ensaio de proliferação por incorporação de BrdU	13
3.3	Expressão estável de vetores lentivirais de RNAi para PrP ^C	14
3.4	Análise da expressão de PrP ^C por citometria de fluxo	16
3.5	Expressão estável de vetores lentivirais de RNAi para STI1/HOP	17
3.6	Expressão de GFP e GFP-STI1/ HOP siRNA por citometria de fluxo e cell sorting.....	18
3.7	Western blotting para análise de expressão de STI1	19
3.8	Curvas de crescimento das células infectadas com siRNA contra STI1/HOP ..	20
3.9	SUMOilação in vitro	20
3.10	Ubiquitinação in vitro	21
3.11	Amostras de RNA e tecidos humanos de gliomas	22
3.12	PCR quantitativo real-time em amostras de gliomas	23
3.13	Imunoistoquímica em TMAs	23
3.14	Análise da expressão protéica em TMAs	24
3.15	Análise estatística	25

4	RESULTADOS.....	26
4.1	STI1/HOP e PrP ^C na proliferação de glioblastomas <i>in vitro</i> e em modelos animais.....	26
4.2	STI1/HOP e as modificações pós-traducionais por Ubiquitina e SUMO.....	34
4.3	Expressão de HOP por PCR quantitativo Real-time e Imunoistoquímica em gliomas	39
4.4	Expressão de PrP ^C por PCR quantitativo Real-time e Imunoistoquímica em gliomas	44
4.5	Expressão de componentes de SUMO por PCR quantitativo Real-time e Imunoistoquímica em gliomas	46
4.6	Correlações entre expressões e análises de sobrevida em amostras de GBM ...	49
4.6.1	Expressão de mRNA	49
4.6.2	Expressão protéica	51
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÕES.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Planilha de dados clínicos dos pacientes FMUSP

Anexo 3 Planilha de dados clínicos dos pacientes A.C. Camargo

Anexo 4 Artigo a ser submetido à revista Nature Medicine

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Os gliomas são tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) originados das células da glia. Gliomas de baixo grau são bem diferenciados, de pouca proliferação e de melhor prognóstico, enquanto os de alto grau são indiferenciados, de alta proliferação e invasivos, com pior prognóstico (KLEIHUES e SOBIN 2000; MAHER et al. 2001).

Os gliomas são categorizados segundo a graduação definida pela OMS para astrocitomas (LOUIS et al. 2007), que os subdivide de grau 1 até o grau 4, em ordem crescente de malignidade (GRIER e BATCHELOR 2006). Os astrocitomas malignos são designados por grau III (astrocitoma anaplásico, AA) e grau IV (glioblastoma multiforme, GBM). A sobrevida média para pacientes com AA encontra-se entre 2 a 3 anos, enquanto para GBM é de 9 a 12 meses (SATHORNSUMETEE et al. 2007).

O desenvolvimento da temozolomida, um agente quimioterápico alquilante contra tumores primários e recidivas, proporcionou um ganho de 10% para 26% de sobrevida em 2 anos (STUPP et al. 2006). No entanto, a recidiva ainda ocorre em quase 100% dos casos, sendo que a sobrevida geral para GBM e AA recorrentes é 25 e 47 semanas, respectivamente (SATHORNSUMETEE et al. 2007).

Outros fármacos que estão sendo submetidos a ensaios clínicos com alvo em gliomas são o bevacizumab, que vem apresentando sucesso contra AA recorrentes (VAN METER e KIM 2010) e foi aprovado pelo FDA para pacientes portando GBMs previamente tratados, apesar da ocorrência de efeitos adversos severos em

certos pacientes (CHAMBERLAIN 2010); e dasatinib, inibidor das cinases da família SRC/SFK (AHLUWALIA et al. 2010).

Muitos ensaios clínicos estão atualmente em andamento, avaliando a eficácia de inibidores moleculares de alvos como EGFR, mTOR, KDR, FLT1, PKCbeta, e PDGFR, mas ainda seus resultados são insuficientes para garantir mudanças na prática clínica padrão (DE WITT HAMER 2010).

1.2 PAPEL DE STI1/HOP E PRP^C NA PROLIFERAÇÃO GLIAL E NO PROCESSO TUMORAL

A proteína STI1 (Stress-Inducible Phosphoprotein 1) é uma fosfoproteína com atividade de co-chaperona, de peso molecular aparente de 66kDa (ODUNUGA et al. 2004). Foi primeiramente descrita em leveduras, e correlacionada com a mediação da atividade das proteínas de choque térmico Hsp70 e 90 (NICOLET e CRAIG 1989). A proteína homóloga humana, com 98,9% de similaridade com a isoforma murina, é denominada de HOP (Hsp70/Hsp90 organizing protein), p60 (HONORÉ et al. 1992). Ela está presente em diversos sítios subcelulares, possui mobilidade entre citosol e núcleo e também pode estar presente na membrana plasmática (ODUNUGA et al. 2004; MARTINS et al. 1997; ZANATA et al. 2002).

A fosforilação de STI1/HOP e sua associação à Hsp90 participam do seu tráfego entre citoplasma e núcleo (DANIEL et al. 2008). Uma mutação no sinal de localização nuclear encontrado no domínio de HOP que se liga a Hsp90 inibe a interação destas proteínas *in vitro*, mas não previne um acúmulo nuclear de STI1/HOP em condições de choque térmico (DANIEL et al. 2008). Foi descrito

recentemente que apenas uma molécula de STI1/HOP é necessária para a inibição da atividade ATPase do dímero de Hsp90 durante o ciclo de ativação desta chaperona (LI et al. 2011). Este relato da transição entre os complexos intermediários formados no ciclo de Hsp90 faz-se relevante já que receptores de hormônios esteroidais estão entre as proteínas clientes de co-chaperonas como STI1/HOP, assim como outras proteínas clientes de Hsp90 que também podem estar envolvidas em processos oncogênicos, como Bcl-2, Apaf-1, CDK4, hTERT, p53, MMP2, HSF-1, HIF-1, SRC, LCK, AKT, RAF-1, etc (JEGO et al. 2010). De fato, o silenciamento por RNA de interferência (RNAi) de STI1/HOP em tumores de pâncreas reduz a expressão de MMP-2, entre outras proteínas clientes de Hsp90, como HER2, Bcr-Abl, c-MET e v-Src. (WALSH et al. 2011). Além disso, foi demonstrado que há uma super-expressão de HOP em tecidos de tumores de cólon, a qual se correlaciona com maior expressão de Hsc70 e Hsp90, e complexos HOP/ Hsc70/ Hsp90 podem ser imunoprecipitados destes espécimes (KUBOTA et al. 2010). Isto demonstra como tais complexos podem ser alvos interessantes e estimulam o desenvolvimento e ensaios clínicos de inúmeros agentes anti-tumorais (JEGO et al. 2010).

Não obstante, o bloqueio da expressão de STI1/HOP em linhagem de células tronco embrionárias murinas causa uma diminuição de expressão e fosforilação de *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), levando ao seu acúmulo extranuclear (LONGSHAW et al. 2009). STAT3 possui papéis críticos no desenvolvimento neural, na mediação de resposta a lesões no sistema nervoso, na resposta imunológica e nos processos tumorais (DZIENNIS e ALKAYED 2008; DEVARAJAN e HUANG 2009).

STI1/HOP foi descrita pelo nosso grupo como um ligante da proteína príon celular (PrP^C) (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002). Já foi descrita a interação de PrP^C a uma variedade de ligantes, o que pode modular funções do sistema nervoso como: proliferação, diferenciação celular e sensibilidade à morte celular programada (LINDEN et al. 2008).

Dados do nosso grupo mostram que STI1/HOP pode ser secretada por astrócitos e funcionar como fator neurotrófico (LIMA et al. 2007) ou ainda como fator autócrino mediando parada de proliferação e diferenciação (LIMA et al. 2007; ARANTES et al. 2009). Em culturas primárias de hipocampo a interação STI1-PrP^C é capaz de desencadear um efeito neuroprotetor e de neuritogênese por sinalização das vias de proteína cinase A (PKA) e de *Extracellular Regulated kinase 1/2* (ERK 1/2) respectivamente (CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005).

Em estudo recente, Zhuang e colaboradores demonstraram que o tratamento de gliomas malignos com temozolomida induz uma parada das células nas fases G2/M, levando a uma maior expressão de PrP^C e resistência à apoptose (ZHUANG et al. 2011).

O estudo de proteínas de choque térmico presentes meio extra-celular mostrou que a co-chaperona Heat-shock protein 70-binding protein 1 (HspBP1) encontra-se super-expressa em gliomas de alto grau, possui a capacidade de se ligar à superfície de tumores e ser internalizada (GRANER et al. 2009). Já a chaperona Hsp90alfa possui papel pró-invasivo e sua forma secretada estimula a formação de metástase, sendo que seu nível no plasma de pacientes correlaciona-se positivamente ao grau de malignidade de tumores de mama (WANG et al. 2009). Isto pode estar correlacionado ao fato de que o complexo de Hsp70/ Hsp90alfa no meio extracelular

pode induzir a ativação da metaloproteinase MMP2, favorecendo a migração e invasão de células de câncer de mama (SIMS et al. 2011). A co-chaperona STI1/HOP também é expressa e secretada por linhagens de células tumorais (EUSTACE e JAY 2004). Nosso grupo observou que STI1/HOP é secretada em linhagens de glioblastoma humano e promove aumento na proliferação celular por ligação a PrP^C e ativação das vias de ERK1/2 e PI3K (ERLICH et al. 2007). Em relato recente, de forma muito cognata ao trabalho de Wang e colaboradores para Hsp90alfa, foi encontrado que STI1/ HOP é secretada por tumores ovarianos e pode ser detectada em maiores concentrações no plasma de pacientes com tais tumores. Este mesmo estudo descreveu que a adição de STI1/ HOP a culturas de tumores ovarianos *in vitro* pode induzir proliferação (WANG et al. 2010). Estes dados são indícios de que as chaperonas secretadas podem, portanto, representar novos alvos terapêuticos.

É conhecido que a ligação entre PrP^C e STI1 pode ser competida pelo peptídeo de STI1 (STI1₂₃₀₋₂₄₅) que representa o sítio de ligação a PrP^C (ZANATA et al. 2002). Ainda, dados não publicados de Erlich e colaboradores (ERLICH et al. 2007) mostraram que apesar de STI1 exercer efeito positivo na proliferação de glioblastomas via PrP^C, o peptídeo murino STI1₂₃₀₋₂₄₅ sozinho não estimulava a proliferação. Desta forma propusemos a hipótese de que a adição do peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ poderia inibir a ativação de proliferação mediada pelo complexo PrP^C-STI1/HOP (Figura 1).

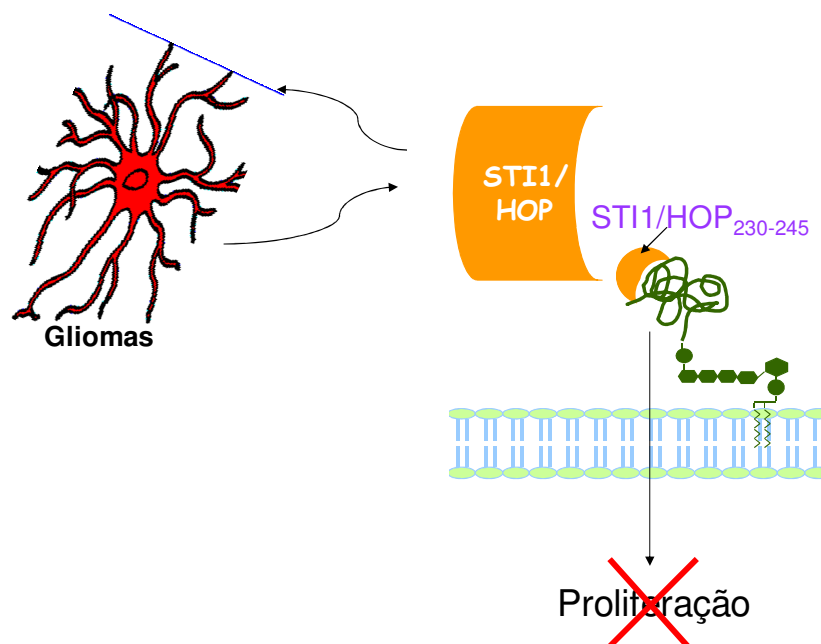


Figura 1 – Hipótese. Glioblastomas secretam STI1/ HOP, que atua de forma autócrina sobre a proliferação, mas também pode ser inibida pelo peptídeo STI1/ HOP₂₃₀₋₂₄₅, sítio de interação a PrP^C.

1.3 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS: UBIQUITINAÇÃO E SUMOILAÇÃO

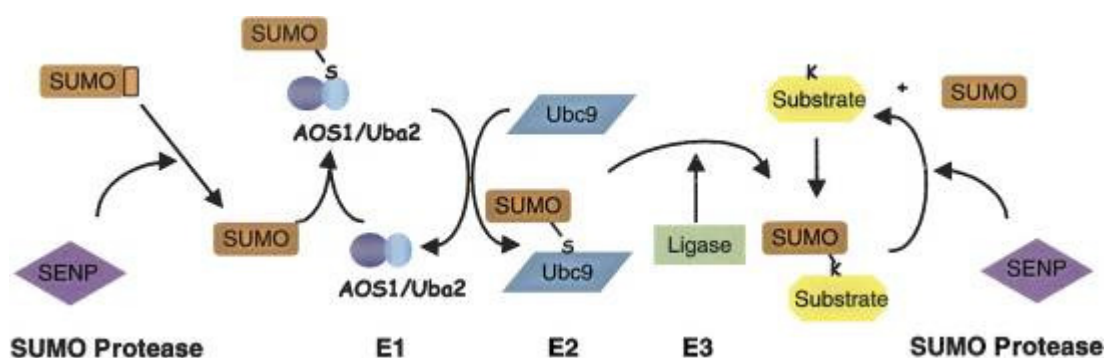
Uma vez que a proteína STI1/HOP (Número de acesso STI1 – proteína murina: NP_058017; HOP – proteína humana: NP_006810.1) não possui um peptídeo sinal para secreção, acreditamos que esta molécula deva ser secretada por vias não clássicas (i.e., que não utilizem retículo endoplasmático e Complexo de Golgi) (NICKEL 2010).

Na tentativa de identificar proteínas intracelulares associadas à STI1/HOP que poderiam modular sua secreção, o grupo do Dr. Marco Prado (Robarts Research Institute, Canadá) em colaboração com nosso grupo, conduziu experimentos de duplo-híbrido de levedura usando STI1/HOP como isca. Interessantemente, foi demonstrado que STI1/HOP liga-se a enzimas que catalisam a adição pós-

traducional de ubiquitina e de SUMO (Small Ubiquitin-like MODifiers) incluindo a única E2 envolvida no processo, Ubc9; duas E3 ligases, PIAS e Pc2, e uma cinase de Pc2 (HIPK2).

A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos que pode se ligar a resíduos de lisina de outras proteínas celulares via a ação sequencial da enzima de ativação de ubiquitina (E1), enzimas de conjugação de ubiquitina (E2s), e ligases de ubiquitina-proteína (E3) (PICKART 2001; PICKART e EDDINS 2004). A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional que está envolvida com a degradação de proteínas em proteassomos, entretanto ela modula ainda a localização sub-celular, a endocitose e a seleção de proteínas que são secretadas por exossomos (WELCHMAN et al. 2005; DEVOY et al. 2005; NALEPA et al. 2006).

Dentro da família das proteínas semelhantes à ubiquitina (*Ubiquitin-like*) as mais predominantes são SUMO. A enzima E2 de conjugação Ubc9 é exclusiva do processo de SUMOilação (DESTERRO et al. 1997; JOHNSON e BLOBEL 1997) cuja cascata de seus componentes está ilustrada na Figura 2.



Fonte: GILL (2004)

Figura 2 – Cascata de SUMOilação. Demonstração da ativação pelo complexo de enzimas E1, a conjugação pela enzima exclusiva, Ubc9, e finalmente a ligação de SUMO ao substrato. A remoção de SUMO das proteínas substrato é realizada pelas proteases SENP.

A ligação de SUMO às proteínas, também em resíduos de lisina como a ubiquitinação, pode não somente estabilizá-las, mas também regular o tráfego núcleo-citoplasma, modular o ciclo celular, manter a integridade do genoma e a transcrição gênica (MELCHIOR 2000; HAY 2005; JOHNSON 2004; HANNOUN et al. 2010).

Portanto, a ubiquitinação e a SUMOilação são eventos pós-traducionais semelhantes, mas que podem competir pelo mesmo alvo e divergir no destino que será dado à proteína que sofreu a modificação (WELCHMAN et al. 2005; DEVOY et al. 2005; NALEPA et al. 2006). A proteína supressora de tumor von Hippel-Lindau (VHL), por exemplo, sofre ubiquitinação em seus resíduos de lisina 171 e 196 (CAI e ROBERTSON 2010) sendo que este processo é bloqueado pela SUMO ligase PIASy, a qual SUMOila a VHL no resíduo 171 (CAI e ROBERTSON 2010). A VHL ubiquitinada se localiza principalmente no citoplasma, mas se torna mais estável e intensamente nuclear quando é submetida à SUMOilação, evento que também inibe sua atividade de bloqueio sobre o fator de transcrição HIF- α (CAI et al. 2010). Desta forma, é possível que a SUMOilação e a ubiquitinação desempenhem um papel importante na localização de STI1/HOP nos diferentes compartimentos subcelulares, inclusive na sua secreção, e portanto, na sua atividade neurotrófica e seu papel no crescimento de tumores, particularmente glioblastomas.

Existem muitas descrições que mostram uma possível relação entre a expressão alterada dos componentes do sistema ubiquitina/ SUMO e a tumorigênese, assim como surgimento de metástases (MO et al. 2005). Foi evidenciado que a enzima de conjugação (E2) de ubiquitina UbcH10 possui uma expressão aumentada em astrocitomas de alto grau em comparação aos de baixo grau e a tecidos cerebrais

não tumorais (JIANG et al. 2008). Demonstrou-se ainda que a diminuição da expressão de UbcH10 por RNAi em gliomas foi capaz de reduzir a proliferação e induzir apoptose destes tumores, *in vitro* (JIANG et al. 2010).

Por sua vez, um aumento da expressão da enzima de conjugação de SUMO, Ubc9, foi observado em várias linhagens de tumores ovarianos humanos como PA-1 e OVCAR-8 bem como em amostras teciduais de tumores ovarianos (MO et al. 2005; MO e MOSCHOS 2005), adenocarcinomas pulmonares humanos (MCDONIELS-SILVERS et al. 2008), e em linhagem celular de tumor de próstata metastático, LNCaP (KIM e BAEK et al. 2006).

A participação da SUMOilação em tumorigênese e metastatização está sendo intensamente estudada em tumores de próstata. O receptor de andrógeno e seus co-reguladores são SUMOilados (POUKKA et al. 2000; HEINLEIN e CHANG 2002). Ainda, excessiva SUMOilação de reptina, uma proteína que se liga à β -catenina, pode acarretar no bloqueio da transcrição de um gene supressor de metástases de câncer prostático, o KAI1 (KIM JH et al. 2006). Já a SUMOilação de pontina aumenta sua localização nuclear, induzindo a expressão de genes modulados pelo receptor de andrógeno em linhagens celulares de tumor de próstata (KIM et al. 2007). Desta forma, a presença de extensa SUMOilação em tumores levou a sugestão de Ubc9 como um alvo terapêutico promissor para o câncer uma vez que é a única enzima de conjugação no processo de SUMOilação (MO e MOSCHOS 2005).

Por sua vez, as proteínas da família PIAS, que foram inicialmente descritas como repressoras de STATs ativadas (CHUNG et al. 1997), desempenham atividade de E3 ligase por aumentarem a eficiência da atividade de conjugação de SUMO, uma vez que estas mantêm o complexo SUMO e Ubc9 (NAKAGAWA e YOKOSAWA

2002). Dados contraditórios da atividade desta enzima no processo tumoral são encontrados na literatura. A super-expressão de PIAS3 aumenta as taxas de apoptose de células de câncer de próstata, *in vitro* e *in vivo* (WIBLE et al. 2002). Por outro lado, PIAS3 possui expressão elevada em vários tumores humanos, tais como de pulmão, mama, próstata, cólon e reto e cerebrais (glioblastoma e oligodendrocitoma) (WANG e BANERJEE 2004).

Sabe-se ainda que a expressão elevada de TGF- β 1 por células neoplásicas e sua alta concentração no microambiente tumoral são responsáveis pela progressão de tumores (CHEN et al. 2001). Interessantemente, a SUMOilação do receptor de TGF- β 1 pode contribuir para o aumento de sua atividade sobre a tumorigênese (KANG et al. 2008). Não obstante, a ligação de IGF-1 ao seu receptor (IGF1R) promove sua modificação por SUMO1 e consequente translocação para o núcleo, onde pode se associar a elementos amplificadores e estimular transcrição (SEHAT et al. 2010). O acúmulo de IGF-1R nuclear em linhagens células tumorais parece ser dependente de uma super-expressão de IGF-1R, como se observa frequentemente em tumores, e, provavelmente, de uma maior expressão de Ubc9 (DENG et al. 2011).

As enzimas de de-SUMOilação, proteases chamadas de sentrininas ou SENPs são também importantes a serem mencionadas. Elas são críticas para a homeostase do sistema de SUMO e o desequilíbrio de sua expressão já foi descrito em muitos carcinomas, como por exemplo a super-expressão de SENP1 na oncogênese de tumores de próstata (BAWA-KHALFE et al. 2010). Já em estudo recente, a proteína SENP3 foi descrita como proteína cliente da chaperona Hsp90 e sua co-chaperona/E3 ubiquitina ligase CHIP (Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein) (YAN et al. 2010). Os níveis de SENP3 são mantidos baixos por meio da atividade de CHIP

e consequente degradação, mas na presença de estresse oxidativo SENP3 recebe um grupo tiol, o que recruta Hsp90 e evita sua degradação. Interessantemente, este mesmo grupo descreve uma maior interação entre Hsp90 e SENP3 em tumores (YAN et al. 2010).

Evidências recentes mostram uma participação bastante importante de Ubiquitina e SUMO no processo de reparo de lesões à dupla fita de DNA, que apresentam estreita correlação com a tumorigênese. Muitas E3 ligases de ubiquitina acumulam-se nos locais de quebras na dupla fita (double strand breaks – DSBs), sintetizando cadeias de poli-ubiquitina em diversos substratos o que representa uma sinalização essencial para o reparo do DNA (MESSICK e GREENBERG 2009). Um exemplo interessante é o gene BRCA1, que codifica uma E3 ligase de ubiquitina participante da regulação do processo de reparo, a qual é ativada quando modificada por SUMO (MORRIS 2010a e b; BARTEK e HODNY 2010).

A participação da SUMOilação de proteínas associadas à tumorigênese e metástase é cada vez mais descrita na literatura. Porém, o conhecimento sobre os mecanismos de SUMOilação e como sua maquinaria pode estar modificada em gliomas ainda é pouco abordado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade de STI1/HOP sobre PrP^C como fator de crescimento de gliomas, seu tráfego devido a modificações pós-traducionais por ubiquitina e SUMO e efeitos nos diferentes compartimentos celulares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o papel do complexo PrP^C-STI1/HOP na proliferação *in vitro* de linhagens celulares de glioblastoma humano;
- 2- Determinar o papel do peptídeo STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅ na inibição da atividade do complexo PrP^C-STI1/HOP *in vitro*;
- 3- Avaliar o perfil proliferativo de gliomas na ausência de PrP^C e HOP;
- 4- Determinar a capacidade da proteína STI1/HOP de sofrer modificações do tipo SUMOilação e Ubiquitinação;
- 5- Avaliar a expressão de PrP^C, HOP e enzimas das vias de SUMOilação em amostras de gliomas humanos por RT-PCR e imunistoquímica e sua relação com as características clínicas e patológicas destes tumores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS A172 E U87MG

As células A172 e U87MG, linhagens de glioblastomas humanos, utilizadas em todos os experimentos foram obtidas da ATCC. Células A172 são cultivadas em meio DMEM High Glucose mais 10% de SFB, e células U87MG são cultivadas em DMEM mais 10% de SFB, sendo mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂.

3.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO POR INCORPORAÇÃO DE BRDU

Células A172 ou U87MG, parentais ou expressando siRNA, foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm de diâmetro, na densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, em meio DMEM completo. Após 14-16 horas as células foram lavadas com solução salina (PBS) estéril 3 vezes, e carenciadas com meio DMEM F12 por 48h. Em seguida a este período, o meio foi trocado por tratamentos: meio DMEM F12 apenas, DMEM 10% SFB, STI1 170nM sozinha ou com os peptídeos STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅, STI1/HOP₆₁₋₇₆ (170nM ou 8µM) e os peptídeos sozinhos.

Sequências dos peptídeos:

STI1₂₃₀₋₂₄₅: ELGNDAYKKKDFDKAL

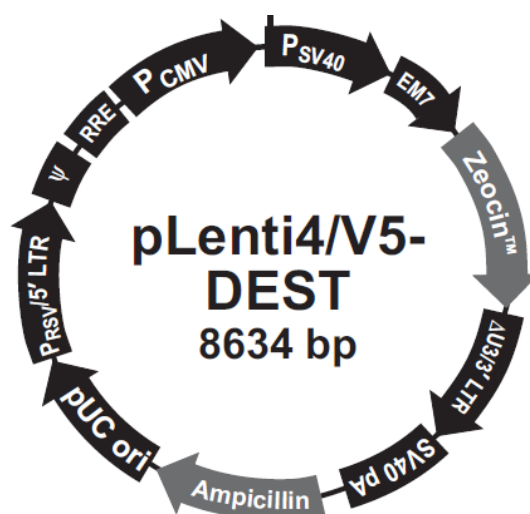
HOP₂₃₀₋₂₄₅: ELGNDAYKKKDFDTAL

STI1/HOP₆₁₋₇₆: GCKTVDLKPDWGKGYG

O tratamento permaneceu por 24 horas sendo que nas duas últimas horas foi adicionado um pulso de 35 μ M de bromodeoxiuridina (BrdU). As células foram fixadas com paraformaldeído e lavadas. Seguiu-se então para protocolo de imunofluorescência, com o tratamento das lamínulas com HCl 2N, por 30 minutos. Em seguida é adicionado tampão borato, por 10 min., e PBS mais 0,2% de Triton por 15 min. As lamínulas são bloqueadas com PBS-0,2%Triton mais 20% de soro normal de cavalo, por 1 hora. O bloqueio é retirado e acrescenta-se anticorpo anti-BrdU biotilado. Após 24 horas de incubação, as lamínulas são lavadas e tratadas com DAPI mais estreptavidina conjugada a alexa flúor (488 ou 546), 1:1000, por 1 hora. As reações de imunofluorescência são então fotografadas, em 4 campos, e analisadas pela ferramenta *Analyse particles*, do software ImageJ (NIH). Os percentuais de células BrdU positivas em relação as células totais (DAPI) são considerados para a avaliação da proliferação.

3.3 EXPRESSÃO ESTÁVEL DE VETORES LENTIVIRAIS DE RNAI PARA PRP^C

Foram testadas 4 construções de vetores para RNAi cujo alvo é PrP^C, gentilmente cedidas pelo Dr. Andrew Hill, da Universidade de Melbourne, Austrália. Três destinadas ao silenciamento da proteína humana, designadas como construções H1, H2 e H3, enquanto a última para o silenciamento de PrP^C murina (M3), podendo ser utilizada como controle negativo do silenciamento da proteína PrP^C humana. Estas construções já se encontravam clonadas no vetor para transfecção nas linhagens empacotadoras 293FT (pLenti4 – BLOCKit®, Invitrogen, Figura 3).



Fonte: INVITROGEN (2010)

Figura 3 – Mapa do vetor pLenti4, no qual foram clonadas as sequências de siRNA para PrP^C.

Para produção dos lentivírus, utilizamos o sistema comercial ViraPower®. Este sistema utiliza como base a co-transfecção de linhagens 293FT com o vetor contendo a sequência do siRNA de interesse e mais 3 vetores de proteínas necessárias para a formação de partículas lentivirais (pLP1, pLP2, pLP/ VSVG). Após a transfecção, recolhemos os meios condicionados das 293FT contendo as partículas lentivirais e os mesmos foram adicionados a células U87MG, semeadas em placas de 6 poços na densidade de 8×10^4 células por poço, em 2ml de meio, com o objetivo de infectá-las de maneira estável com os vetores de RNAi. Os títulos virais escolhidos foram: meio puro (diluição 10^0), 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^6 , para as construções H1, H2 e H3; e meio puro (diluição 10^0), 10^2 , 10^4 e 10^6 para a construção M3. A seleção destas células foi feita com 600µg/ml de antibiótico Zeocin®.

Calculando-se a partir da média de colônias obtidas, nossas transfecções renderam aproximadamente 2×10^6 TU (*transforming units*)/ml de partículas lentivirais. Este valor é utilizado para o cálculo da MOI (*multiplicity of infection*), que é a relação entre a quantidade necessária de unidades transformadoras (partículas virais) por célula. Sendo assim, 2×10^6 TU/ 8×10^4 células, a MOI ideal nestas células foi por volta de 25. As células obtidas da infecção 2, construção H2, diluição 10^1 (denominada **siRNA hu1**); infecção 3 H2 10^1 (**siRNA hu2**) e infecção 4 H2 10^1 (**siRNA hu3**) foram testadas quanto à expressão de PrP^C na superfície por meio de citometria de fluxo e se revelaram negativas, enquanto as células controle I3 M3 10^2 (**siRNA mo**) se mantiveram PrP^C positivas. Mantivemos tais células em cultura em meio mais $600 \mu\text{g/ml}$ de Zeocin[®] e escolhemos as mesmas para realização de ensaios funcionais.

3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PRP^C POR CITOMETRIA DE FLUXO

Cerca de 2×10^5 células U87MG parentais ou expressando siRNAs para PrP^C foram retiradas de garrafas de cultura e lavadas com PBS contendo 5% de SFB. As mesmas foram então incubadas com anticorpos policlonais contra a proteína PrP^C humana, na diluição 1:70, por 1 hora. Em seguida foi feita uma nova lavagem com PBS 5% SFB, e as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a ficoeritrina (PE), 1:200, por mais 1 hora. Foi realizada uma última lavagem e as células foram ressuspensas em PBS 5%SFB e filtradas para a

remoção de grumos. A análise por citometria de fluxo foi tomada em laser FL2, conduzida em equipamento FACScalibur.

3.5 EXPRESSÃO ESTÁVEL DE VETORES LENTIVIRAIS DE RNAI PARA STI1/HOP

Requisitamos à empresa EZBiolab a produção de vetores lentivirais para RNAi com alvo na proteína STI1/ HOP utilizando sequência de RNAi previamente descrita na literatura ((LONGSHAW et al. 2009); STI1/HOP – 5' GAA AGG AGA CUA CCA GAAG 3'). Vale acrescentar que esta sequência foi sintetizada primeiramente na forma de oligos e testada na linhagem U87MG, em nosso laboratório, por meio de transfecções transientes com Lipofectamina, com as quais obtínhamos cerca de 50% de inibição da expressão de STI1/HOP. Desta forma, recebemos alíquotas de um total de 1×10^8 TU de partículas lentivirais contendo o vetor pGC SIL-GFP (Figura 4) que expressa siRNA contra STI1/ HOP ligado a GFP, e vetores controle com somente GFP. As sequências codificadoras de GFP e shRNAs encontram-se dirigidas por dois promotores diferentes, CMV e U6, respectivamente.

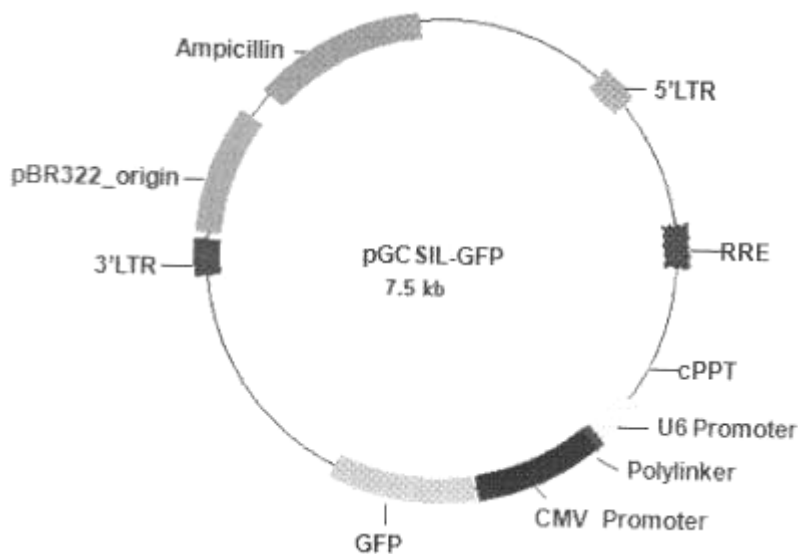


Figura 4 – Mapa do vetor pGCSIL-GFP, no qual foi clonada a sequência codificadora para o siRNA contra STI1/HOP.

As células U87MG foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 8×10^3 células por poço. Após adesão, adicionamos cada um dos vetores lentivirais em duas diferentes concentrações, resultando nos valores de MOI 10 e 15. Com isso, as células U87MG obtidas foram denominadas GFP MOI 10, STI1 MOI 10, GFP MOI 15 e STI1 MOI15. A etapa de infecção das células U87MG foi feita em sala de cultura de nível de biossegurança 2 (NB2).

3.6 EXPRESSÃO DE GFP E GFP-STI1/ HOP SIRNA POR CITOMETRIA DE FLUXO E CELL SORTING

As células U87MG infectadas com lentivírus GFP ou GFP-STI1/HOP siRNA foram mantidas em cultura em meio DMEM mais 10% de soro fetal bovino (SFB). Para avaliar a expressão destes vetores, as células foram tripsinizadas e ressuspensas

em PBS 5% SFB, usando-se cerca de 2×10^5 células para serem submetidas à análise no citômetro FACScalibur. A leitura da fluorescência verde foi feita a partir do laser FL1. Depois de seguidas avaliações da expressão de GFP, reservamos 1×10^7 células de cada cultura para isolar as populações que apresentavam maior expressão dos vetores, por meio de *sorting*, no mesmo equipamento. Sendo assim, as células obtidas foram denominadas GFP MOI10 ps (pós-*sorting*), STI1 MOI10 ps e STI1 MOI15 ps. Não houve necessidade de *sorting* para as células GFP MOI15.

3.7 WESTERN BLOTTING PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE STI1/HOP

Foram feitos extratos protéicos com tampão RIPA (0,1% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio, Tris HCl 50mM, 1% NP-40) das células U87MG infectadas com os vetores GFP ou GFP-STI1/HOP siRNA. A quantificação total de proteína foi feita pelo método de Bradford e $8 \mu\text{g}$ de proteína total foram separados em géis de SDS-PAGE. Estas foram transferidas para membranas de Western blot e subsequentemente analisadas com anticorpos policlonais anti-STI1 (1:3.000), sendo que a actina (anti-actina, 1:1.000) foi utilizada como controle de carregamento. Para quantificação de intensidade de marcação utilizamos o software Scion.

3.8 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS INFECTADAS COM SIRNA PARA STI1/HOP

As células GFP MOI10ps, STI1 MOI10ps, GFP MOI15 e STI1 MOI15ps e U87MG não infectadas como controle foram semeadas no dia 0, na densidade de 1×10^4 células por poço em placas de 48 poços. A partir do dia 2 as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, e assim sucessivamente a cada 24 horas durante 7 dias.

3.9 SUMOILAÇÃO *IN VITRO*

Adquirimos um sistema comercial de SUMOilação *in vitro* (SUMOylation kit) no qual são fornecidos tampão, enzimas E1, E2 (Ubc9), fragmentos de SUMO1/2/3 e anticorpos anti-SUMO1/2/3. O kit não fornece enzimas E3 ligase uma vez que elas não são consideradas necessárias para que ocorra SUMOilação *in vitro*. A reação foi composta por tampão de SUMOilação, STI1 recombinante (ZANATA et al. 2002) ($10 \mu\text{M}$), Mg-ATP, enzimas E1, E2 (Ubc9) e SUMO1, 2 ou 3. O controle positivo foi esta mesma reação substituindo-se a STI1 pela proteína RanGAP1, sendo que o controle negativo de ambas as reações foi feito sem a adição de ATP. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C e interrompida com a adição de tampão de amostra não redutor. As amostras foram analisadas em géis SDS-PAGE e western blots, com a marcação pelos anticorpos anti-SUMO1/2/3 fornecidos pelo kit e anti-STI1.

3.10 UBIQUITINAÇÃO *IN VITRO*

Por meio de um sistema comercial de ubiquitinação *in vitro* (Ubiquitylation kit) realizamos ensaios para avaliar se a proteína STI1 recombinante seria capaz de ser ubiquitinada e, se possível, quais enzimas de conjugação (E2) de ubiquitina seriam as mais prováveis de efetuar a adição de ubiquitina. O sistema fornece o complexo enzimático de ativação (E1), as 11 diferentes enzimas de conjugação (E2) e os tampões necessários para a reação. Não é fornecida uma fonte de enzimas de ligação (E3), necessária para a Ubiquitinação. Portanto, seguindo recomendações do fabricante, produzimos frações citosólicas S100 (sobrenadante de ultracentrifugação a 100.000g) de células HeLa, como fonte de diversas E3, ou E3 recombinante para uso nos ensaios. A enzima que adquirimos do mesmo fabricante foi a E3 Hdm2, a qual é responsável pela ubiquitinação de p53. Cada reação foi composta pelos seguintes reagentes: IPP (pirofosfatase inorgânica – 1U/reação), DTT (50mM), EDTA (50mM), Mg-ATP (5mM), tampão de ubiquitinação, enzimas E1 (150nM/reação), enzima E2 (0,2µg de cada enzima/ reação), fração S100 de HeLa (12µg/ reação) ou Hdm2 (100nM), STI1 recombinante (10µM) e Ubiquitina biotinizada (2,5µM/ reação); o controle negativo foi composto pela mesma reação sem ATP e o controle da qualidade das enzimas E2 foi feito pela reação sem EDTA, STI1rec e fonte de E3. Após a adição dos componentes a reação foi incubada por 2 horas a 30°C e interrompida pela adição de tampão de amostra não-redutor para SDS-PAGE. A análise da reação foi feita a seguir por Western blotting, apenas com estreptavidina (ExtraAvidin) conjugada à peroxidase, para se visualizar conjugados de ubiquitina-biotina, e anti-STI1, ambos na diluição 1:30.000.

3.11 AMOSTRAS DE RNA E TECIDOS HUMANOS DE GLIOMAS

Para as análises de expressão por Real-time utilizamos cDNAs obtidos de amostras de gliomas grau I até grau IV e tecido cerebral não tumoral oriundo de cirurgias contra epilepsia, do laboratório de neurologia LIM15, da Dra. Suely Marie (Faculdade de Medicina – USP). Este banco possui 22 amostras não tumorais, 23 de gliomas grau I, 26 de grau II, 18 de grau III e 80 amostras de GBM. A descrição destes tumores encontra-se no Anexo 2.

Já nas análises de expressão das proteínas de nosso interesse em gliomas utilizamos três microarranjos de tecidos (TMAs). Um TMA contém gliomas de todos os graus (I-IV) e tecido não tumoral, com 30 amostras de cada, porém não possui seguimento clínico (TMA1). O segundo TMA possui amostras de tumores de grau I até IV e tecido não tumoral (40 Grau I, 52 Grau II, 18 Grau III, 10 GBMs e 14 não neoplásico), sendo que deste possuímos o seguimento clínico dos pacientes (TMA2). A utilização de tais amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do Hospital A. C. Camargo. (Anexo 1). As amostras deste TMA foram revistas pela Dra. Isabela Werneck da Cunha e o neuropatologista Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, da Universidade Federal do Paraná, que cedeu gentilmente as amostras de tecido não neoplásico de pacientes submetidos a cirurgia de epilepsia, que constam neste TMA. E o terceiro é um TMA o qual possui 86 amostras de GBMs, com seguimento clínico (TMA3). No Anexo 3 estão detalhadas algumas informações dos pacientes destes dois últimos TMAs explicitados.

3.12 PCR QUANTITATIVO REAL-TIME EM AMOSTRAS DE GLIOMAS

Para as análises de expressão de mRNA de STI1/HOP, PrP^C, Ubc9 e SUMO2, foram utilizados cDNAs obtidos de amostras de gliomas grau I até grau IV e tecidos não tumorais oriundos de cirurgias contra epilepsia. Inicialmente, os primers foram desenhados de maneira a não alinhar com sequências de outros mRNA ou DNA genômico, mas que amplificassem todas as variantes transcricionais dos nossos genes de interesse. Foram padronizadas as concentrações ideais e eficiência dos primers, notando-se nas curvas de dissociação apenas um pico, ou seja, apenas o fragmento de interesse foi amplificado. Primers com eficiência superior a 85% permitem o uso do algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL 2001). Apenas os primers de STI1/ HOP necessitaram do uso da fórmula modificada, $1,73^{-\Delta\Delta Ct}$, já que sua eficiência foi 73%. A razão $\Delta\Delta Ct$ compreende uma relação entre a expressão do gene de interesse e genes de housekeeping, controle. Os genes utilizados como controle foram HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), BCRP (ABCG2, ATP-binding cassette 2), TBP (TATA-box binding protein) e Gus- β (Beta-glucuronidase). A reação de real-time consiste em 3 μ l de primers na concentração determinada, 3 μ l de cDNA na diluição 1:50 e 6 μ l de SYBR Green Power Mix (Applied Biosystems). As reações permanecem no termociclador de real-time por 2 horas e os resultados dos valores de Ct são analisados. Desvios entre as duplicatas superiores a 0,450 determinam que a amostra seja repetida, e caso isso se repita a mesma é excluída da análise.

3.13 IMUNOISTOQUÍMICA EM TMA

Lâminas de TMA sofreram desparafinização em xilol aquecido a 56°C por 2 vezes de 20 minutos. Em seguida foram hidratadas em diluições crescentes de etanol (100%, 90%, 80%, 70%), cada qual por 3 minutos. Foi feita a recuperação antigênica com Tris-EDTA(10mM Tris, 1mM EDTA) pH 8 (STI1, HOP, PrP^C) ou tampão citrato pH 6 (Ubc9, SUMO2/3), em panela de pressão por 30 minutos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com 3% de peróxido de hidrogênio, diluído em água destilada. As amostras foram então tratadas com Tris (0,1M, pH 7,6) mais Triton 0,1% por 15 minutos para permeabilização e foi feito o bloqueio de proteínas por 4 horas, contendo Tris, 20% soro normal de cavalo, 5% Mólico, 1% BSA. Os anticorpos primários foram diluídos em Tris 0,1% BSA e incubados por 12-16 horas em câmara úmida. Depois de seguidas lavagens em Tris, foi adicionado o reagente Advance HRP Link por 30 minutos, novas lavagens e o reagente Advance HRP Enzyme, por mais 30 minutos. A marcação com corante DAB foi feita por 1 minuto e 30 segundos e a contra-coloração foi feita com Hematoxilina, por 10 minutos.

3.14 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA EM TMA

O Scanscope é um *scanner* capaz de digitalizar lâminas de imunistoquímica e montar imagens de alta resolução das mesmas. Tais imagens podem ser então visualizadas e analisadas pelos softwares Spectrum e ImageScope. Os dados retornados pelos softwares informam positividade da amostra para o marcador tanto em unidades relativas, em uma graduação de 0 até 3 pela intensidade do corante

informado (DAB), ou em unidades absolutas, como por exemplo, percentual de células positivas. Como os gliomas são tumores relativamente homogêneos nos *spots* dos TMAs e na tentativa de eliminar possíveis vieses em razão de marcação de fundo, utilizamos as quantificações de *Nuclear Staining (versão 1)*, em percentual de núcleos positivos, para marcações nucleares e a ferramenta *Positive Pixel Count (versão 9)*, para análise da marcação citoplasmática.

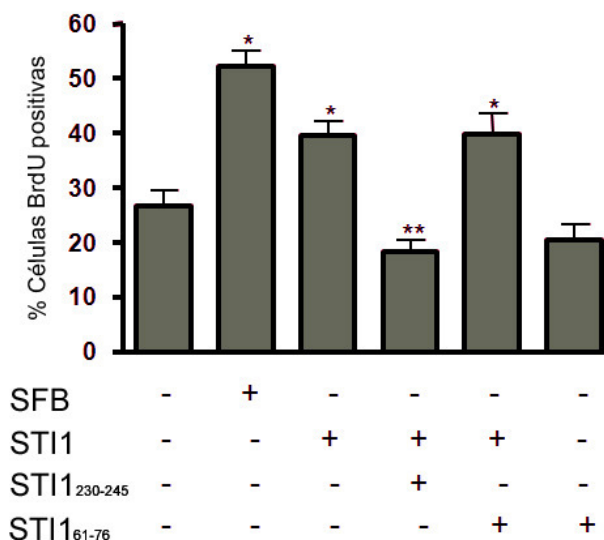
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 5 para Windows. Ensaios de proliferação foram avaliados por ANOVA seguido de pós teste Tukey ou Dunnett. Já os perfis de expressão de mRNA ou proteína foram avaliados quanto à distribuição (teste de normalidade D'Agostino e Pearson) e então foi aplicado o teste t não pareado, caso a distribuição fosse normal e Mann-Whitney quando não gaussiana. As correlações entre expressões de mRNA e proteína de STI1/HOP, Ubc9 e SUMO2/3 foram feitas utilizando-se o valor r de Spearman (mRNA) e Pearson (localização nuclear), segundo a distribuição. Foi considerada fraca a correlação cujo valor de r ficou entre 0 e 0,3, moderada quando r ficou entre 0,3 e 0,7 e forte para valores de r maiores que 0,7. Curvas de sobrevida foram avaliadas pelo método de *log-rank*. Valores de probabilidade inferiores a 5% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

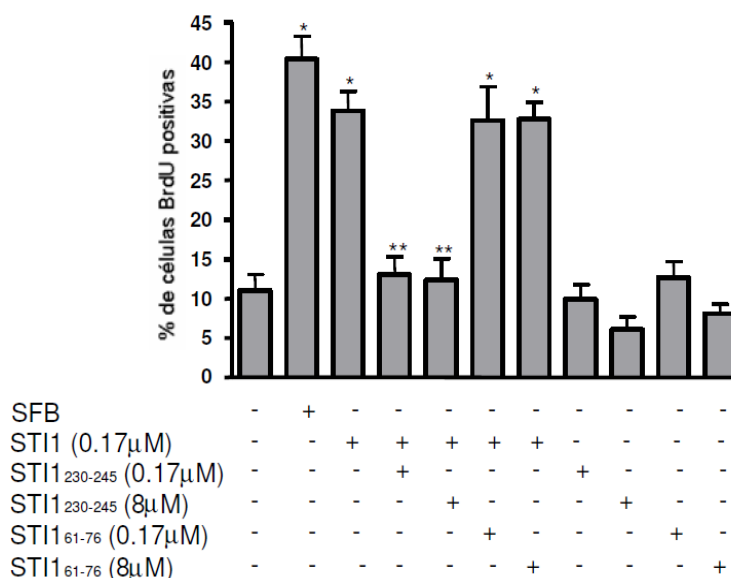
4.1 STI1/HOP E PRP^C NA PROLIFERAÇÃO DE GLIOBLASTOMAS *IN VITRO* E EM MODELOS ANIMAIS

Inicialmente, confirmamos resultados anteriores do grupo (ERLICH et al. 2007) mostrando que o tratamento com STI1 recombinante promove um aumento na proliferação de células de glioblastoma humano A172 (Figura 5). Estes experimentos foram realizados ainda em células U87MG, outra linhagem de glioblastoma humano (Figura 6). Sabemos que a ligação entre PrP^C e STI1 pode ser competida pelo peptídeo de STI1 (STI1₂₃₀₋₂₄₅) que representa o sítio de ligação de STI1 a PrP^C (ZANATA et al. 2002). Nossos resultados mostram que este peptídeo foi capaz de inibir a proliferação mediada por STI1 tanto em células de glioblastoma A172 como em U87MG (Figuras 5 e 6, respectivamente). Este efeito não foi observado com o peptídeo controle, STI1₆₁₋₇₆, que representa o domínio equivalente aos aminoácidos de 61 a 76 de STI1.



Legenda: Células A172, após carenciamento de soro por 36 horas, foram pré-tratadas por 30 minutos com peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo controle STI1₆₁₋₇₆ (170nM), seguidos pela incubação com STI1 por 24 horas. Como controle positivo, meio completo contendo SFB (soro fetal bovino) foi adicionado. Nas 2 últimas horas de incubação as células foram marcadas com BrdU e fixadas. Valores representam média \pm erro padrão, ANOVA-Tukey, * $p < 0,01$, vs. controle, ** $p < 0,01$, vs. tratamento com STI1.

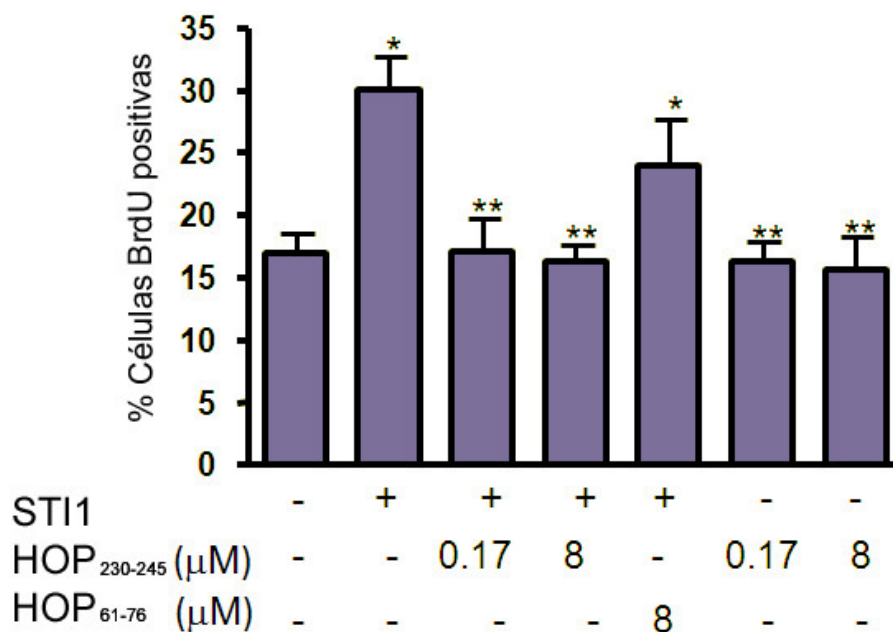
Figura 5 – O peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅ inibe a proliferação induzida por STI1 em células A172.



Legenda: Células U87MG, após carenciamento de 48 horas, foram pré-tratadas com peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅ ou peptídeo controle STI1₆₁₋₇₆ (170nM e 8 μM), seguidos pela incubação com STI1 por 24 horas. Como controle positivo, meio completo contendo SFB (soro fetal bovino) foi adicionado. Nas 2 últimas horas de incubação as células foram marcadas com BrdU e fixadas. Valores representam média \pm erro padrão, ANOVA-Tukey * $p < 0.001$ vs controle; ** $p < 0.001$ vs tratamento com STI1 170nM.

Figura 6 – O peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅ bloqueia a proliferação mediada por STI1 em células U87MG.

Considerando que as células de glioblastoma utilizadas nos experimentos são de origem humana, acreditamos que seria essencial tratar as células também com o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ da proteína HOP, homóloga humana. Estes ensaios estão representados pela Figura 7.



Legenda: Células U87MG foram tratadas com STI1 ou com STI1 na presença dos peptídeos HOP₂₃₀₋₂₄₅ ou o peptídeo controle HOP₆₁₋₇₆. Valores expressos como média \pm desvio padrão (ANOVA-Dunnets, * $p < 0,05$ vs controle; ** $p < 0,05$ vs tratamento com STI1).

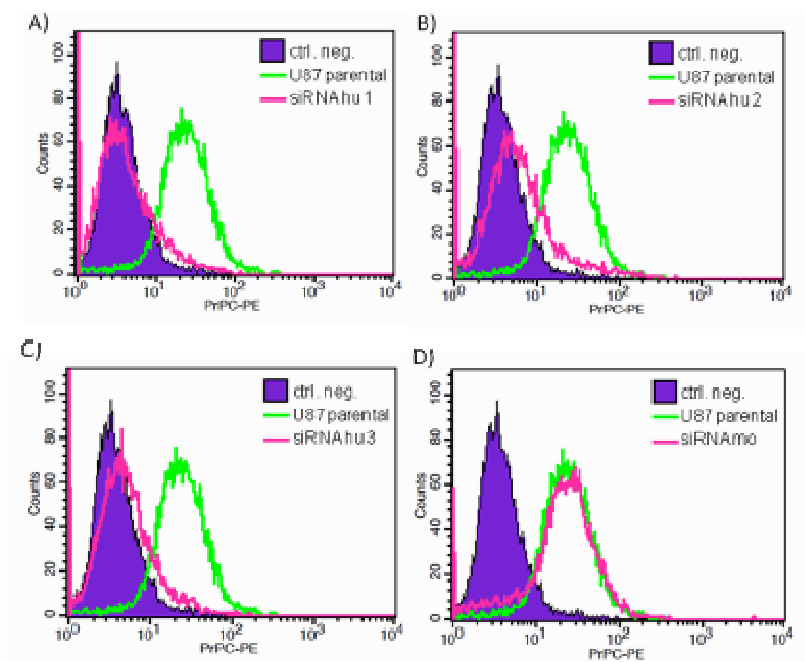
Figura 7 – O peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ bloqueia a proliferação mediada por STI1.

Na tentativa de mostrar que o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ também poderia mediar efeitos *in vivo* sobre a proliferação de células U87MG foram iniciados experimentos em modelos animais. Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Marilene Lopes usando modelo de xenoinxertos ortotópicos de células de glioblastoma U87MG em camundongos *nude*. Os resultados demonstram que a infusão intratumoral do peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ inibe o crescimento tumoral enquanto que nenhum efeito é observado quando os camundongos receberam tratamento com

o peptídeo controle HOP₆₁₋₇₆. A análise destes tumores mostra que após o tratamento com o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅ ocorre inibição da proliferação destes tumores, um ligeiro aumento de apoptose, mas ausência de efeito sobre a angiogênese. Os animais apresentam melhora no déficit cognitivo causado pela presença do tumor e aumento na sobrevivência quando tratados com o peptídeo HOP₂₃₀₋₂₄₅. Os dados *in vitro* (Figuras 5, 6 e 7) e *in vivo* foram então incluídos no artigo a ser publicado (Anexo 4).

Levando em consideração os dados de proliferação *in vitro* e *in vivo*, procuramos corroborar nossa hipótese de que STII/ HOP estimula a proliferação de gliomas tendo PrP^C como receptor, usando a metodologia de RNA de interferência (RNAi). Por meio de infecções com vetores lentivirais contendo shRNA contra PrP^C e HOP realizamos o silenciamento destas proteínas em células U87MG.

As células U87MG foram infectadas inicialmente com vetores lentivirais contendo shRNA para PrP^C humano em paralelo com um controle de shRNA para PrP^C de camundongo que foram construídos pelo Dr. Andrew Hill (Universidade de Melbourne, Austrália). As células que receberam as construções foram selecionadas pelo tratamento com o antibiótico Zeocin[®]. A expressão de PrP^C nestas células foi avaliada por citometria de fluxo após marcação com anticorpo policlonal anti-PrP^C. Três populações diferentes de células foram selecionadas nas quais a expressão de PrP^C é praticamente nula (Figura 8A-C) e uma linhagem controle que recebeu shRNA contra PrP^C de camundongo o qual não silenciou a expressão do PrP^C humano das células U87MG (Figura 8D).

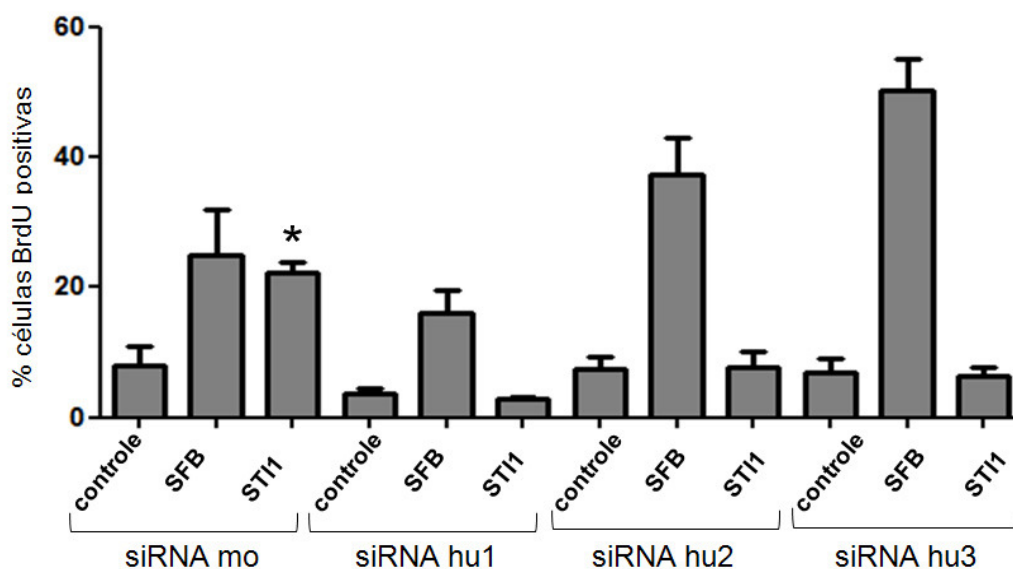


Legenda: Células U87MG e respectivas linhagens infectadas com siRNA contra PrP^C foram marcadas com anticorpo policlonal anti-PrP^C e analisadas em citômetro de fluxo. Os histogramas mostram as células U87MG incubadas apenas com anticorpo secundário PE como controle (ctrl. neg., azul), células U87MG incubadas com anticorpo primário e secundário (U87 parental, verde) e linhagens de U87 infectadas com siRNA para PrP^C humana (A-C, rosa) e para PrP^C murina, como controle, em D (linha rosa).

Figura 8 – Expressão de PrP^C é silenciada em células U87MG por RNAi.

Após a caracterização do perfil de expressão de PrP^C nas linhagens selecionadas, avaliamos a proliferação das mesmas tratadas ou não com STI1, através de ensaios de incorporação de BrdU. A Figura 9 mostra que as células cuja expressão de PrP^C foi silenciada não respondem a tratamento com STI1 recombinante. Por outro lado, estas células continuam a apresentar crescimento positivo na presença de SFB. Indicando que a ausência de resposta proliferativa deve-se especificamente a interação PrP^C-STI1. Finalmente as células que receberam a construção controle de siRNA de camundongo continuam a responder aos estímulos proliferativos desencadeados tanto por STI1 quanto por soro. Portanto,

ficam confirmados dados prévios que sugeriram que a proliferação nas células de glioblastoma pode ser modulada positivamente pelo complexo PrP^C-STI1/HOP.



Legenda: Células U87MG que foram infectadas com siRNA para PrP^C humana (siRNA hu1, 2 e 3) ou com siRNA controle (murino, siRNA_{mo}), foram carenciadas por 48 horas e em seguida tratadas por 24 horas com meio DMEM F12 apenas (controle), DMEM + 10% soro fetal bovino (SFB), ou com 170nM de STI1 recombinante (STI1). Nas 2 últimas horas de incubação foi feito um pulso de BrdU e a seguir as células foram fixadas e marcadas por imunofluorescência com anticorpos anti-BrdU. Células BrdU positivas foram contadas em relação as células totais (DAPI). * ANOVA-Tukey, p<0,01 vs. controle siRNA mo.

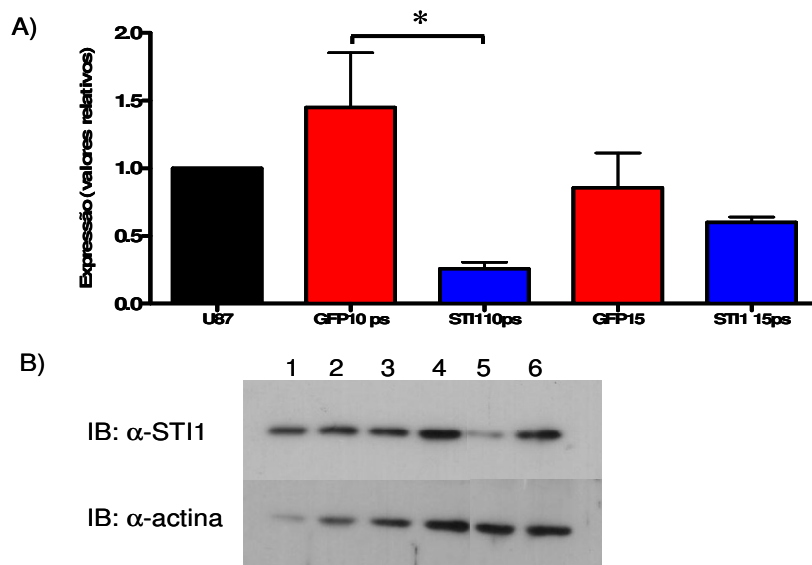
Figura 9 - Silenciamento da expressão de PrP^C em U87MG impede o sinal de proliferação mediado por STI1.

Foram feitos, posteriormente, ensaios *in vivo* com as células U87MG silenciadas para a expressão de PrP^C. Estas células foram implantadas em camundongos *nude* e seu crescimento foi avaliado pela medida dos tumores após 14 dias. Os tumores provenientes de animais xenotransplantados com as células U87MG nos quais a expressão de PrP^C foi silenciada (siRNA hu2 e hu3) apresentam-se muito menores que aqueles derivados de células que receberam o siRNA de PrP^C murino, com a expressão normal de PrP^C. O crescimento tumoral deste último grupo

(controle) é semelhante ao apresentado pelos animais receberam células parentais U87MG. Juntos estes dados indicam a importância da expressão de PrP^C para o crescimento destes tumores (Anexo 4).

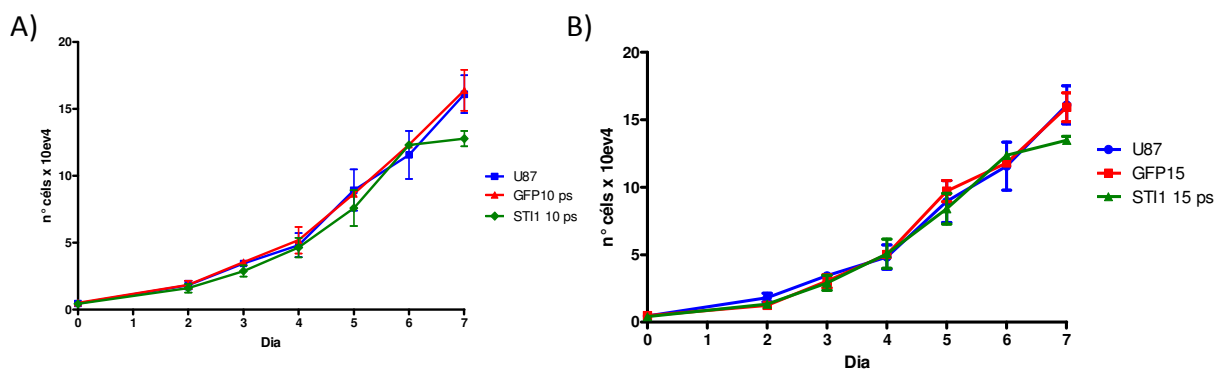
Usando-se também a metodologia de RNAi, procuramos inibir a expressão da proteína HOP, em células U87MG. As células foram infectadas com partículas lentivirais contendo vetores comerciais de shRNA contra HOP ligados a GFP ou vetores GFP vazios. Populações de U87MG com maior expressão de GFP foram posteriormente selecionadas por meio de *cell sorting*, por citometria de fluxo. Considerando a localização principalmente citoplasmática desta proteína, avaliamos o silenciamento da expressão de HOP por *western blot*.

A Figura 10 demonstra que o uso de uma MOI 10 causa uma redução de cerca de 70% da expressão de HOP. Concentrações superiores do vírus podem causar modificações menores na expressão basal de HOP. Estas duas linhagens de U87 parcialmente silenciadas para a expressão de HOP foram avaliadas quanto a seu crescimento e os resultados apontam que não existem variações no crescimento destas células quando mantidas na presença de 10% de soro fetal bovino (Figura 11).



Legenda: A) Gráfico da expressão relativa de HOP na linhagem U87MG parental e nas populações de U87MG GFP MOI 10ps, GFP-STI1/HOP siRNA MOI 10ps, GFP MOI 15 e GFP-STI1/HOP siRNA MOI 15ps. O controle de carregamento foi feito a partir da expressão de actina. A expressão de HOP em células U87 não infectadas foi considerada como 1 e os outros valores são relativos a este. *ANOVA (Kruskal-Wallis, pós-teste Dunns), $p = 0,0491$. B) Imagem representativa da expressão de STI1/ HOP e actina nos *western blots* de extratos protéicos das células U87MG parentais (canaletas 1 e 2) e populações U87MG GFP MOI 10ps (canaleta 3), GFP MOI 15 (canaleta 4), GFP-STI1/HOP siRNA MOI 10ps (canaleta 5) e GFP-STI1/HOP siRNA MOI 15ps (canaleta 6).

Figura 10 – A expressão de STI1/ HOP pode ser silenciada por RNAi.



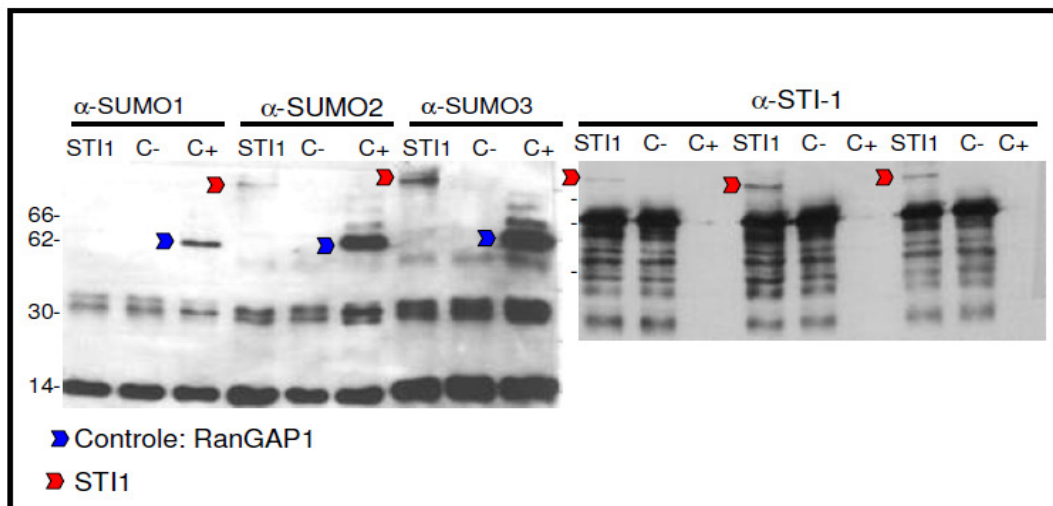
Legenda: A) Curva de crescimento das células U87MG parentais e linhagens expressando siRNA contra STI1/HOP MOI10, com respectivos controles de infecção expressando apenas GFP MOI10 (GFP MOI 10ps, STI1 MOI 10ps); B) Curva de crescimento das células U87MG parentais e linhagens expressando siRNA contra HOP MOI15, com respectivos controles de infecção expressando apenas GFP (GFP MOI 15, STI1 MOI 15ps). Em todos experimentos as células foram crescidas na presença de 10% de SFB e contadas a cada 24 horas, durante 7 dias.

Figura 11 – Células U87MG silenciadas para a expressão de HOP possuem taxas de crescimento induzida por soro semelhantes às parentais.

4.2 STI1/ HOP E AS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS POR UBIQUITINA E SUMO

Assim como descrevemos na introdução, dados do grupo do Dr. Marco Prado (Robarts Institute, Canadá) demonstraram, por ensaios de duplo híbrido de levedura, que STI1 pode se ligar a enzimas da cascata de SUMOilação, tais como Ubc9 e PIAS. Levando-se em consideração as funções da SUMOilação no tráfego de proteínas dentro da célula, hipotetizamos que STI1/ HOP pode ser SUMOilada, e que tal modificação poderia interferir não somente na localização subcelular da proteína, mas também alteraria seu papel em células tumorais.

Inicialmente, buscamos evidenciar, por ensaios *in vitro* se a proteína STI1 recombinante poderia ser SUMOilada. A Figura 12 exhibe um dos ensaios de SUMOilação *in vitro* realizados com *kit* comercial de SUMOilação (SUMOylation kit, BIOMOL/ Enzo). Podemos observar que STI1 foi SUMOilada por SUMO1, 2 e 3, aparentemente com maior afinidade por estas duas últimas.



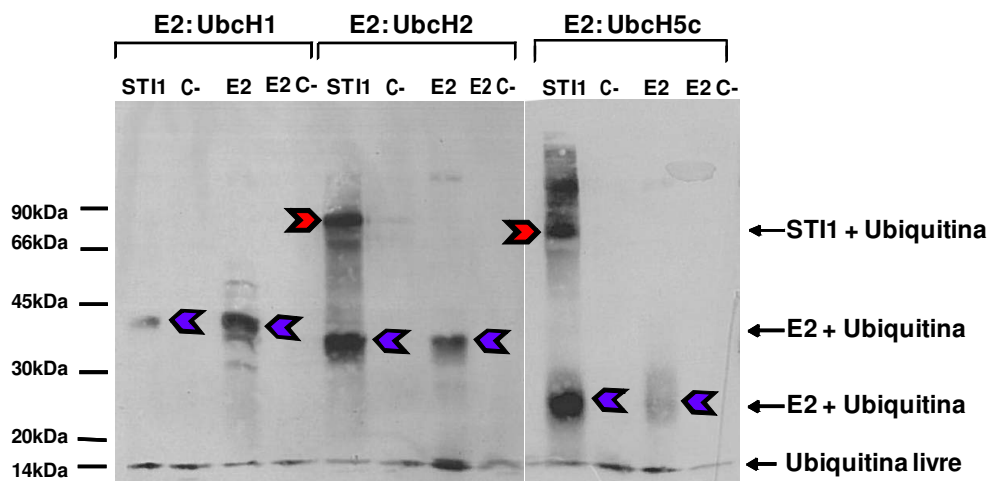
Legenda: *Western blot* demonstrando a SUMOilação *in vitro* de STI1 pelas formas SUMO1, 2, e 3. As canelas indicadas por STI1 indicam condições nas quais a proteína foi adicionada à reação, C- controle negativo (sem ATP) e C+ controle positivo com a proteína RanGAP1. Setas vermelhas indicam a proteína STI1 SUMOilada, sendo reconhecida pelos anticorpos monoclonais fornecidos pelo kit (anti-SUMO2, anti-SUMO3) e anticorpo policlonal anti-STI1. A proteína apresenta um deslocamento de banda de 66kDa para cerca de 90kDa. Setas azuis indicam a SUMOilação da proteína controle RanGAP1.

Figura 12 – STI1 é SUMOilada *in vitro*.

Experimentos conduzidos pelo grupo do Dr. Marco Prado, em astrócitos, mostram que a super-expressão de STI1, SUMO e PIAS, e consequentemente SUMOilação faz com que a localização STI1 seja intensificada no núcleo (dados não mostrados). Portanto, estes dados sugerem fortemente que a modificação de STI1 por SUMOilação poderia estar envolvida com sua translocação nuclear.

Sabe-se ainda que além de sofrer translocação nuclear, STI1/ HOP pode ser secretada por astrócitos e tumores gliais. No entanto, esta proteína não possui peptídeo sinal que a conduza para a secreção por vias clássicas. Resultados não publicados do nosso grupo indicam que STI1 é secretada por astrócitos em vesículas, entretanto, o mecanismo usado para o endereçamento de STI1 a este compartimento

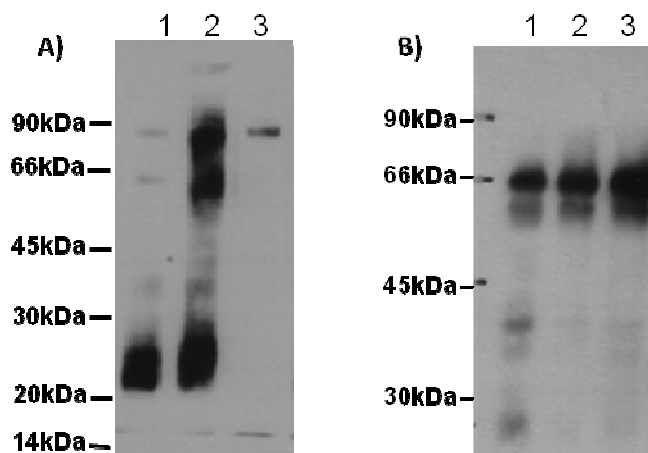
celular ainda é objeto de estudo pelo nosso grupo. Interessantemente, dados de literatura apontam que a monoubiquitinação de proteínas pode estar relacionada a sua seleção para secreção por exossomos/vesículas (NALEPA et al. 2006; GUPTA e KNOWTON 2007). Desta forma, decidimos avaliar inicialmente *in vitro* se STI1 recombinante poderia sofrer ubiquitinação, usando um sistema comercial. O sistema adquirido fornece ubiquitina biotinizada e 11 enzimas de conjugação (E2) de Ubiquitina (UbcH1; UbcH2; UbcH3; UbcH5a; UbcH5b; UbcH5c; UbcH6; UbcH7; UbcH8; UbcH10; UbcH13). Como fonte de enzimas E3 ligase foi utilizada a fração S100 de células HeLa. A presença de ubiquitina é determinada por ensaios de *western blot* com estreptavidina-peroxidase. A Figura 13 mostra o ensaio realizado na presença de STI1 recombinante e três enzimas E2 diferentes (UbcH1, UbcH2 e UbcH5c). A enzima UbcH1 parece não promover ubiquitinação de STI1 (linha STI1) enquanto STI1 ubiquitinada pode ser melhor vista quando as E2 UbcH2 e UbcH5c foram utilizadas (cabeça de setas vermelhas). Controles positivos mostram que as enzimas E2 estão funcionando corretamente (recebem ubiquitina, canaletas E2 cabeças de setas azuis).



Legenda: Imagem representativa de *western blot* da reação de ubiquitinação *in vitro* feita com as enzimas de conjugação UbcH1, UbcH2 e UbcH5c. Legenda das canaletas: **STI1**, reação completa; **C-**, controle negativo da reação com todos os reagentes mais STI1 sem ATP; **E2**, reação controle positivo de E2, feita sem STI1; **C-E2**, controle negativo da reação teste da enzima E2, feito sem ATP e STI1. Reação revelada com estreptavidina, 1:30.000.

Figura 13 – Ensaio de ubiquitinação *in vitro*.

A reação com extrato de HeLa proposta pelo kit traz limitações para que se proceda a reação de *western blot* com o anticorpo anti-STI1. Torna-se bastante difícil observar se de fato a marcação de ubiquitina é coincidente com a marcação de STI1, devido à grande quantidade de STI1 recombinante e STI1 proveniente do extrato de HeLa. Sendo assim utilizamos a E2 UbcH5c, que a princípio mostrou maior atividade sobre a ubiquitinação de STI1, e uma enzima E3 ligase recombinante, Hdm2, mais ubiquitina biotinilada, em um outro ensaio. O material proveniente destas reações foi analisado por *western blotting* usando-se estreptavidina peroxidase ou anticorpo anti-STI1 (Figuras 14A e 14B respectivamente).



Legenda: Reação de ubiquitinação composta de ubiquitina-biotina mais: 1- STI1 recombinante + enzima E2 UbcH5c; 2- STI1 recombinante + enzima E2 UbcH5c + E3 Hdm2; ou 3- STI1 recombinante + E3 Hdm2. O conjunto foi revelado com (A) estreptavidina peroxidase ou (B) anticorpo anti-STI1.

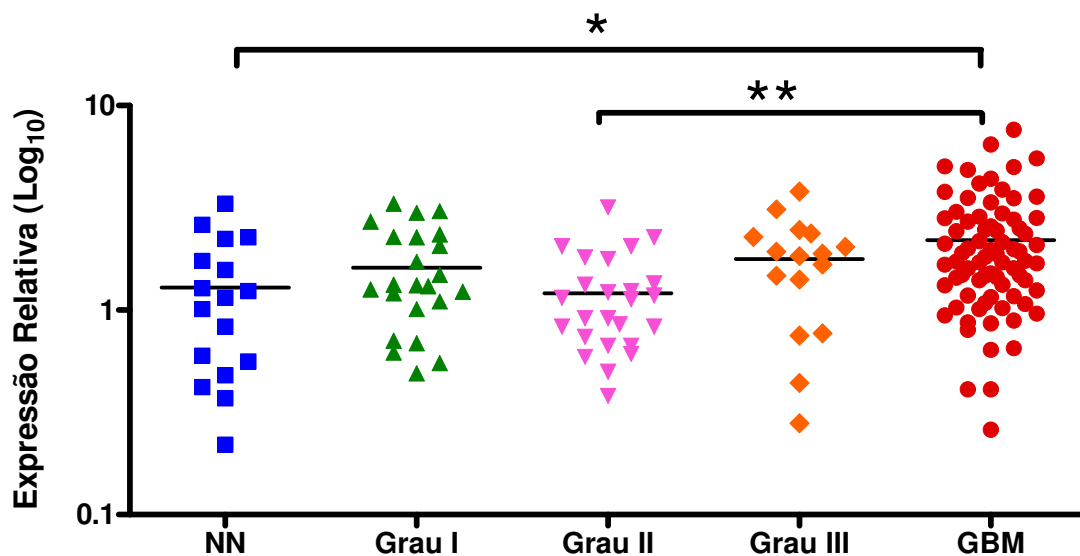
Figura 14 – Ensaio de ubiquitinação *in vitro* de STI1 com Hdm2 recombinante como E3 ligase.

Bandas com tamanho aproximado ao de STI1 (66kDa) e ainda um pouco maiores que 90kDa foram observadas tanto para a reação apenas com E2 e, mais intensamente, com E2 e E3 quando o *western blot* foi revelado com estreptavidina peroxidase (Figura 14A colunas 1 e 2). Uma única banda bem menos intensa de 90kDa foi vista na presença de STI1 e E3 (Figura 14A, coluna 3). Por outro lado, quando esta mesma membrana foi revelada com anticorpo anti-STI1, apenas uma banda forte de cerca de 66Kda foi observada. Portanto, a banda maior que 90kDa vista na Figura 14A deve ser inespecífica. A ubiquitina possui tamanho previsto de 9kDa, o que levaria a STI1 mono-ubiquitinada ao peso de 75kDa. Esta diferença não pode ser vista neste ensaio uma vez que o gel de poliacrilamida 10% usado não permitiu a separação e visualização das bandas, ou mesmo a intensidade da banda de 66kDa de STI1 ainda se encontra muito elevada para esta distinção. Podemos sugerir

ainda que a E3 ligase Hdm2 pode não ser a ligase específica de ubiquitinação de STI1/HOP, o que implica que uma vasta gama de combinações entre E2 de conjugação e E3 ligases diferentes poderiam ser necessárias para que se possa afirmar com segurança quem seria responsável pela ubiquitinação de STI1/HOP. Em conjunto estes dados não confirmam a ubiquitinação de STI1 *in vitro*, sendo que a ubiquitinação de STI1 e suas funções ainda são um ponto aberto e necessitam maiores abordagens experimentais.

4.3 EXPRESSÃO DE HOP POR PCR QUANTITATIVO REAL-TIME E IMUNOISTOQUÍMICA EM GLIOMAS

Na tentativa de mostrar o papel de HOP em gliomas, avaliamos inicialmente a expressão de transcritos de HOP por *Real-time* PCR em colaboração com o laboratório da Dra. Suely Marie (Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina, USP). Amostras de gliomas de Graus I a IV foram avaliadas e a expressão de HOP comparada com tecido controle representado por amostras cerebrais provenientes de cirurgias de epilepsia. Mostramos que a expressão de HOP é maior em tumores de grau IV do que de tumores de baixo grau ou tecidos cerebrais não neoplásicos (Figura 15).

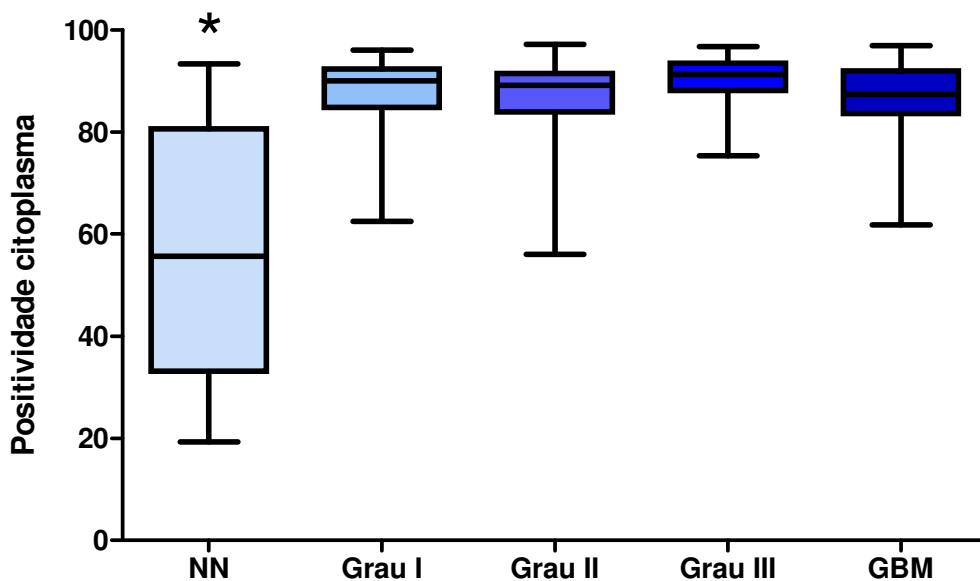


Legenda: A expressão do mRNA de HOP foi avaliada em amostras de cDNA obtidas de gliomas e tecidos não neoplásicos por meio de PCR quantitativa em tempo real. NN, tecido de SNC não neoplásico (n=17); grau I (n=23); grau II (n=25); grau III (n=17); e GBM, glioma grau IV (n=76). Os valores de expressão relativa representam os dados resultantes da fórmula $1,73^{-\Delta\Delta Ct}$. Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 15 – HOP é altamente expressa em glioblastomas

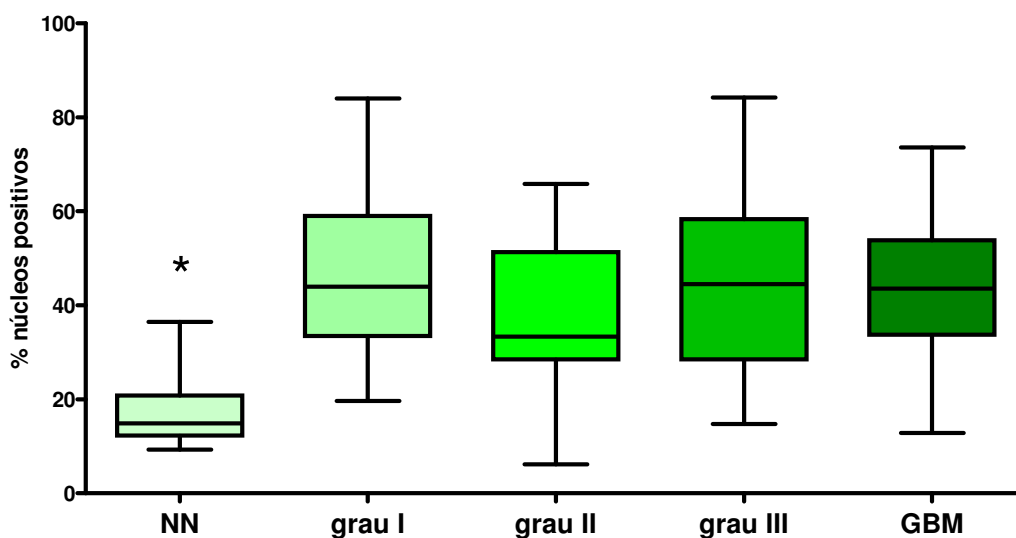
A expressão da proteína HOP foi avaliada ainda por imunohistoquímica em um grupo de amostras de gliomas arranjadas em TMA (TMA1). Nestes casos foi observado que os gliomas de grau I a IV apresentam maior expressão de HOP citoplasmática (Figura 16) quando comparados a tecido controle. Interessantemente, uma fração bastante elevada destes tumores apresenta HOP com localização nuclear (Figura 17).

Na Figura 18 é possível observar imagens representativas da marcação com anti-HOP em espécimes de tecidos não tumoral e GBM. A expressão citoplasmática aumentada de HOP bem como a presença no núcleo pode ser observada claramente.



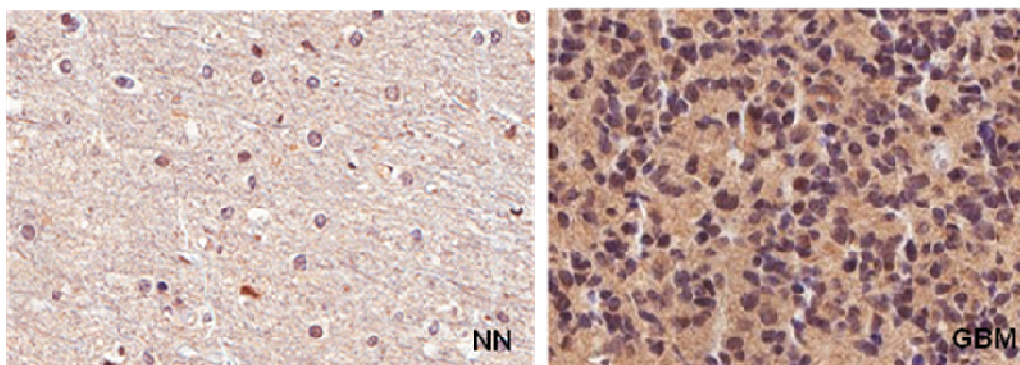
Legenda: Marcação por imunistoquímica com anticorpo anti-HOP em TMA (TMA 1) contendo 30 amostras de cada grupo de gliomas (NN, tecido cerebral não neoplásico). A quantificação foi realizada por meio do software ImageScope, do equipamento Scanscope (Aperio) e considerou a positividade citoplasmática (pixels positivos/pixels totais da imagem). Kruskal-Wallis, * $p < 0,0001$.

Figura 16 – HOP encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de gliomas.



Legenda: Marcação por imunistoquímica de HOP em TMA (TMA1) que contem 30 amostras de cada grupo (NN, tecido não neoplásico). Análise pelo software ImageScope do equipamento Scanscope (Aperio). A quantificação verifica o percentual de núcleos marcados em relação aos núcleos totais. Kruskal-Wallis, * $p < 0,0001$.

Figura 17 – Aumento da localização nuclear de STI1/HOP em gliomas.

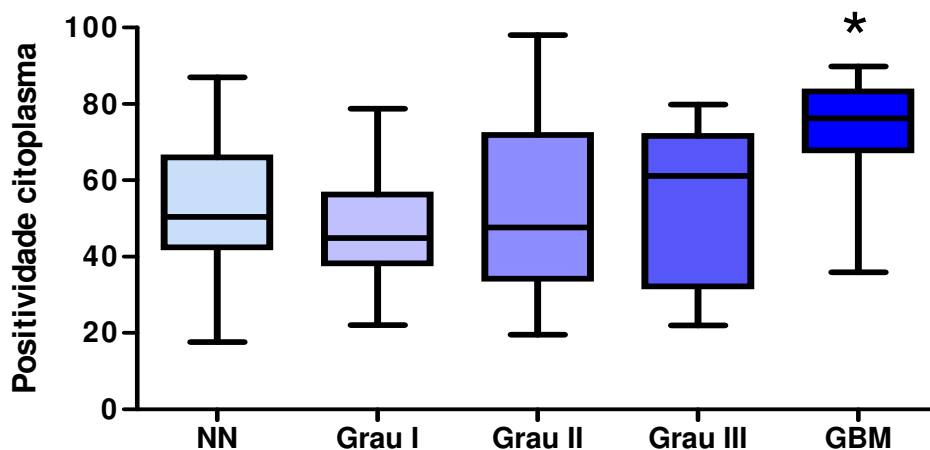


Legenda: Imagens representativas da reação imunoistoquímica com anticorpos anti-HOP. Note como a proteína é altamente expressa no citoplasma de células do tecido tumoral e a localização subcelular se torna mais nuclear.

Figura 18 – Expressão de HOP em tecido não neoplásico (NN) e em glioblastoma (GBM).

As amostras presentes no TMA descrito acima não possuem seguimento clínico, pois vieram de outra Instituição. Sua classificação anátomo-patológica, entretanto, foi confirmada por patologistas do Hospital AC Camargo.

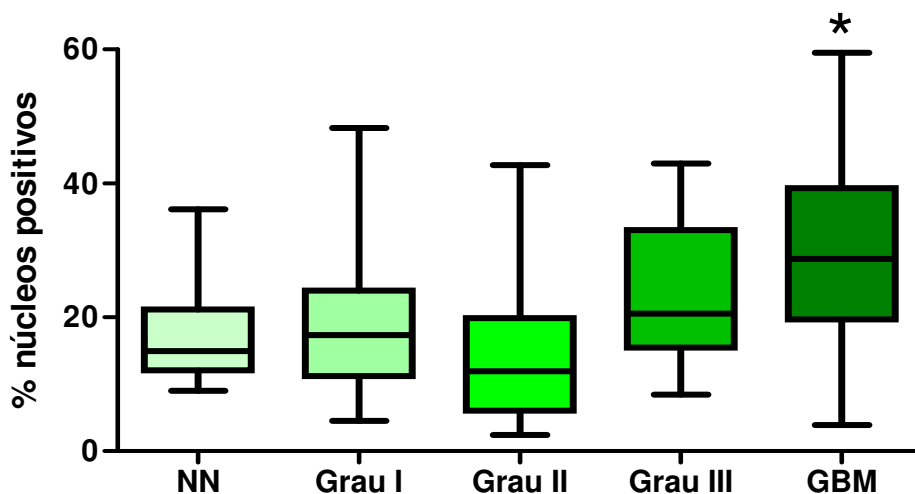
Fizemos a marcação de duas outras lâminas de TMA (TMA 2 e TMA 3) de casos do Hospital AC Camargo nas quais todas as amostras tem seguimento clínico e, portanto a expressão das proteínas pode ser comparada com os dados clínicos dos pacientes. A marcação por imunoistoquímica foi realizada com o anticorpo anti-HOP. A Figura 19 resume a análise de expressão de HOP nestas amostras.



Legenda: Marcação por imunistoquímica com anticorpo anti-HOP do TMA (TMA 2) contendo 14 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN), 34 de Grau I, 46 de Grau II, 14 de Grau III e 10 de GBMs mais o TMA 3 com 86 GBMs. A quantificação foi realizada por meio do software ImageScope, do equipamento Scanscope (Aperio) e considerou a positividade citoplasmática (pixels positivos/pixels totais da imagem). Kruskal-Wallis, *GBM vs. NN, GBM vs. Grau III: $p < 0,01$; GBM vs. Grau I, GBM vs. Grau II: $p < 0,0001$.

Figura 19 – HOP encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de glioblastomas.

A seguir foi feita a análise da positividade nuclear para HOP nestas mesmas amostras, cujos valores foram agrupados na Figura 20.



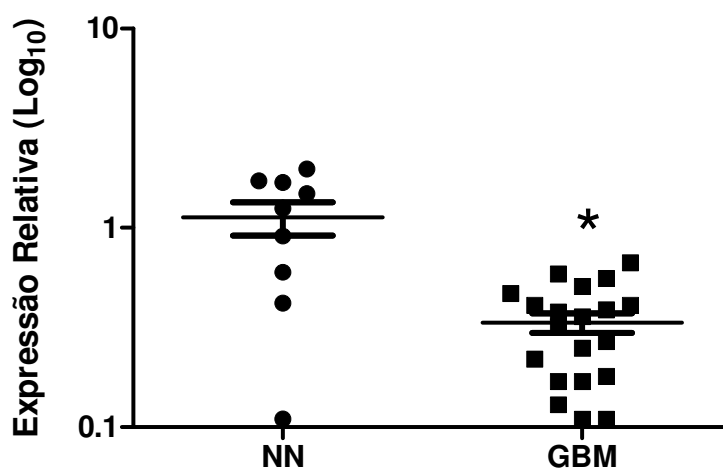
Legenda: Marcação por imunistoquímica com anticorpo anti-HOP em TMA (TMA 2) contendo 14 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN), 34 de Grau I, 45 de Grau II, 15 de Grau III e 10 de GBMs mais TMA 3 com 86 amostras de GBM. A quantificação foi realizada por meio do software ImageScope, do equipamento Scanscope (Aperio) e considerou a positividade nuclear (núcleos positivos/núcleos totais). Kruskal-Wallis, *GBM vs. NN: $p < 0,01$; GBM vs. Grau I, GBM vs. Grau II: $p < 0,0001$.

Figura 20 – Aumento da localização nuclear de STII/HOP em glioblastomas.

Os resultados obtidos neste segundo grupo de amostras TMA 2 mais TMA 3 mostram que igualmente ao que havíamos encontrado nas amostras de gliomas do TMA 1, a expressão de HOP assim como sua localização nuclear estão mais elevados nos glioblastomas quando comparados a tecido cerebral não neoplásico. Entretanto, a análise destes dois grupos de tumores não mostrou concordância quanto à expressão de HOP e sua localização nuclear nos tumores graus I a III em comparação com o grupo não neoplásico.

4.4 EXPRESSÃO DE PRP^C POR PCR QUANTITATIVO REAL-TIME E IMUNOISTOQUÍMICA EM GLIOMAS

A expressão do mRNA de PrP^C foi avaliada em um experimento piloto usando-se um grupo de 10 amostras de tecidos não neoplásicos e 20 de tecidos de glioblastoma.

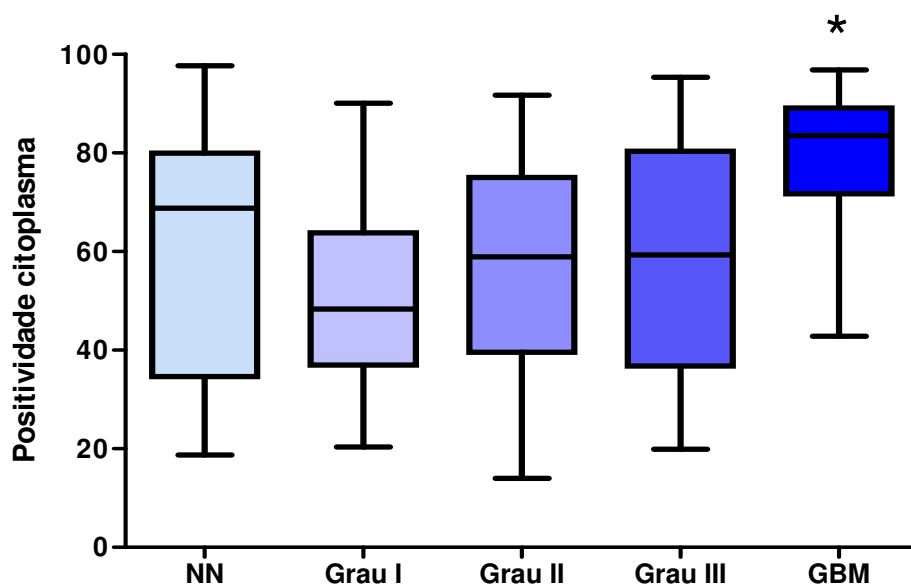


Legenda: Análise preliminar por PCR Quantitativo Real-time da expressão do mRNA de PrP^C em tecidos não neoplásicos (NN) e em gliomas grau IV (GBM). * Unpaired t test, $p < 0,0001$.

Figura 21 - A expressão relativa do mRNA de PrP^C em GBMs esta reduzida em comparação a tecidos não neoplásicos.

A quantificação do mRNA de PrP^C nas amostras avaliadas em análise piloto revelaram uma menor expressão de PrP^C em GBMs (Figura 21).

Por outro lado, a avaliação das amostras de gliomas nos TMAs 2 e 3 marcadas com anticorpo anti-PrP^C monoclonal (6H4) mostrou uma maior expressão desta proteína em glioblastomas quando comparados aos outros grupos (Figura 22).

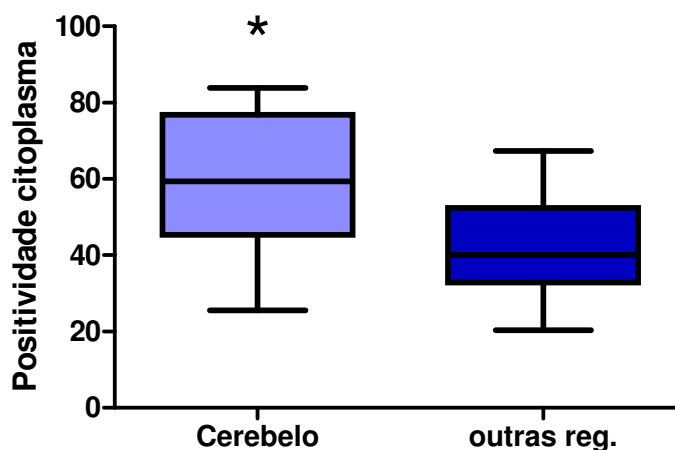


Legenda: Marcação por imunistoquímica com anticorpo anti-PrP^C em TMA (TMA 2) contendo 14 amostras de tecido cerebral não neoplásico (NN), 33 de Grau I, 46 de Grau II, 15 de Grau III e 10 de GBMs e mais TMA 3 com 86 amostras de GBM. A quantificação foi realizada por meio do software ImageScope, do equipamento Scanscope (Aperio) e considerou a positividade citoplasmática (pixels positivos/pixels totais da imagem). Kruskal-Wallis, *GBM vs. NN, $p < 0,05$; GBM vs. Grau III: $p < 0,01$ e GBM vs. Grau I, GBM vs. Grau II: $p < 0,0001$.

Figura 22 - PrP^C encontra-se altamente expressa no citoplasma de células de glioblastoma.

A localização mais comum dos astrocitomas pilocíticos juvenis (Grau I) é o cerebelo (CAMPBELL e POLLACK 1996). Utilizando os dados clínicos dos pacientes com tais tumores buscamos comparar a expressão de PrP^C em gliomas de origem cerebelar com aqueles localizados em outra regiões. Demonstramos, na

Figura 23, que gliomas grau I cerebelares possuem uma maior expressão de PrP^C quando comparados com aqueles que apresentam outras localizações.



Legenda: Comparação entre a marcação de positividade citoplasmática entre gliomas grau I com origem no cerebelo (Cerebelo) e gliomas de outras regiões cerebrais (outras reg.). * Teste t não pareado, $p=0,0386$.

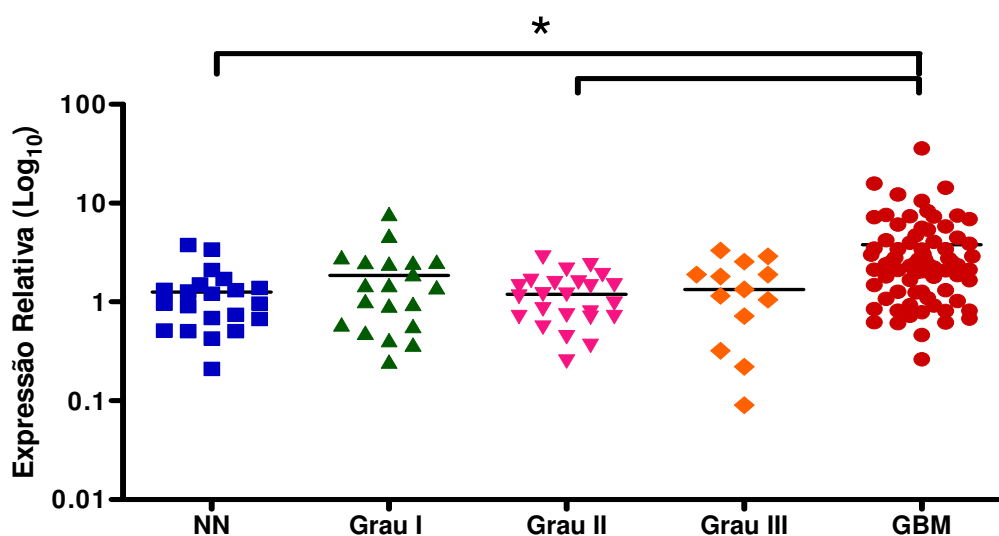
Figura 23 – PrP^C encontra-se mais expressa no citoplasma de gliomas grau I cerebelares.

4.5 EXPRESSÃO DE COMPONENTES DE SUMO POR PCR QUANTITATIVO REAL-TIME E IMUNOISTOQUÍMICA EM GLIOMAS

Nosso próximo passo foi avaliar o processo de SUMOilação em gliomas e sua correlação com expressão e compartimentalização de HOP. Para tanto, avaliamos nestes tumores a expressão da enzima E2 Ubc9 e de SUMO2 que segundo mostrado na figura 12, associa-se com maior afinidade a STI1. Inicialmente foram avaliadas as expressões destes mRNA em gliomas de grau I (23 amostras), II (26 amostras), III (18 amostras) e IV (80 amostras) que foram comparadas com 22 amostras de tecido não neoplásico. Observamos que a expressão de Ubc9 (Figura 24) é maior nos

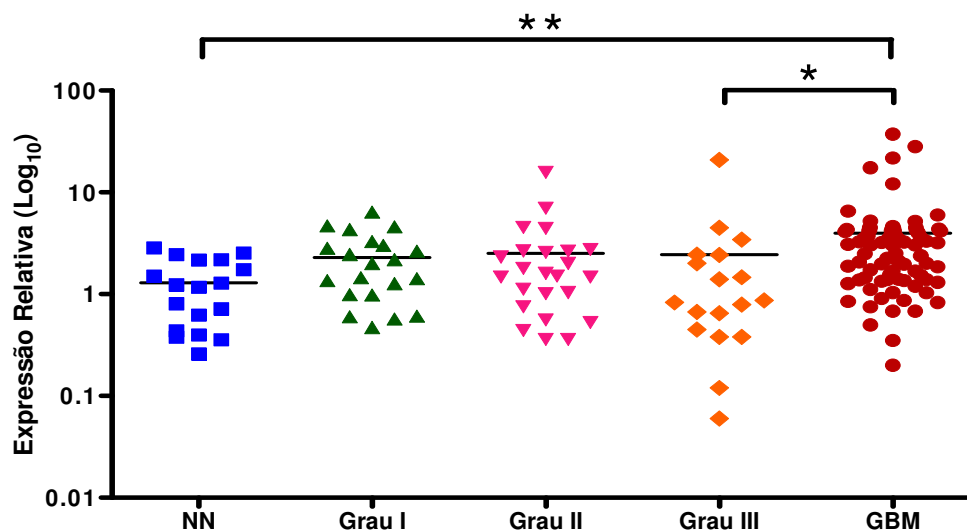
glioblastomas, se comparados ao tecido não neoplásico ou aos gliomas de grau II. Por sua vez, a expressão de SUMO2 é maior em GBM se comparado ao tecido não neoplásico e gliomas grau III (Figura 25).

De modo a validar os dados da expressão dos mRNAs de Ubc9 e SUMO2, avaliamos a expressão destas proteínas no TMA 1. Estas amostras são as mesmas avaliadas nas Figuras 16 e 17. A expressão das proteínas Ubc9 e SUMO2/3 (o anticorpo usado reconhece as duas proteínas por serem muito semelhantes) representada pela positividade nuclear foi calculada com auxílio do programa Spectrum, do equipamento Scanscope e analisada estatisticamente (Figuras 26 e 27). Os dados mostram que a positividade nuclear tanto de Ubc9 quanto de SUMO2/3 é maior em gliomas do que em tecido não neoplásico, sugerindo que há um maior processo de SUMOilação nos tecidos tumorais.



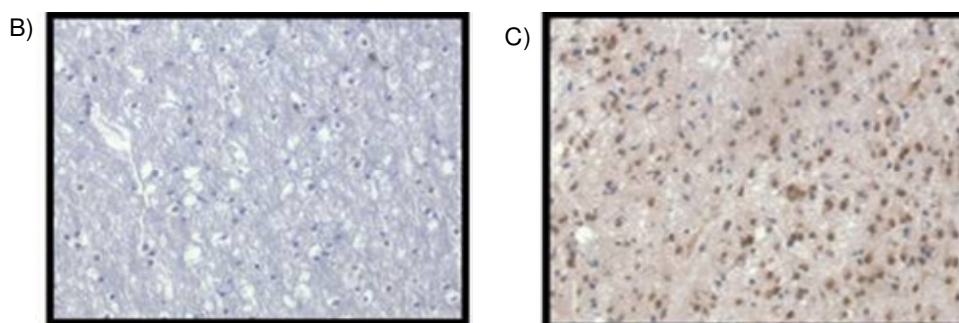
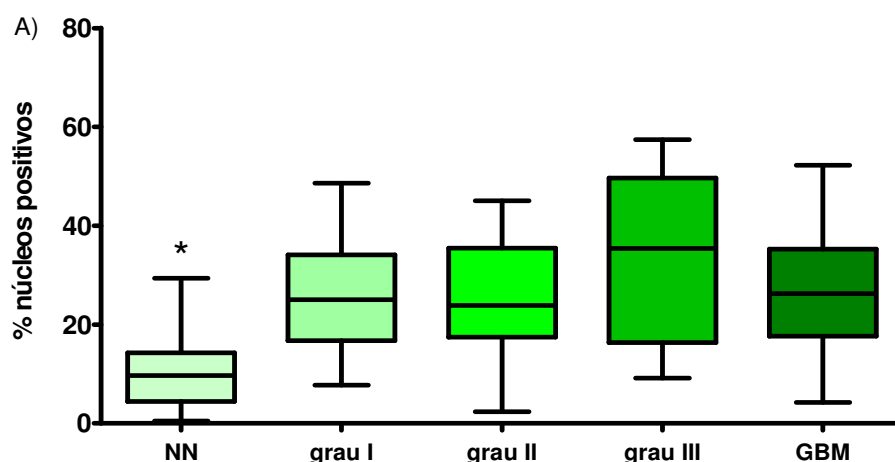
Legenda: Expressão relativa do mRNA de Ubc9 em amostras de NN, tecido de SNC não neoplásico (n=21); grau I (n=20); grau II (n=24); grau III (n=13); e GBM, glioma grau IV (n=75).. *p < 0,0001, Kruskal-Wallis.

Figura 24 – GBMs expressam concentrações maiores de mRNA de Ubc9 que gliomas Grau II e tecido não neoplásico.



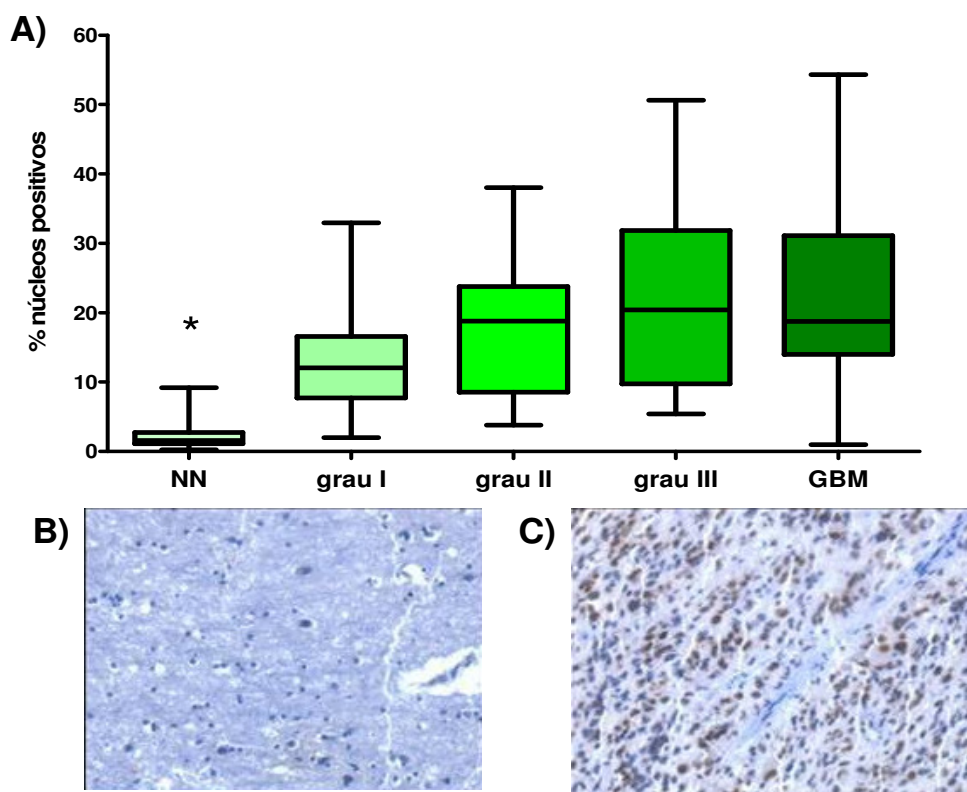
Legenda: Expressão relativa do mRNA de SUMO2 em amostras de NN, tecido de SNC não neoplásico (n=18); grau I (n=21); grau II (n=24); grau III (n=18); e GBM, glioma grau IV (n=78). A expressão de SUMO 2 em GBM é maior que em tecido NN e gliomas Grau III. Teste Kruskal-Wallis, * p<0,05; **p<0,01.

Figura 25 – Expressão de SUMO2 em GBMs é maior que em tecido não neoplásico e gliomas grau III.



Legenda: (A) Quantificação da positividade nuclear de Ubc9 por imunistoquímica em tecido não neoplásico (NN) e gliomas graus I a IV no TMA 1, usando-se o Scanscope/ Spectrum. *Kruskal-Wallis, p<0,001, NN vs. todos os graus. (B) Imagem representativa da expressão de Ubc9 em tecido não neoplásico e (C) em GBM.

Figura 26 – Positividade nuclear de Ubc9 é maior em gliomas do que em tecido não neoplásico.



Legenda: (A) Quantificação da positividade nuclear de SUMO2/3 por Imunoistoquímica em tecido não neoplásico (NN) e gliomas de graus I até IV do TMA1 usando-se o Scancope/ Spectrum. * Kruskal-Wallis, $p < 0,001$, NN vs. todos graus. (B) Imagem representativa da expressão de SUMO2/3 em tecido não neoplásico e (C) em GBM.

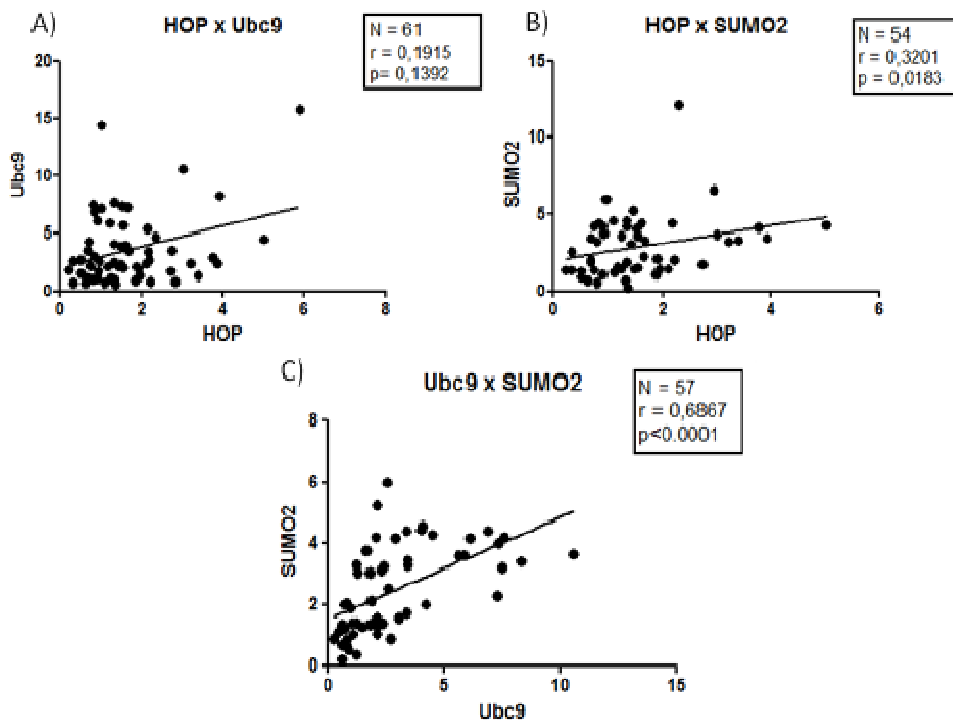
Figura 27 – Positividade nuclear de SUMO2/3 é maior em gliomas do que em tecido não neoplásico.

4.6 CORRELAÇÕES ENTRE AS EXPRESSÕES DOS MARCADORES AVALIADOS E ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA EM AMOSTRAS DE GBM

4.6.1 Expressão de mRNA

Foram realizadas análises na tentativa de avaliar possíveis correlações entre a expressão dos mRNA de HOP, Ubc9 e SUMO2 nas amostras de glioblastoma. Os gráficos contendo os valores pareados, regressão linear e valores de r de Spearman e p estão resumidos na Figura 28. Não foi observada correlação entre as expressões de

HOP e Ubc9, porém existe uma fraca correlação entre HOP e SUMO2, e uma forte correlação entre Ubc9 e SUMO2.

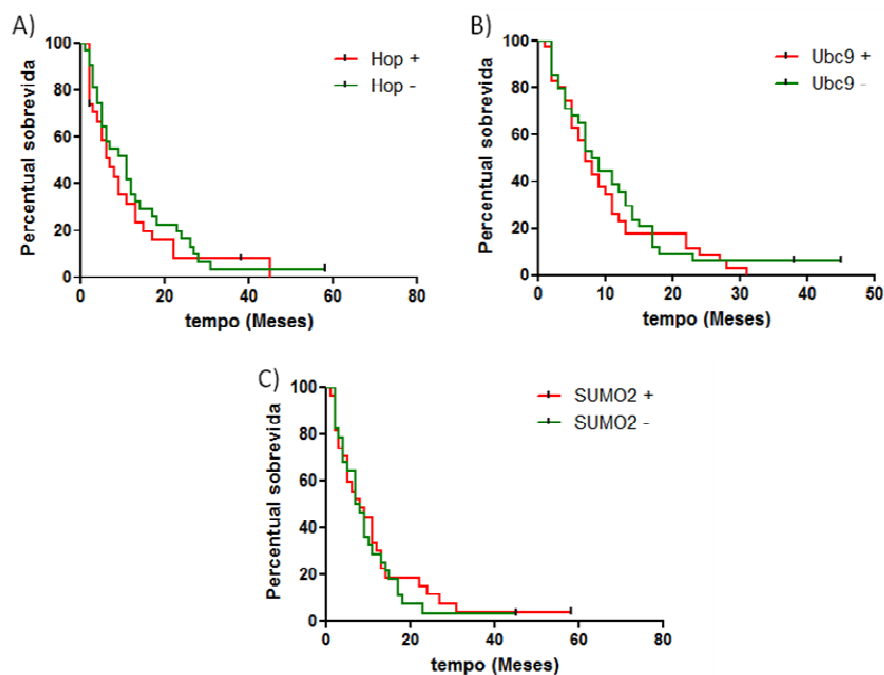


Legenda: Correlação entre a expressão dos mRNAs de (A) HOP e Ubc9, (B) HOP e SUMO2, e (C) Ubc9 e SUMO2 em GBMs.

Figura 28 – A expressão de mRNA de HOP e Ubc9 correlaciona-se com a expressão de mRNA de SUMO2.

Os valores de N, ou seja, número de amostras analisadas para cada variável, não são iguais para todas as correlações uma vez que algumas amostras deixaram de ser incluídas em alguns ensaios por problemas experimentais dentro daquele grupo.

Em seguida, com base no histórico clínico dos pacientes de GBM (Anexo 2) procuramos estimar o efeito dos diferentes graus de expressão de mRNA de HOP, Ubc9 e SUMO2 na sobrevida global. A Figura 29 demonstra as curvas de sobrevida divididas entre os pacientes com expressão acima da mediana (HOP +, Ubc9 +, SUMO2 +), e expressão abaixo da mediana (HOP -, Ubc9 -, SUMO2 -).



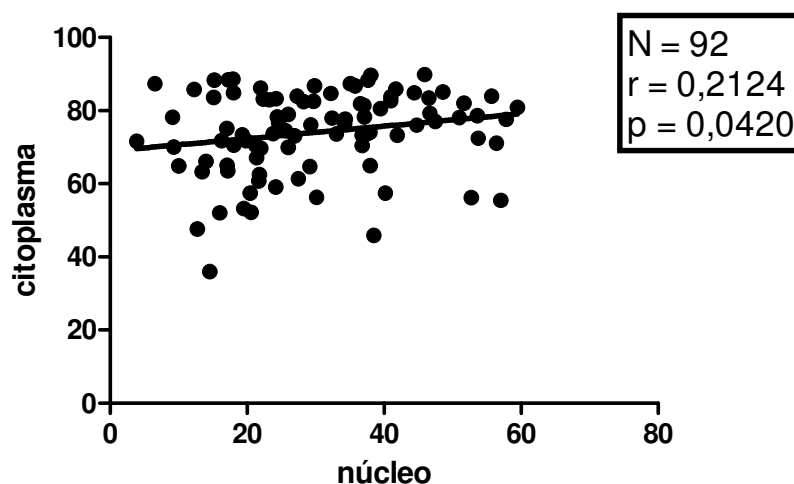
Legenda: Curvas de sobrevida global relativas à expressão de (A) HOP, (B) Ubc9 e (C) SUMO2. Os pacientes foram subdivididos segundo expressão acima do valor da mediana (+, linhas vermelhas), ou abaixo da mediana (-, linhas verdes). Não foi observada diferença estatística entre as curvas.

Figura 29 – Curvas de sobrevida global dos pacientes de GBM relativas à expressão dos mRNA de HOP, Ubc9 e SUMO2.

Não foi observada nenhuma significância estatística nas curvas de sobrevida, quando comparados os diferentes graus de expressão dos mRNAs de HOP, Ubc9 e SUMO2, usando o método de *log-rank*.

4.6.2 Expressão protéica

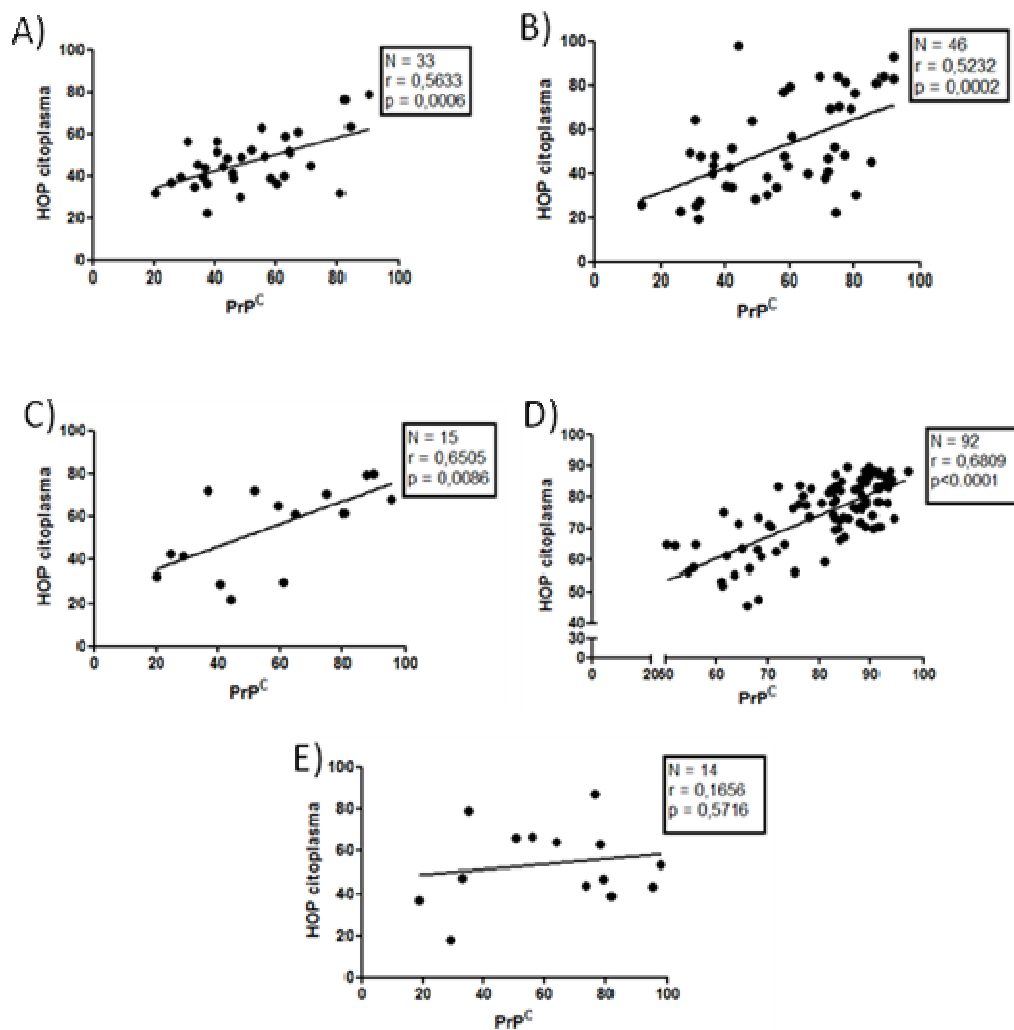
Inicialmente, avaliamos a correlação entre a expressão de HOP citoplasmática e localização nuclear nos TMAs de gliomas e GBMs representados nos TMAs 2 e 3. Há correlação positiva estatisticamente significativa apenas em GBMs (Figura 30).



Legenda: Correlação positiva entre a expressão citoplasmática e a positividade nuclear de HOP, analisadas por imunistoquímica em GBMs.

Figura 30 – Expressão de HOP no citoplasma correlaciona-se à positividade nuclear de HOP, em GBMs.

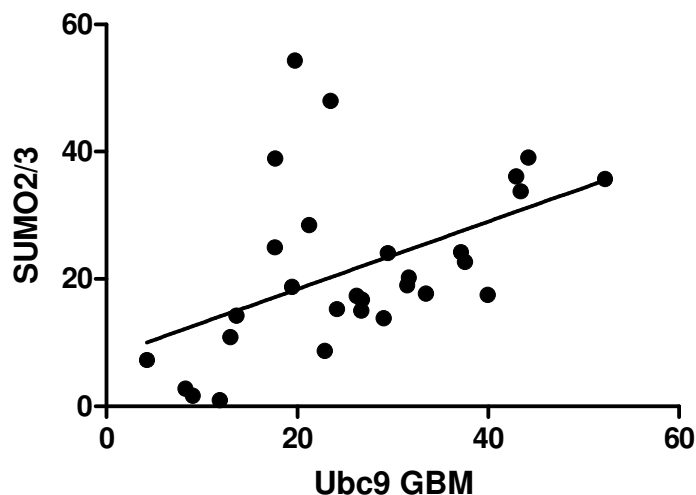
Mais adiante, verificamos se haveria correlação entre a expressão citoplasmática de HOP e expressão de PrP^C nos TMAs 2 e 3. Interessantemente, para todos os graus de gliomas foi observada uma correlação positiva estatisticamente significativa entre as expressões destas proteínas (Figura 31 A-D), mas não em tecidos não neoplásicos (Figura 31E).



Legenda: Correlação entre a expressão citoplasmática de HOP e PrP^C, analisadas por imunohistoquímica, em glioma grau I (A), grau II (B), grau III (C) e GBM (D) e tecido não neoplásico (E).

Figura 31 – Expressão citoplasmática de HOP correlaciona-se positivamente à expressão de PrP^C em gliomas

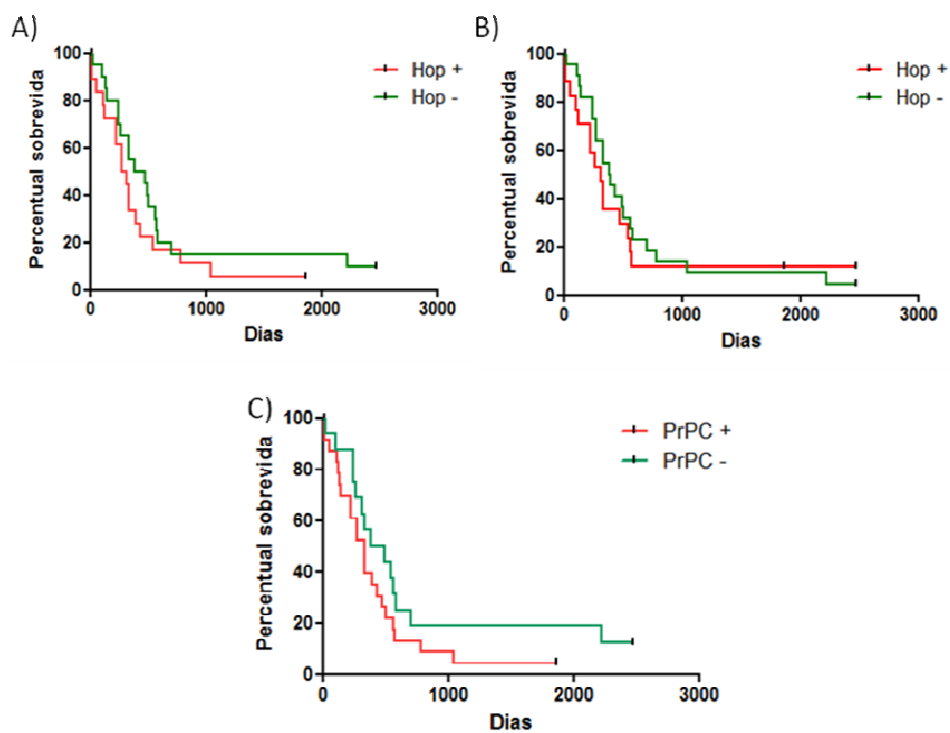
Foram ainda avaliadas as correlações entre a expressão nuclear de HOP, Ubc9 e SUMO2/3 nas amostras de GBMs do TMA 1. Uma correlação positiva entre Ubc9 e SUMO2/3 foi encontrada (Figura 32). Entretanto, não houve correlação entre a presença no núcleo de HOP e Ubc9 ou HOP e SUMO2/3 (dados não mostrados).



Legenda: Gráfico da correlação entre a positividade nuclear para Ubc9 e SUMO2/3 em glioblastomas N=29, $r = 0,4807$; $p=0,0042$.

Figura 32 – As expressões das proteínas Ubc9 e SUMO2/3 no núcleo de células de tecidos de GBMs correlacionam-se significativamente.

Finalmente, avaliamos se a expressão mais elevada de HOP e PrP^C havia modificado o perfil de sobrevida global dos pacientes de glioblastoma. Os pacientes foram subdivididos entre expressão citoplasmática de HOP ou positividade nuclear de HOP acima da mediana (HOP+), ou abaixo (HOP-), e expressão citoplasmática de PrP^C acima (PrP+) ou abaixo da mediana (PrP-). Não foi observada diferença estatística entre nenhuma das curvas, avaliadas pelo método de *log rank* (Figura 33).



Legenda: Curvas de sobrevida global relativas à expressão citoplasmática de HOP (A, N=39), positividade nuclear de HOP (B, N=40) e expressão citoplasmática de PrP^C (C, N=40). Os pacientes foram subdivididos segundo expressão acima do valor da mediana (+, linhas vermelhas), ou abaixo da mediana (-, linhas verdes). Não foi observada diferença estatística entre as curvas.

Figura 33 – Curvas de sobrevida global dos pacientes de GBM relativas à expressão citoplasmática e nuclear de HOP e expressão de PrP^C.

5 DISCUSSÃO

A hipótese inicial deste projeto baseou-se nas diferentes funções descritas para STI1/ HOP quando secretada por astrócitos (ARANTES et al. 2009) ou por tumores gliais (ERLICH et al. 2007) e atuando de forma autócrina. Sabendo-se que STI1/ HOP possui efeitos divergentes em relação à proliferação – inibindo a proliferação de astrócitos e estimulando a proliferação de gliomas malignos – ao se ligar a PrP^C, pressupomos que tal efeito pudesse ser usado em favor da identificação de um alvo terapêutico para estes tumores. Hipotetizamos que este efeito pudesse ser inibido pela porção da molécula de STI1/ HOP que se liga ao “receptor” PrP^C.

A proteína STI1/ HOP interage com PrP^C entre os aminoácidos 230 até 245, e o peptídeo que mimetiza este domínio, STI1/ HOP₂₃₀₋₂₄₅, compete pela ligação PrP^C-STI1/HOP (ZANATA et al. 2002) mas não possui efeito proliferativo (Figuras 6 e 7). Nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, fomos capazes de evidenciar que o tratamento de células de GBM da linhagem U87MG com o peptídeo STI1/ HOP₂₃₀₋₂₄₅ reduz a proliferação estimulada por STI1/HOP. Estes experimentos compilados permitiram a patente do peptídeo STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅ (patente número 20100209429).

A relevância destes resultados reflete-se também nas várias descrições do papel de chaperonas em eventos da tumorigênese, especialmente na proliferação tumoral (JEGO et al. 2010; KUBOTA et al. 2010). Evidências apontam que as chaperonas intracelulares exercem sua função usual no dobramento de proteínas clientes, por exemplo, o papel de Hsp90 em tumores tímicos epiteliais, favorecendo a expressão elevada de proteínas clientes oncogênicas como IGF-1R (BREINIG et al.

2011). Da mesma forma, as chaperonas que se encontram no meio extracelular podem atuar no processo de tumorigênese por diversos mecanismos (GRANER et al. 2009; WANG et al. 2009). A co-chaperona STI1/ HOP secretada parece se comportar de maneira concordante a outras chaperonas já descritas. Entretanto, seu mecanismo de proliferação em glioblastomas mediado pela ligação a PrP^C parece ser único. Por outro lado, HOP apresenta ainda uma intensa localização nuclear e expressão crescente conforme o grau de malignidade dos gliomas, como observado nos experimentos de imunistoquímica e PCR quantitativo em tempo real (Figuras. 15 a 20). Entretanto, o mecanismo associado à localização de HOP e o grau de malignidade dos gliomas ainda não é conhecido.

Acreditamos que o estudo se tornaria ainda mais completo se avaliássemos como a ausência de STI1/ HOP ou seu ligante na superfície celular, PrP^C, poderiam afetar a proliferação de tumores da glia. Por meio da técnica de RNAi obtivemos linhagens de U87MG silenciadas para PrP^C, e uma linhagem cuja expressão de HOP foi bastante reduzida. Como esperávamos, as células U87MG sem a expressão de PrP^C não respondem ao tratamento com STI1 com aumento de sua proliferação. Ainda, as mesmas mostraram crescimento menor quando transplantadas em camundongos *nude*. Isso demonstra a importância da expressão de PrP^C na proliferação de células de glioblastomas, assim como já evidenciado para outros tumores (LI et al. 2009; MCEWAN et al. 2009). Interessantemente as células silenciadas para PrP^C não mostram alteração na proliferação *in vitro*. Isso pode ser ocasionado pela alta concentração de soro (10%) usado para o crescimento celular e controles positivos, que mascara a resposta a proliferação dependente da interação PrP^C-STI1/HOP.

Ao contrário do esperado, na análise preliminar da expressão de mRNA de PrP^C, amostras de GBM parecem apresentar uma concentração menor deste mRNA do que as amostras de tecido não neoplásico. Este resultado pode ter sido causado pelo pequeno número de pacientes avaliados uma vez que a análise por imunistoquímica em uma casuística maior mostrou que a expressão protéica de PrP^C em GBMs é maior que aquela de tecidos cerebrais não neoplásicos. Além disso, deve-se levar em conta que a modificação nas concentrações deste mRNAs pode não ser refletida nos níveis protéicos.

Apesar de várias tentativas, não conseguimos obter linhagens de células U87MG com silenciamento total de STI1/ HOP. Estes resultados podem ser justificados pela natureza de co-chaperona desta proteína, que assim como a chaperona Hsp90 é uma proteína abundante e com funções tais que fazem com que na sua ausência as células sejam inviáveis (BORKOVICH et al. 1989). Outra possibilidade é a de que o *turn over* de STI1/ HOP seja muito lento ou a meia vida do seu mensageiro muito alta, o que também dificultaria sua depleção total. De fato, resultados ainda não publicados pelo nosso grupo apontam que camundongos *knockouts* constitutivos para STI1 são inviáveis, ocorrendo letalidade por volta dos dias 6-8 da embriogênese.

As células U87MG silenciadas parcialmente na expressão de STI1/ HOP, não demonstraram qualquer diminuição nas taxas de proliferação no período avaliado. Porém, no último ponto da curva de crescimento, dia 7, aparentemente as linhagens expressando siRNA contra STI1/ HOP possuem número um pouco menor de células totais. Isto talvez possa indicar que uma menor quantidade de STI1/ HOP pode não interferir no crescimento das U87MG quando estas se encontram em baixas

densidades, mas quando a confluência é maior a falta de STII/ HOP prejudica a proliferação. Em uma confluência maior pode haver mais STII/HOP no meio de cultura, isso poderia, portanto justificar a resposta celular tardia à depleção de STII/HOP. Esta informação é relevante se levarmos em conta a alta celularidade dos glioblastomas *in vivo*. Novamente devemos considerar ainda que, assim como ocorreu para as células silenciadas para PrP^C, as altas concentrações de soro usadas nestas culturas podem mascarar o efeito proliferativo do complexo PrP^C-STII/HOP.

Os resultados gerados nas análises das imunistoquímicas para HOP e PrP^C, nas lâminas de TMA de gliomas com seguimento clínico mostraram que gliomas de alto grau de malignidade (GBM) expressam valores mais altos destas duas proteínas. Ainda, gliomas grau I cerebelares apresentam maior expressão de PrP^C do que gliomas grau I de outras regiões cerebrais. Nossos dados não somente incluem os glioblastomas na lista de tumores que super-expressam HOP e PrP^C, como já descrito para tumores de cólon, pâncreas e ovário (KUBOTA et al. 2010; WANG et al. 2010; WALSH et al. 2011). Quando somados à forte correlação entre a expressão destas duas proteínas, com todos os graus de gliomas, mas não em tecidos não tumorais, os resultados reforçam a importância do complexo STII/HOP-PrP^C na tumorigênese e manutenção destes neoplasmas primários do sistema nervoso central.

As análises de sobrevida global relacionada à expressão e positividade nuclear de HOP e à expressão de PrP^C não mostraram diferenças significativas, embora pareça haver uma tendência a um maior risco entre os pacientes PrP^C+ (Figura 33). Em razão dos glioblastomas serem tumores extremamente agressivos e sua letalidade ser extremamente rápida torna-se mais difícil observar qualquer diferença significativa entre curvas de sobrevida.

Observando-se o conjunto de todos os resultados fica confirmada nossa hipótese de que STI1/ HOP é secretada por tumores, atua de forma autócrina estimulando sua proliferação e podendo ser inibida pela adição do peptídeo STI1/ HOP₂₃₀₋₂₄₅ ou pela própria ausência do seu ligante PrP^C. Sendo assim, o complexo PrP^C-STI1/HOP pode ser alvo terapêutico no tratamento de gliomas, fazendo do peptídeo STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅ uma excelente ferramenta para iniciar esta abordagem.

Adicionalmente, buscamos caracterizar as possíveis modificações pós-traducionais por ubiquitinação e SUMOilação em STI1/HOP e como estas modificações podem afetar a atividade e compartimentalização celular desta proteína. Nossos dados *in vitro* apontam que STI1/HOP pode sofrer SUMOilação, entretanto não pudemos demonstrar ainda o papel desta modificação de HOP no contexto celular.

Resultados usando quantificação do mRNA e das proteínas HOP, Ubc9 e SUMO2 em amostras de gliomas mostram que estas proteínas estão aumentadas nestes tipos tumorais quando comparados a tecido não neoplásico. Estes resultados são inéditos e podem sugerir a presença de SUMOilação indiscriminada nestes tumores. Dados ainda não publicados do grupo de nosso colaborador Prof. Marco Prado (Robarts Institute) mostram que a SUMOilação de STI1 pode endereçá-la para o núcleo. Portanto, a super-expressão de Ubc9 e SUMOs encontrada nos tumores gliais (Figuras 24-27) pode apresentar uma explicação para a STI1/HOP ser encontrada em localização marcadamente nuclear nos tumores da glia. É interessante notar que observamos correlação entre a expressão de mRNA de HOP e SUMO2, mas não de HOP e Ubc9. Nos experimentos de SUMOilação *ex vivo*, realizados pelo grupo do Dr. Marco Prado, a localização nuclear de STI1 era muito

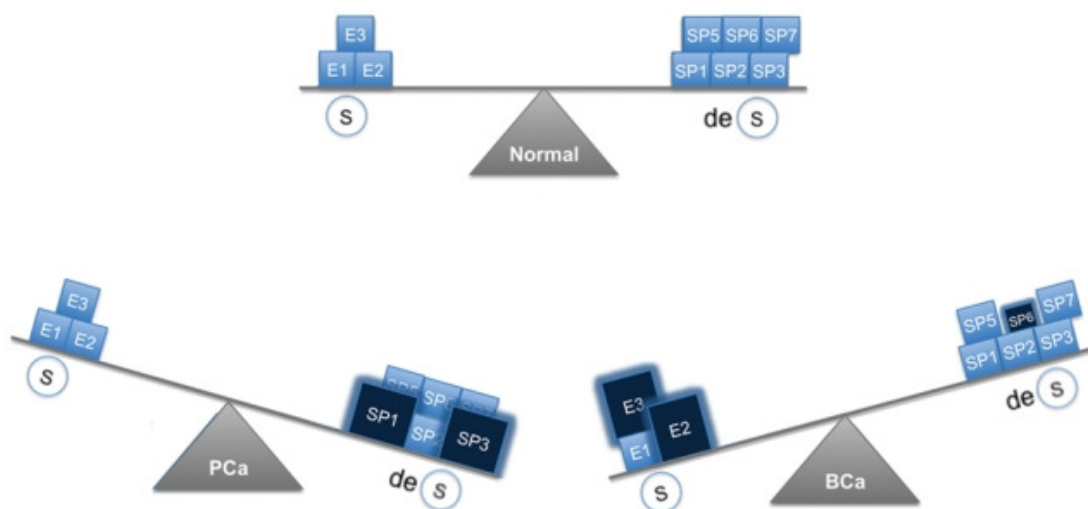
mais marcante quando as células super-expressavam ao mesmo tempo uma E3 ligase (PIAS) e SUMO, e para tanto não era necessário super-expressar Ubc9 (dados não publicados). É plausível acreditar que uma vez que STI1/HOP possui localização nuclear intensa em GBMs e se isso se deve à sua SUMOilação, uma E3 ligase de SUMO pode também estar super-expressa. De fato, em uma análise preliminar por PCR quantitativo Real Time encontramos PIAS3 super-expressa em GBMs (dados não mostrados).

A ausência de correlação entre o conteúdo protéico de STI1/HOP e dos componentes de SUMO em tumores da glia, particularmente GBMs, mostra que algum outro componente ainda não identificado pode participar deste processo.

Novamente, apesar de não termos observado diferenças na sobrevida dos pacientes de GBM que possuem expressão elevada de HOP, Ubc9 ou SUMO2, devemos ter em mente que o tempo de sobrevida global destes pacientes é extremamente baixo, com 90% de morte em 2 anos (Figura 33), o que pode ser um impedimento para a observação de diferenças significativas.

O desequilíbrio entre as enzimas que favorecem a SUMOilação e as que removem os fragmentos SUMO é considerado importante para o início e progressão de alguns tipos de câncer (YEH 2009; BAWA-KHALFE e YEH 2010). Enquanto a SUMOilação encontra-se exacerbada em tumores de mama (WANG e BANERJEE 2004; MO et al. 2005), carcinomas de próstata são marcados pela alta expressão da enzima SENP1, de de-SUMOilação (CHENG et al. 2006). Uma representação deste equilíbrio entre os componentes das vias de SUMOilação e de-SUMOilação estão mostrados na Figura 34.

Partindo dos dados revelados para tumores de mama e próstata (WANG e BANERJEE 2004; MO e MOSCHOS 2005; CHENG et al. 2006), e dos nossos resultados em gliomas, com a super-expressão de Ubc9 e SUMO2/3 surge o questionamento de qual o efeito todas essas modificações na maquinaria de SUMOilação teriam sobre os gliomas. Se um desequilíbrio está de fato ocorrendo, a presença de STI1 no núcleo pode ser apenas um indicativo de que nesta circunstância, a SUMOilação excessiva possa ser prevalente. Por outro lado, é possível que a STI1/HOP SUMOilada exerça efeitos no núcleo, como fator de transcrição, por exemplo, estimulando vias que favoreçam o crescimento ou até a invasão do tumor. A análise futura de vários outros componentes desta maquinaria poderá trazer mais conclusões neste sentido.



Fonte: BAWA-KHALFE e YEH (2010)

Legenda: A) Em células normais a SUMOilação (S) e a de-SUMOilação (de(S)) encontram-se em equilíbrio pela expressão equivalente de enzimas E1, E2 e E3, e das SENPs (SP1,2,3,5,6,7); B) Tumores de próstata (PCa) exibem menores taxas de SUMOilação por conta da super-expressão de SENP1 e 3; C) Tumores de mama (BCa) possuem SUMOilação excessiva, em razão da super-expressão de E2 (Ubc9), E3 (PIAS3) e expressão reduzida de SENP6.

Figura 34 – Formas distintas de desequilíbrio na maquinaria de SUMOilação.

6 CONCLUSÕES

- O efeito proliferativo mediado pela interação entre STI1/ HOP e PrP^C em linhagens celulares de GBM pode ser inibido *in vitro* e *in vivo* pelo peptídeo STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅;
- A expressão de PrP^C pode ser silenciada em linhagem U87MG, o que interrompe o efeito proliferativo induzido por STI1/HOP;
- As células U87MG nas quais PrP^C foi silenciado crescem menos *in vivo*;
- A expressão de STI1/HOP pode ser parcialmente silenciada na linhagem U87MG, porém há aparentemente pouca diminuição nas taxas de crescimento das células;
- A expressão de mRNA de HOP e a expressão protéica de HOP e PrP^C é mais elevada em GBMs do que em gliomas de baixo grau e tecido não neoplásico.
- STI1 pode sofrer modificação pós-traducional por SUMOilação e ubiquitinação *in vitro*;
- Amostras de gliomas obtidas de pacientes possuem maior expressão do mRNA e da protéica de STI1/HOP que tecidos não tumorais;
- Proteínas da cascata de SUMOilação, como Ubc9 e SUMO2/3, encontram-se super-expressas em gliomas, em especial nos GBM;
- A expressão de mRNA de HOP e Ubc9 correlaciona-se positivamente com a expressão de SUMO2 em GBM;
- A expressão nuclear de Ubc9 e SUMO2/3 em GBM possui correlação positiva significativa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahluwalia MS, de Groot J, Liu WM, Gladson CL. Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. **Cancer Lett** 2010; 2:139-49.

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. **Glia** 2009; 57:1439-49.

Bartek J, Hodny Z. SUMO boosts the DNA damage response barrier against cancer. **Cancer Cell** 2010; 1:9-11.

Bawa-Khalfe T, Cheng J, Lin SH, Ittmann MM, Yeh ET. SENP1 induces prostatic intraepithelial neoplasia through multiple mechanisms. **J Biol Chem** 2010; 33:25859-66.

Bawa-Khalfe T, Yeh ET. SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. **Genes Cancer** 2010; 7:748-52.

Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3919-30.

Breinig M, Mayer P, Harjung A, et al. Heat shock protein 90-sheltered overexpression of insulin-like growth factor 1 receptor contributes to malignancy of thymic epithelial tumors. **Clin Cancer Res** 2011; 8:2237-49.

Cai Q, Robertson ES. Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. **PLoS One** 2010; 5:e12636.

Cai Q, Verma SC, Kumar P, Ma M, Robertson ES. Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. **PLoS One** 2010; 5:e9720.

Campbell JW, Pollack IF. Cerebellar astrocytomas in children. **J Neurooncol** 1996; 28:223-31.

Chamberlain MC. Emerging clinical principles on the use of bevacizumab for the treatment of malignant gliomas. **Cancer** 2010; 116:3988-99.

Chen T, Yan W, Wells RG, et al. Novel inactivating mutations of transforming growth factor-beta type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. **Int J Cancer** 2001; 93:653-61.

Cheng J, Bawa T, Lee P, Gong L, Yeh ET. Role of desumoylation in the development of prostate cancer. **Neoplasia** 2006; 8:667-76.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **Embo J** 2002; 21:3317-26.

Chung CD, Liao J, Liu B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science** 1997; 278:1803-5.

Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Söti C, Csermely P, Blatch GL. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1783:1003-14.

De Witt Hamer PC. Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. **Neuro Oncol** 2010; 12:304-16.

Deng H, Lin Y, Badin M, et al. Over-accumulation of nuclear IGF-1 receptor in tumor cells requires elevated expression of the receptor and the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 404:667-71.

Desterro JM, Thomson J, Hay RT. Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. **FEBS Lett** 1997; 417:297-300.

Devarajan E, Huang S. STAT3 as a central regulator of tumor metastases. **Curr Mol Med** 2009; 9:626-33.

Devoy A, Soane T, Welchman R, Mayer RJ. The ubiquitin-proteasome system and cancer. **Essays Biochem** 2005; 41:187-203.

Dziennis S, Alkayed NJ. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. **Rev Neurosci** 2008; 19:341-61.

Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-8.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle** 2004; 3:1098-100.

Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? **Genes Dev** 2004; 18:2046-59.

Graner MW, Raynes DA, Bigner DD, Guerriero V. Heat shock protein 70-binding protein 1 is highly expressed in high-grade gliomas, interacts with multiple heat shock protein 70 family members, and specifically binds brain tumor cell surfaces. **Cancer Sci** 2009; 100:1870-9.

Grier JT, Batchelor T. Low-grade gliomas in adults. **Oncologist** 2006; 11:681-93.

Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2007; 292:H3052-6.

Hannoun Z, Greenhough S, Jaffray E, Hay RT, Hay DC. Post-translational modification by SUMO. **Toxicology** 2010; 278:288-93.

Hay RT. SUMO: a history of modification. **Mol Cell** 2005; 18:1-12.

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocr Rev** 2002; 23:175-200.

Honoré B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

INVITROGEN. **Manual Invitrogen dos vetores pLenti4/V5-DEST, pLenti6/V5-DEST, Lenti6.2/V5-DEST e pLenti6/Ubc/V5-DEST Gateway® Vector Kits: Catalog nos. V496-10, V498-10, V499-10, V368-20**, 7 June 2010. Disponível em :<URL:http://toolszh.invitrogen.com/content/sfs/manuals/plenti_dest_man.pdf> [2011 12 maio].

Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer Lett** 2010 Nov 13. [Epub ahead of print]

Jiang L, Huang CG, Lu YC, et al. Expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 in astrocytic tumors. **Brain Res** 2008; 1201:161-6.

Jiang L, Bao Y, Luo C, et al. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:211-7.

Johnson ES, Blobel G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. **J Biol Chem** 1997; 272:26799-802.

Johnson ES. Protein modification by SUMO. **Annu Rev Biochem** 2004; 73:355-82.

Kang JS, Saunier EF, Akhurst RJ, Derynck R. The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. **Nat Cell Biol** 2008; 10:654-64.

Kim JH, Choi HJ, Kim B, et al. Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. **Nat Cell Biol** 2006; 8:631-9.

Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis. **Mol Cells** 2006; 22:247-53.

Kim JH, Lee JM, Nam HJ, et al. SUMOylation of pontin chromatin-remodeling complex reveals a signal integration code in prostate cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:20793-8.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. **Cancer** 2000; 88:2887.

Kubota H, Yamamoto S, Itoh E, et al. Increased expression of co-chaperone HOP with HSP90 and HSC70 and complex formation in human colonic carcinoma. **Cell Stress Chaperones** 2010; 15:1003-11.

Li QQ, Cao XX, Xu JD, et al. The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel. **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:504-15.

Li J, Richter K, Buchner J. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. **Nat Struct Mol Biol** 2011; 18:61-6.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-728.

Longshaw VM, Baxter M, Prewitz M, Blatch GL. Knockdown of the co-chaperone Hop promotes extranuclear accumulation of Stat3 in mouse embryonic stem cells. **Eur J Cell Biol** 2009; 88:153-66.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev** 2001; 15:1311-33.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1127-38.

McEwan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. **Tumour Biol** 2009; 30:141-7.

Melchior F. SUMO--nonclassical ubiquitin. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2000; 16:591-626.

Messick TE, Greenberg RA. The ubiquitin landscape at DNA double-strand breaks. **J Cell Biol** 2009; 187:319-26.

Mo YY, Moschos SJ. Targeting Ubc9 for cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2005; 9:1203-16.

Mo YY, Yu Y, Theodosiou E, Rachel Ee PL, Beck WT. A role for Ubc9 in tumorigenesis. **Oncogene** 2005; 24:2677-83.

Morris JR. More modifiers move on DNA damage. **Cancer Res** 2010a; 70:3861-3.

Morris JR. SUMO in the mammalian response to DNA damage. **Biochem Soc Trans** 2010b; 38:92-7.

Nakagawa K, Yokosawa H. PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. **FEBS Lett** 2002; 530:204-8.

Nalepa G, Rolfe M, Harper JW. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. **Nat Rev Drug Discov** 2006; 5:596-613.

Nickel W. Pathways of unconventional protein secretion. **Curr Opin Biotechnol** 2010; 21:621-6.

Nicolet CM., Craig EA. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3638-46.

Odonuga OO, Longshaw VM, Blatch GL. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays** 2004; 26:1058-68.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem** 2001; 70:503-33.

Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochim Biophys Acta** 2004; 1695:55-72.

Poukka H, Karvonen U, Janne AO, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:14145-50.

Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Rich JN. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **Cancer** 2007; 110:13-24.

Sehat B, Tofigh A, Lin Y, et al. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. **Sci Signal** 2010; 3:ra10.

Sims JD, McCready J, Jay DG. Extracellular heat shock protein (hsp)70 and hsp90alpha assist in matrix metalloproteinase-2 activation and breast cancer cell migration and invasion. **PLoS One** 2011; 6:e18848.

Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. **Oncologist** 2006; 11:165-80.

Van Meter ME, Kim ES. Bevacizumab: current updates in treatment. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:586-91.

Walsh N, Larkin A, Swan N, et al. RNAi knockdown of Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) decreases invasion via MMP-2 down regulation. **Cancer Lett** 2011; 306:180-9.

Wang L, Banerjee S. Differential PIAS3 expression in human malignancy. **Oncol Rep** 2004; 11:1319-24.

Wang TH, Chao A, Tsai CL, et al. Stress-induced phosphoprotein 1 as a secreted biomarker for human ovarian cancer promotes cancer cell proliferation. **Mol Cell Proteomics** 2010; 9:1873-84.

Wang X, Song X, Zhuo W, et al. The regulatory mechanism of Hsp90alpha secretion and its function in tumor malignancy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:21288-93.

Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005; 6:599-609.

Wible BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K⁺ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3beta in prostate cancer cells. **J Biol Chem** 2002; 277:17852-62.

Yan S, Sun X, Xiang B, et al. Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. **EMBO J** 2010; 29:3773-86.

Yeh ET. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. **J Biol Chem** 2009; 284:8223-7.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zhuang D, Liu Y, Mao Y, et al. TMZ-induced PrPc/par-4 interaction promotes the survival of human glioma cells. **Int J Cancer** 2011 Feb 15. [Epub ahead of print]

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 06 de Novembro de 2007.

AO
MINISTÉRIO DA SAÚDE
CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA – CONEP
Dra. Gysélle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Projeto de Pesquisa nº. 991/07 – CEP Institucional
“Expressão de STII em gliomas e sua correlação com proliferação celular”.
Responsável: Dra. Vilma Regina Martins

Prezada Doutora:

Conforme determinação, encaminhamos em anexo, para apreciação dessa Comissão, os seguintes documentos requeridos pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde:

- ✓ Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- ✓ Projeto de pesquisa em português datado de Setembro de 2007 (impresso e cópia em CD);
- ✓ Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do CNS;
- ✓ Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- ✓ Justificativa da não apresentação do orçamento financeiro;
- ✓ Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- ✓ Currículo dos pesquisadores;
- ✓ Carta de aprovação do projeto pelo CEP em reunião de 09/10/2007;
- ✓ Parecer Consubstanciado do CEP referente aprovação do projeto em reunião de 09/10/2007.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Planilha de dados clínicos dos pacientes FMUSP

Diagnóstico	amostra	Sexo	Idade (Diagnóstico)	Localização do tumor	Data da cirurgia	Data de Óbito	Último Acompanh.	Time (meses)
normal	108	M	31	***	28/06/01			
normal	132	M	51	***	16/08/01			
normal	167	M	39	***	17/10/01			
normal	173	F	44	***	24/10/01			
normal	179	F	39	***	31/10/01			
normal	189	F	35	***	21/11/01			
normal	196	F	44	***	05/12/01			
normal	226	M	38	***	31/01/02			
normal	232	M	28	***	14/02/02			
normal	237	F	47	***	20/02/02			
normal	245	M	25	***	28/02/02			
normal	263	M	27	***	04/04/02			
normal	312	F	41	***	13/06/02			
normal	330	M	32	***	23/07/02			
normal	332	F	32	***	25/07/02			
normal	349	M	40	***	21/08/02			
normal	714	F	56	***	18/03/04			
normal	755	F	39	***	19/05/04			
normal	805	F	37	***	04/08/04			
normal	861	M	35	***	03/11/04			
normal	929	F	45	***	02/03/05			
normal	969	F	34	***	05/05/05			
AGI	87	F	30	cerebelo vermis HD	23/04/01		9-ago-2010	111
AGI	126	M	3	IV ventrículo	08/08/01		18-jan-10	101
AGI	131	F	4	temporal e diencéfalo direito	15/08/01		30-nov-09	99
AGI	185	M	24	cerebelo (vermis)	12/11/01		13-dez-04	37
AGI	246	M						
AGI	335	F	34	lobo frontal, diencéfalo direito e corpo caloso direito	30/07/02		18-jan-10	89
AGI	352	M	35	lobo temporal, occipital e parietal esquerdo	23/08/02		12-mai-08	68
AGI	363	M	13	lobo frontal, temporal esquerdo	18/09/02			
AGI	421	F	16		15/01/03			
AGI	436	M	18	cerebelo (vermis)	10/02/03		22-fev-10	84
AGI	445	F	34	cerebelo (vermis)	24/02/03		7-jun-10	87
AGI	463	F	16	lobo parietal, occipital direito	21/03/03		26-out-09	79
AGI	495	F	8	lobo frontal direito	21/05/03			
AGI	501	M	32	cerebelo, hemisfério direito	28/05/03		3-nov-03	5
AGI	570	F	8		09/01/03			
AGI	594	M	18		24/09/03			
AGI	601	M	21		06/10/03			
AGI	828	M	16		23/09/04			
AGI	878	F	18		29/11/04			
AGI	889	F	43	lobo frontal direito	17/12/04		29-mar-10	63
AGI	892	M	14		22/12/04			
AGI	932	M	17		07/03/05			
AGI	946	M	9		23/03/05			
AGI	995	M	22		02/07/05			
AGI	1000	M	4		13/07/05			
AGI	1044	M	8	cerebelo (vermis), hemisfério esquerdo	05/10/05		23-nov-09	49
AGI	1049	F	14	cerebelo (vermis), hemisfério esquerdo	19/10/05		31-ago-09	46
AGI	1058	M	22		04/11/05			
AGI	1121	F	27	Corpo caloso direito	28/04/06		23-nov-09	42
AGI		M	30				30-nov-09	
AGI		F	39	Frontal direito	12/02/07		7-jun-10	39
AGII	55	F	36	temporal, insula esquerdo	02/01/01		12-jul-10	114
AGII	76	M	27	lobo temporal esquerdo	23/03/01	04/12/05	29-nov-04	56
AGII	101	F	23	lobo frontal direito	04/06/01		28-abr-08	82
AGII	118	F	45	lobo frontal direito	23/07/01	30/07/03	2-jun-03	24
AGII	239	M	56	lobo frontal esquerdo	22/02/02		19-out-09	91
AGII	250	F	30	lobo frontal, parietal direito	11/03/02		14-out-02	7
AGII	254	F	24	lobo temporal esquerdo	15/03/02		28-jun-04	27
AGII	267	M	43	lobo frontal direito	01/04/02		12-abr-10	96
AGII	328	M	39	lobo parietal direito	17/07/02		22-fev-10	91
AGII	341	M	28	lobo temporal esquerdo	09/08/02	04/12/05	29-nov-04	56
AGII	346	M	23	lobo parietal direito	15/08/02	18/11/06		51
AGII	357	M	52	lobo frontal parietal, temporal insula esquerdo	09/06/02		13-mai-10	95
AGII	392	F	38	lobo parietal, corpo caloso esquerdo	11/11/02		2-ago-09	80
AGII	412	M	44	lobo frontal direito	20/12/02		12-abr-10	96
AGII	452	M	41	lobo frontal direito	10/03/03		3-set-07	53
AGII	453	M	28	lobo frontal direito	11/03/03		4-dez-06	44
AGII	456	F	43		13/03/03		1-mar-04	11
AGII	467	F	41	lobo temporal, insula, direito	27/03/03	06/09/06	17-jul-06	41
AGII	490	M	35	lobo frontal direito	13/05/03	01/08/06	15-mai-06	38
AGII	577	F	35	lobo temporal esquerdo	05/09/03		6-nov-07	50
AGII	715	F	27	cerebelo (vermis), tronco cerebral (ponte)	22/03/04	10/01/05	19-out-04	9
AGII	806	M	39	lobo frontal, parietal esquerdo	05/08/04		7-abr-08	44
AGII	999	M	25	lobo parietal, occipital direito	12/07/05		2-ago-10	60
AGII	1016	M	35	lobo frontal, temporal esquerdo	21/10/03		10-out-05	23
AGII	1095	M	32	frontal, parietal, insula, diencéfalo, corpo caloso, esquerdo	10/02/06		12-jul-10	53
AGII GBM	1099	F	32	lobo temporal, insula, esquerdo	17/02/06		21-jun-10	52
AGII	1113	M	41	lobo frontal direito	27/03/06		3-set-07	53
AGII GBM	1155	F	25	lobo temporal direito	14/07/06	14/02/10	8-fev-10	43
AGII	1159	M	20	frontal esquerdo	05/06/06		20-jul-09	37
AGII		F	54	diencéfalo esquerdo	14/04/03		30-jun-08	62
AGII		F	55	frontal direito	12/08/04		5-abr-09	55
AGII		F	20	ventrículo III	14/04/05		7-jun-10	61
AGII		M	36	frontal esquerdo	21/04/06		23-jun-08	26
AGII		M	57	lobo parietal temporal esquerdo	10/08/06		23-mar-09	31
AGII		M	44	diencéfalo esquerdo			1-dez-08	
AGII		M	26	lobo frontal, temporal, insula esquerdo	30/04/09		5-abr-10	11
AGII		M	25	Lobo frontal, parietal direito			22-fev-10	
AGII		F	60		02/05/95		22-mar-10	178
AGII		F		Lobo frontal direito			9-nov-09	

AGIII	28	M	54	lobo frontal esquerdo	30/10/00		16-fev-09	99
AGIII	34	M	18	lobo frontal, corpo caloso, direito	20/11/00		5-jul-10	115
AGIII	70	M	19	Ventriculo (VVLL) direito	05/03/01		4-mai-09	97
AGIII	73	F	25	lobo frontal, insula direito	16/03/01	19/03/07	5-mar-07	72
AGIII	233	F	58	lobo frontal, parietal, temporal, insula, direito	15/02/02	16/03/03		13
AGIII	249	M	32	lobo frontal direito	08/03/02	21/10/02	21-out-02	7
AGIII	338	F	37	lobo frontal direito e esquerdo	05/08/02	14/10/03	18-ago-03	14
AGIII	347	M	15	tronco cerebral, ponte	19/08/02		21-jun-09	82
AGIII	360	F	32	lobo frontal, parietal, corpo caloso esquerdo	13/09/02		29-mar-10	90
AGIII	366	M	37	lobo frontal, temporal, insula, esquerdo	23/09/02		19-jul-10	93
AGIII	410	M	30	lobo frontal esquerdo	19/12/02		15-jun-09	77
AGIII	428	M	58	lobo parietal esquerdo	24/01/03		19-abr-09	74
AGIII	451	M	34	lobo temporal esquerdo	07/03/03		22-mar-10	84
AGIII	478	M	39	lobo frontal e esquerdo, lobo temporal esquerdo, corpo caloso di	11/04/03	12/01/05	4-out-04	21
AGIII	514	M	37	lobo temporal, parietal esquerdo	16/06/03		4-jul-05	24
AGIII	648	M	31	cerebelo, hemisfério esquerdo	27/04/04		erro data > uc	
AGIII	734	M	31	cerebelo, hemisfério esquerdo	27/04/04		9-fev-04	1
AGIII	905	F	27	lobo temporal esquerdo	14/01/05		7-mar-05	1
AGIII	981	M	21		01/06/05			
AGIII	1033	F	29		08/09/05		28-nov-05	2
AGIII	1036	F	46	lobo temporal direito	10/09/05	12/12/05		3
AGIII	1037	M	44	parietal esquerdo	14/02/95		17-mai-10	183
AGIII	1040	F	42	lobo frontal, parietal direito	1ª 02/07/00		28-jun-10	119
AGIII		M	26	lobo frontal, parietal, corpo caloso esquerdo e direito; temporal e	17/01/08		26-jul-10	30
AGIII		M	49	Corpo caloso direito e esquerdo	30/07/09		12-abr-10	8
GBM	35	M	53	lobo temporal esquerdo, lobo occipital esquerdo	24/11/00	15/09/04	5-jul-04	45
GBM	74	M	74	lobo frontal parietal esquerdo	19/03/01	29/08/02		17
GBM	89	F	49	falta	26/04/01	21/06/04	22-abr-02	37
GBM	170	M	50	lobo frontal temporal insula esquerdo	19/10/01	10/06/02	27-mai-02	7
GBM	175	F	56	lobo temporal insula direito	26/10/01	31/03/02		5
GBM	194	M	71	lobo parietal temporal esquerdo	30/11/01	01/10/03	28-jul-03	22
GBM	201	F	49	lobo frontal parietal esquerdo	14/12/01	02/07/04	18-ago-03	30
GBM	204	F	70	lobo parietal occipital direito	21/12/01	06/08/02		7
GBM células gigantes	205	M	11	lobo frontal direito, ventrículo VVLL	02/01/02		19-jan-09	84
GBM	208	M	62	lobo frontal, temporal, insula e diencefalo (direito)	04/01/02	24/07/02		6
GBM	216	F	67	lobo temporal, occipital, corpo caloso esquerdo	18/01/02	10/06/02	8-abr-02	4
GBM	256	M	41	lobo parietal temporal direito	21/03/02	14/06/02	7-jun-02	2
GBM	269	F	65	lobo frontal direito	12/04/02	18/04/02		0
GBM	274	F	47	lobo frontal parietal esquerdo	19/04/02	27/09/03	14-out-02	17
GBM	281	M	52	lobo parietal, temporal, insula, occipital direito	30/04/02	04/08/02	17-jun-02	3
GBM	286	M	60	lobo temporal insula direito	09/05/02	17/07/03	10-jun-02	14
GBM	297	F	78	lobo temporal direito	23/05/02	02/05/03	17-jun-02	11
GBM	300	F	47	lobo frontal, parietal, corpo caloso direito	28/05/02	11/09/02	2-set-02	3
GBM	306	M	56	faltam dados clínicos	05/06/02	27/06/02		0
GBM	309	F	36	lobo frontal, parietal, temporal, insula, direito	10/06/02	12/10/03	30-jun-03	16
GBM	317	F	71	lobo temporal direito	24/06/02	15/09/02		2
GBM	321	M	63	lobo temporal esquerdo	01/07/02	27/10/03	1-set-03	15
GBM	356	M	74	lobo frontal temporal insula direito	30/08/02	23/08/03	30-jun-03	11
GBM	370	M	45	lobo parietal, occipital e temporal direito	27/09/02	04/11/03	1-set-03	13
GBM	384	M	45	lobo parietal e temporal direito, Tronco cerebral (mesencefalo)	25/10/02	14/03/03	10-fev-03	4
GBM	391	F	54	lobo parietal temporal direito	07/11/02	06/12/03	15-set-03	12
GBM	395	F	40	lobo parietal direito	18/11/02	22/01/04	4-ago-03	14
GBM	397	F	58	lobo parietal frontal esquerdo	20/11/02	30/04/03		5
GBM	401	M	54	lobo frontal esquerdo, ventrículo VVLL maior diametro 3,0cm	29/11/02	18/04/03	17-fev-03	4
GBM	405				10/12/02			
GBM	418	F	62	lobo frontal esquerdo	29/01/03	15/02/04	8-dez-03	12
GBM	427	F	51	lobo frontal esquerdo	23/01/03	13/07/03	12-mai-03	5
GBM	435	M	34	lobo frontal, parietal esquerdo	07/02/03	05/02/04	3-nov-03	11
GBM	442	M	68	lobo frontal, temporal e parietal direito	17/02/03	18/06/03		4
GBM	448	M	57	lobo parietal, temporal direito	27/02/03	20/02/05	24-nov-03	23
GBM	450	F	61	lobo temporal esquerdo	06/03/03	13/05/04	8-mar-04	14
GBM	458	M	62	lobo parietal direito	16/03/03	15/07/03	19-mai-03	3
GBM	485	M	67	lobo parietal temporal direito	01/05/03	30/11/03	24-nov-03	6
GBM	496	F	57	lobo parietal temporal direito	22/05/03	25/01/04	8-set-03	8
GBM 2ario	498	F	17	lobo frontal, parietal e temporal direito	26/05/03	15/10/03	25-ago-03	4
GBM	503	M	63	lobo parietal e occipital direito, corpo caloso bilateral	02/06/03	25/08/03	14-jul-03	2
GBM	510	M	56	lobo parietal direito	10/06/03	28/05/05	18-abr-05	23
GBM	513	M	39	lobo frontal esquerdo	13/06/03	19/10/03	1-set-03	4
GBM	522	M	48	lobo temporal esquerdo	27/06/03	20/07/05	24-mai-04	24
GBM	524	F	59	lobo frontal direito	30/06/03	11/03/04	13-out-03	8
GBM	547	M	71	lobo parietal e temporal direito	31/07/03	15/09/04	26-abr-04	13
GBM	555	M	57	***	14/08/03	16/02/05		18
GBM	573	M	50	lobo frontal, parietal, temporal, insula esquerdo	03/09/03	04/06/04	8-mar-04	9
GBM	592	F	40	lobo frontal direito	24/09/03		25-jun-07	45
GBM	595				25/09/03	04/06/04		
GBM	614							
GBM	629	M	64	lobo frontal esquerdo	11/11/03	15/01/05	6-dez-04	14
GBM	632	F	41	lobo frontal esquerdo	13/11/03	23/03/06	6-mar-06	28
GBM	638	M	55	lobo frontal, parietal e occipital direito	20/11/03	28/01/04		2
GBM	640	F	58	lobo temporal esquerdo	21/11/03	13/05/04	22-mar-04	5
GBM	642	M	42	lobo parietal e temporal direito	22/11/03	04/05/05	25-abr-05	17
GBM	652	F	66	lobo parietal, temporal, insula e occipital direito	08/12/03	06/05/04		4
GBM	655	M	68	lobo parietal, temporal e insula esquerdo	12/12/03	04/05/05		16
GBM	663	M	66	lobo parietal e occipital direito	05/01/04	06/08/04	26-jul-04	7
GBM	675	F	41	lobo frontal esquerdo	29/01/04		16-nov-09	69
GBM	684	F	56	lobo parietal e occipital esquerdo	12/02/04	18/05/04	15-mar-04	1
GBM	687	M	45	lobo parietal direito	16/02/04	28/12/04	22-nov-04	9
GBM	698	M	58	***	27/02/04	15/12/04	18-out-04	7
GBM	720				26/03/04	13/05/04		
GBM	724	F	62	***	08/04/04			0
GBM	743	M	52	frontal bilateral	06/05/04	16/07/04	21-jun-04	2
GBM	750	M	51	lobo temporal esquerdo	13/05/04	25/11/04		6
GBM	792	M	35	lobo parietal e temporal direito	16/07/04	14/01/05		5
GBM	795	M	39	lobo frontal, parietal, temporal, insula, diencefalo direito e mesencefalo	22/07/04	18/07/05	20-jun-05	11

57	Microfilme	II	F	27	Frontal / Temporal	Não	02/08/1995	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não	14/08/95	Não
58	Microfilme	II	F	27	Frontal / Temporal	Não	02/08/1995	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não	14/08/95	Não
59	Microfilme	II	M	45	Vias ópticas	Não	21/08/1995	Parcial	Não	Sim	04/10/95 - Radical	Não	Sim	06/02/96	Não
60	SPOOL	II	F	10	Frontal	Não	01/05/1989	Outro Serviço	Não	Sim	jul/92 e ago/95	Não	Sim	U.C. - 13/09/10	Não
61	SAME	II	M	1	Temporal	Não	26/12/1995	Parcial	Sim	Sim	15/03/96 - Radical	Não	Sim		Não
62	SPOOL	II	M	28	Temporal	Não	01/02/1996	Subtotal	Sim	Sim	Não	Não	Sim	27/12/99	Não
63	Microfilme	II	F	7	Temporal	Não	15/02/1996	Parcial	Sim	Não	Não	Não	Não	13/08/96	Não
64	SPOOL	II	M	24	Frontal	Não	25/06/1996	Parcial	Não	Sim	Não	Não	Não	U.C. - 17/02/97	Não
65	SPOOL	II	M	63	Talamo	Não	08/10/1996	Total	Não	Não	Não	Não	Não	U.C. - 18/10/96	Não
66	SPOOL	II	F	14	Cerebelar	Não	09/05/1997	Subt. (O.Serv)	Não	Não	05/12/97 - Radical	Não	Sim	U.C. - 17/09/01	Não
67	SPOOL	II	M	36	Fronto-parietal	Não	05/07/1991	Total	Não	Sim	01/02/95 e 19/11/97	Não	Sim	U.C. - 17/05/98	Não
68	SPOOL	II	M	42	Temporal	Não	24/05/1998	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	U.C. - 15/05/08	Não
69	SAME	II	M	28	Temporal	Não	15/10/1998	Radical	Não	Sim	Não	Não	Não	U.C. - 21/06/2011	Não
70	SPOOL	II	F	14	Temporal	Não	02/03/1999	Radical	Sim	Não	Não	Não	Não	U.C. - 21/09/09	Não
71	Microfilme	II	F	29	Frontal	Não	02/03/2000	Subtotal	Não	Sim	23/05/03 - Radical	Sim	Sim	19/09/05	Não
72	SEM REGISTRO	II													
73	SPOOL	II	M	10	Bulbo cervical	Não	01/10/2000	Parcial	Não	Sim	Não	Não	Sim	U.C. - 06/09/03	Não
74	SAME	II	M	29	Temporal / Parietal	Sim	29/08/1994	outro serviço	Não	Sim	06/12/2000 - subtotal	Não	Sim	U.C. - 29/06/2011	Não
75	SPOOL	II	M	46	Frontal	Não	12/02/2001	Parcial	Sim	Sim	24/06/04 - recidiva	Não	Sim	U.C. - 30/06/04	Não
76	Microfilme	II	M	27	Frontal	Não	01/04/1999	Outro Serviço	Sim	Sim	30/05/01 - Radical	Não	Sim	26/06/02	Não
77	SPOOL	II	F	31	Frontal	Não	04/06/2001	Radical	Sim	Não	mar/2002 - recidiva reg.	Não	Sim	U.C. - 24/10/02	Não
78		II													
79	Microfilme	II	F	63	Temporal	Não	21/08/2001	Radical	Não	Não	Não	Não	Não	28/08/01	Não
80	SAME	II	M	39	IV Ventriculo	Não	16/10/2001	Radical	Não	Não	Não	Não	Não	U.C. - 18/01/10	Não
81	SPOOL	II	M	32	Temporal	Não	27/11/1990	Parcial	Não	Sim	03/12/03 - recidiva	Não	Sim	U.C. - 25/01/04	Não
82	Microfilme	II	F	35	Frontal	Não	02/10/2002	Subtotal	Sim	Sim	Não	Não	sem possibilidades cirur	22/08/04	Não
83	SAME	II	M	32	Frontal	Não	01/12/2002	Parcial (O.Serv)	Sim	Sim	18/03/03 - Radical	Não	Sim		Não
84	SAME	II	F	49	Frontal	Não	25/03/2003	Radical	Não	Não	Não	Não	Não	U.C. - 04/04/2011	Não
85	Microfilme	II	M	46	Pineal	Não	01/02/1990	Outro Serviço	Sim	Sim	26/06/03 - Radical	Não	Sim	29/11/03	Não
86	SAME	II													
87	SPOOL	II	M	30	Frontal	Não	04/06/1996	Subtotal	Sim	Sim	09/09/03 - 15/01/08	Não	Sim	U.C. - 04/03/2009	Não
88	Microfilme	II	F	55	Frontal	Não	09/08/1994	Subtotal	Não	Não	14/10/03 - Radical	Não	Sim	04/04/04	Não
89	Microfilme	II	F	57	Talamo	Não	26/06/1905	Irressecável	Sim	Sim	Não	Não	Não	07/03/09	Não
90	SAME	II													
91	SAME	II	M	33	Frontal	Não	10/08/2000	Subtotal	Não	Sim	01/07/04 - Radical	Não	Sim	U.C. - 18/03/11	Não
92	SAME	II													
93		III													
94	Microfilme	III	F	15	Frontal	Sim	04/09/1986	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não	U.C. - 06/11/2000	Não
95	SAME	III	M	24	Cerebelar	Não	24/10/1988	Parcial	Sim	Sim	Não	Não	Não		Não
96	Microfilme	III	F	17	Cerebelar	Não	21/01/1997	Parcial	Não	Não	Não	Não	Não	26/01/97	Não
97	SAME	III	M	39	Frontal / Temporal	Não	25/06/1997	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não		Não
98	Microfilme	III	M	40	Temporal	Não	01/01/1998	Parcial	Sim	Sim	20/05/98 - Radical	Não	Sim	17/12/99	Não
99	SAME	III	M	78	Frontal	Não	17/05/1999	esterotaxica	Não	Não	Não	Não	Não		Não
100	SAME	III	M	53	Temporal	Não	17/06/1905	Outro Serviço	Sim	Não	Não	Não	Não		Não
101	Microfilme	III	M	27	Frontal	Não	01/04/1999	Outro Serviço	Sim	Sim	30/05/01 - Radical	Não	Sim	26/06/02	Não
102		III													
103	Microfilme	III	F	35	Frontal	Não	02/10/2002	Subtotal	Sim	Sim	Não	Não	sem possibilidades cirur	22/08/04	Não
104	SPOOL	III	F	17	Fronto-parietal	Não	21/01/2003	esterotaxica	Não	Não	Não	Não	Não	08/08/03	Não
105	SAME	III	F	35	Frontal	Não	01/07/1997	Outro Serviço	Sim	Sim	fev/04 - Radical	Sim	Sim		Não
106		III													
107		III													
108	SPOOL	III	M	53	Temporal	Não	01/11/2001	Outro Serviço	Não	Não	26/08/03 - Radical	Não	Sim		Não
109	SAME	III	F	35	Frontal	Não	01/07/1997	Outro Serviço	Sim	Sim	fev/04 - Radical	Não	Sim		Não
110	SPOOL	III	F	34	Frontal	Não	10/02/2004	Outro Serviço	Sim	Sim	21/05/2008 - Radical	Não	Sim	U.C. - 04/10/2010	Não
111	Microfilme	IV	F	62	Temporal	Não	21/03/1989	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não	07/04/89	Não
112		IV													
113		IV													
114	SPOOL	IV	M	36	Fronto-parietal	Não	05/07/1991	Total	Não	Sim	01/02/95 e 19/11/97	Não	Não	U.C. - 17/05/98	Não
115	Microfilme	IV	F	72	Frontal	Não	31/08/1994	Parcial	Não	Sim	Não	Não	Não	25/07/95	Não

177		IV																	
178		IV																	
179		IV																	
180		IV																	
181		IV																	
182		IV																	
183		IV																	
184		IV																	
185	Microfilme	IV	M	66	Fronto-parietal	Não	28/11/2000	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	22/04/01	Não			
186	Microfilme	IV	F	6	Frontal	Não	26/01/2001	Radical	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	19/12/03	Não			
187	Microfilme	IV	M	60	Frontal	Não	01/04/2000	Subtotal	Não	Sim	01/03/01 - Radical	Não	Sim	19/08/01	Não				
188	Microfilme	IV	M	37	Temporal	Não	27/06/2001	Radical	Sim	Sim	Não	Não	Sim	11/06/03	Não				
189	Microfilme	IV	F	60	Frontal	Não	16/10/2000	Subtotal	Sim	Sim	28/08/01 - Radical	Não	Sim	13/05/02	Sim				
190	SPOOL	IV	M	50	Frontal / Temporal	Não	25/09/2001	Subtotal	Não	Não	Não	Não	Não	02/10/01	Não				
191		IV																	
192	Microfilme	IV	M	43	Fronto-parietal	Não	29/12/2000	Subtotal	Não	Sim	13/11/2001 - Radical	Sim	Sim	27/02/03	Não				
193	Microfilme	IV	F	57	Frontal	Não	01/12/1996	Subtotal	Sim	Sim	mai/02 - Radical	Não	Sim	27/01/03	Sim				
194	Microfilme	IV	F	68	Frontal	Não	06/03/2002	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	02/12/02	Não				
195	Microfilme	IV	F	53	Temporal	Não	12/06/2002	Radical	Não	Sim	Não	Não	Não	11/12/03	Não				
196		IV																	
197	Microfilme	IV	M	70	Frontal	Não	19/06/2002	Subtotal (2 tu)	Sim	Sim	Não	Não	sem possibilidades cirur	13/01/04	Não				
198		IV																	
199	Microfilme	IV	M	69	Frontal	Não	17/07/2002	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	02/11/03	Não				
200	Microfilme	IV	M	31	Temporal	Não	02/07/1997	Subtotal	Não	Sim	14/08/02 - Radical	Não	Sim	U.C. - 02/09/02	Não				
201	Microfilme	IV	F	36	Frontal	Não	22/01/2003	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	13/05/03	Não				
202	Microfilme	IV	M	52	Fronto-parietal	Não	25/02/2003	Radical	Não	Não	Não	Não	Não	02/07/03	Não				
203	Microfilme	IV	F	65	Temporal	Não	04/04/2003	Radical	Não	Sim	Não	Não	Não	04/01/04	Não				
204	Microfilme	IV	F	52	Frontal	Não	14/02/2003	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	Não	19/09/03	Não				
205	Microfilme	IV	M	57	Frontal	Não	25/06/2003	Subtotal	Não	Sim	Não	Não	sem possibilidades cirur	16/03/04	Não				
206	Microfilme	IV	M	44	Fronto-parietal	Não	05/10/2003	Radical	Não	Sim	Não	Não	Não	21/11/03	Não				

Anexo 4 - Artigo a ser submetido à revista Nature Medicine

Blockage of cellular prion- STI1/hop interaction by synthetic peptide induces arrest of malignant glioma *in vivo*

Lopes, M. H.^{*1,2}, Queiroz, N. G. T.^{*1,2}, Wasilewska-Sampaio, A. P.², Costa-Silva B.^{1,2}; Inda, M.D.³, Santos, T.G.^{1,2}; Furnari, F.³; Marie S. K. N.⁴; Martins, V. R.¹

¹Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil;

²Centro Internacional de Ensino e Pesquisa-Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brazil;

³ Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego, California, U.S.A;

⁴ Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

* These authors contribute equally for this work.

Corresponding author: Dr. Vilma Regina Martins, International Center for Research and Education, A. C. Camargo Hospital, Rua Tagua 440, 01508-010, São Paulo, Brazil. Phone 55-11-21895000 ext 2973 e-mail vmartins@cipe.accamargo.org.br

Running title: STI1/hop peptide arrests glioblastoma growth *in vivo*

Abbreviations: PrP^C - cellular prion protein, STI1/hop (Stress inducible protein 1/hsp70-hsp90 organizing protein).

Keywords: PrP^C/STI1-hop/proliferation/glioblastoma/xenograft/peptide

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 03/13189-2) and Howard Huges Medical Institute (HHMI 55005517). Fellowships from FAPESP to T.G. Santos, N.G.T. Queiroz and B.C Silva, are gratefully acknowledged. Fellowship from CAPES to A. P. Wasilewska-Sampaio is gratefully acknowledged.

Abstract

A main concern in cancer therapy is resistance of tumors such as glioblastoma to current treatments protocols. Here, we report that glioblastoma proliferation mediated by cellular prion protein (PrP^C)- secretable STI1/hop (Stress inducible protein 1/hsp70-hsp90 organizing protein) interaction, is blocked by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, which mimics PrP^C binding site, in tumor cells *in vitro* and in malignant glioma *in vivo*. Both STI1/hop and PrP^C are highly expressed and co-localize in glioblastoma cells (U87MG). STI1/hop is secreted by U87MG either cultured *in vitro* or xenografted orthotopically. *In vitro*, proliferative effect induced by recombinant STI1/hop was inhibited by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅, an irrelevant peptide from STI1/hop amino-terminal domain (STI1/hop₆₁₋₇₆) had no effect. Most importantly, local therapy of established U87MG orthotopic xenograft with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ significantly delayed tumor growth and improved survival on nude mice. Consequences of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ treatment *in vivo* were strongly decreased cell proliferation and U87MG cells sensitization for apoptosis, which can contribute to the observed anti-tumor effects. Interestingly, real time RT-PCR and tissue microarray from surgical samples demonstrated that STI1/hop gene expression is significantly enhanced in high-grade gliomas (grades III and IV) when compared to non-tumoral tissues, which renders it a powerful tumor marker. Thus, STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ is promising candidate for cancer therapy by acting as adjuvant for currently established medications.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive subtype of adult human brain tumors. It is a high-grade WHO class (IV) tumor that usually presents in the sixth or seventh decade of life and carries an average prognosis of < 12 months (Stark *et al.*, 2005;Louis, 2006). This dismal prognosis is due in part to the lack of available therapeutic agents to eliminate the diffuse glioma infiltrate that remains in the brain after surgical resection (Hou *et al.*, 2006;Santarelli *et al.*, 2007). These cancers exhibit a relentless malignant progression characterized by uncontrolled cellular proliferation, diffuse infiltration, propensity for necrosis, robust neovascularization and resistance to traditional and newer target therapeutic approaches (Furnari *et al.*, 2007). The aggressive cancer-cell phenotype is the result of a variety of genetic and epigenetic alterations, leading to deregulation of intracellular signaling pathways (Ponder, 2001). Such alterations include an impaired ability of the cancer cell to control its proliferation, which makes imperative the development of novel treatment strategies able to regulate tumor growth. Adult patients undergoing treatment for cancer typically report cognitive symptoms, soon after initiating treatment. Patients normally exhibit progressive deficits, such as difficulties with memory and attention, visual motor processing and quantitative skills [Dietrich *et al.*, 2008; Strother, 2002]. Neurocognitive evaluations in patients who survive >12 months following radiotherapy have yielded conflicting results.

Interestingly, our group has described that the interaction of STI1 (stress-inducible protein 1) to cellular prion (PrP^C) leads to the activation of several signal transduction pathways, some of which modulate cell survival (Linden *et al.*, 2008). STI1, also referred as hop (hsp70-hsp90 organizing protein) for the human homologue, is a 543-residue co-chaperone of 66 kDa that binds to both Hsp70 and Hsp90 and modulates their activities (Odunuga *et al.*, 2004;Song and Masison, 2005). Despite its mainly cytoplasmic localization, STI1/hop is found in nuclear transcription complexes and can be constitutively secreted (Odunuga *et al.*, 2004;Eustace and Jay, 2004a;Erlich *et al.*, 2007;Lima *et al.*, 2007) to interact membrane-attached PrP^C through binding sites mapped within PrP^C₁₁₃₋₁₂₈ and STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ (Zanata *et al.*, 2002;Lopes *et al.*, 2005). The binding of PrP^C to hop/STI1 produces neuroprotective, neuritogenic and proliferative effects through PKA, Erk and PI3K pathways, respectively (Zanata *et al.*, 2002;Chiarini *et al.*, 2002;Lopes *et al.*, 2005;Erlich *et al.*,

2007), among which the activation of MAP kinase pathways was shown to depend on endocytosis (Americo *et al.*, 2007;Caetano *et al.*, 2008). We still showed that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, which corresponds to the PrP^C binding site, has a potent enhancing effect on memory consolidation (Coitinho *et al.*, 2007).

Strikingly, STI1/hop was shown to be secreted by HT-1080 fibrosarcoma cells together with its partner Hsp90, suggesting that these proteins may form extracellular active complexes related to tumor invasiveness (Eustace *et al.*, 2004a;Eustace *et al.*, 2004b). Furthermore, two of major STI1/hop ligands, Hsp70 and Hsp90, have been associated to gliomas physiology. Interestingly, the depletion of Hsp70 using anti-sense adenovirus approach eradicates orthotopic xenografts of glioblastoma in immunodeficient mice (Nylandsted *et al.*, 2002) and Hsp90 antagonists potentiate chemotherapy for human glioblastomas cells (Ohba *et al.*, 2009).

Remarkably, clear evidence has pointed out for a role of STI1/hop-PrP^C interaction on growth of human glioblastoma-derived cells (Erlich *et al.*, 2007) but not on healthy astrocytes (Arantes *et al.*, 2009). It has been shown that secreted STI1/hop is able to induce PrP^C-dependent proliferation on human glioblastoma cell lines through MAPK and PI3K pathways (Erlich *et al.*, 2007), indicating that the blockage of STI1/hop-PrP^C binding could be an interesting therapeutic target for brain tumors. Given that *in vitro* experiments showed that PrP^C-STI1/hop interaction can be almost completely blocked by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, which corresponds to PrP^C binding site (Zanata *et al.*, 2002), and that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide had no effect upon glioma proliferation (data not show) we speculate that this peptide could be a promising candidate for preventing gliomas proliferation mediated by STI1/hop. Thus, the purpose of this study was to evaluate the treatment effectiveness of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide in orthotopic murine xenograft model of glioblastoma and monitoring the cognitive performance of those animals. Here, we used the guide-screw system that facilitate repeated and precise intratumoral injections of the STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ into intracerebral tumor xenografts in mice (Lal *et al.*, 2000). The current study demonstrates for the first time the therapeutic efficacy of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide for the inhibition of intracranial human glioma growth mediated by STI1/hop-PrP^C engagement.

Material and Methods

Cell and tumor culture: The human U87MG or A172 glioblastoma cell lines (ATCC) were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS. To generate conditioned medium, sub-confluent cultures were incubated in serum-free DMEM F12 (Gibco) for 48h at 37°C and 5% CO₂. The medium was centrifuged (2000xg) and filtered to remove cellular debris and concentrated 50-fold using Minicon concentrators (Millipore).

After aseptically resected, tumor specimens were washed three times in cold HBSS Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen) containing garamycin (4ug/ml). The tumor samples were cultured in DMEM-F12 supplemented with B27 (Gibco, 1:50) in six well microplates for 48h at 37°C and 5% CO₂. The medium was centrifuged (2000xg) and filtered to remove cellular debris.

Proteins and peptides: Mouse recombinant STI1 (His₆-STI1) was purified as described previously (Zanata *et al.*, 2002). The human STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide (ELGNDAYKKKDFDTAL), and an irrelevant amino-terminal peptide STI1/hop₆₁₋₇₆ (GCKTVDLKPDWGKGYG) were chemically synthesized by Genescript.

Cell proliferation assay: Cells were plated overnight on 24-well plates with glass coverslips, at a density of 1.5×10^4 cells per well, with DMEM supplemented with 10% FCS (fetal calf serum) at 37°C. Plates were washed 3 times with PBS and were maintained in DMEM F12 for 48 hours. Cells were then treated for 24 hours with DMEM/10% FCS or DMEM plus mouse recombinant STI1 (170nM); recombinant STI1 (170nM) plus STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide (170nM or 8μM); STI1 (170nM) plus STI1/Hop₆₁₋₇₆ irrelevant peptide (170nM or 8μM); or each one of the peptides alone. Two hours before the end of treatment cells received a pulse of BrdU (35μM) and were fixed with 4% paraformaldehyde. Cells were treated with HCl 2N, for 30 minutes. The reagent was then removed and borate buffer applied (boric acid 0.1M, sodium hydroxide 0.15M), pH 8.4, for 10 minutes. Then, cells were treated with PBS plus 0.2% Triton X-100 for 15 minutes. The blocking step was made with PBS/0.2% Triton with 20% horse serum, for 1 hour. Primary anti-BrdU biotinylated antibodies (1:100) were applied overnight (diluted in PBS/0.2% Triton with 1% horse serum).

Coverslips were washed 3 times with PBS and incubated for one hour with Strepta-Alexa 488 and DAPI reagents (1:1000), washed more 3 times with PBS and assembled to slides. Pictures were taken from at least four microscopic fields of each treatment on WB filter, ranging from 330-385nm (DAPI), plus their respective BrdU images, on WIB filter, 450-480nm using DP controller software, Olympus. Picture files were analyzed on ImageJ software, and the percentage of BrdU positive nuclei in respect to total nuclei number (DAPI) was calculated using the Analyze Particles tool.

Orthotopic glioma model: Female or male 8-10-week-old Balb/C nude mice (*nu/nu*, Charles River®) were used. Institutional guidelines for animal welfare and experimental conduct were followed. This study was approved by Animal Ethics Committee of Fundação Antonio Prudente, Hospital A. C. Camargo (number 025/08). A guide-screw system (Plastic One) was used to perform the intracerebral tumor cell engraftment and subsequent intratumoral injections of STI1/hop peptides or saline. Guide-screws were implanted according to the protocol described by (Lal *et al.*, 2000) with few modifications. Mice were anesthetized by *i.p.* administration of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight). A piece of the scalp and of the underlying periost was removed, and a 1-mm burr hole was drilled into the skull 1 mm anterior and 2 mm lateral to the bregma. The guidescrew was screwed into the burr hole using a special screwdriver (Plastics One). A component adhesive (SuperBonder® gel) was used to glue the guide-screw to the skull and the screw was maintained exposed. The central hole of the guide-screw was occluded using a magnetic stylet provided with the screw. Three days after the implantation of guide-screws, 0.5×10^{-6} U87MG cells were injected through the screw into the mice right striatum using a 26-gauge needle attached to a 10 μ l Hamilton syringe. For the injection of test substances, mice were re-anesthetized with a reduction of the anesthetic time by 15–20%, the stylet was removed, and STI1/hop peptide (0.3, 3 or 12 μ g/day in 2 μ l of 100 mM NaPO₄ buffer solution; pH 7.2) or buffer solution (2 μ l of 100 mM NaPO₄; pH 7.2) was injected over 6 min. Afterward, freshly sterilized stylets were inserted. Treatment was initiated on day 0 or day1 after cell implantation and was continued three times a week over 2 weeks (tumor growth) or initiated on day 9 and continued three times a week over 2 weeks (regression curve) or 4 weeks (or until presenting characteristic neurological symptoms = grade 3) for survival test.

Neurological symptoms were assessed by modified neurological scores (Weissert *et al.*, 1998) (grade 0, no symptoms; grade 1, tail weakness or tail paralysis; grade 2, hind leg paraparesis or hemiparesis; grade 3, hind leg paralysis or hemiparalysis; grade 4, complete paralysis (tetraplegia), moribund stage or death). In survival experiments, animals were euthanized when they presented grade 3 to 4. All of the mice were euthanized using CO₂ saturation. A total of 113 mice were used in the present work.

Behavioral testing: Only male mice were tested in behavioral tests.

Object recognition task: Animals were habituated to the experimental open-field arena (a 37 x 24 x 24 cm chamber) by allowing them to freely explore it 20 min per day for 4 d in the absence of stimulus objects. Twenty-four hours after habituation (day 1 - sample phase), training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects a1 and a2) and left to freely explore them for 5 min. Exploration was defined as sniffing or touching the stimulus object with the nose and/or forepaws.

The test phase was performed 90 minutes after the sample phase (to evaluate short-term memory). In the test phase, mice explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (a) and one novel (B) object. A recognition index ($d2$) calculated for each animal was expressed by the ratio $TB-TA/(TA+ TB)$ [TA = time spent exploring the familiar object a; TB = time spent exploring the novel object B]. The open field arena and the stimulus objects were cleaned thoroughly between trials to ensure the absence of olfactory cues.

This procedure was performed 9 days after the injection of U87 glioblastoma cells (D9) and repeated for more three days (D12, D17 and D25), using different objects.

Determination of tumor size: Mice brains were removed from the cranial cavity and the tumors were resected. Tumor volume in mm³ was determined using the formula $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$, where the length was the longer axis and width being the measurements at right angles to the length. The tumors were fixed in 4% paraformaldehyde, frozen and serial sections (5 μm thick) were stained with H&E. Survival was evaluated using Kaplan-Meier with comparisons between groups analyzed by long-rank test.

Immunofluorescence: Tumors were resected, fixed with 4% paraformaldehyde plus 0.12M sucrose in phosphate buffer saline pH 7.4 for 1h, cryopreserved in 30% sucrose solution 16h, and frozen in Tissue Tek. Cryostat sections (10 μ m) were air-dried. Section were then re-hydrated and blocked with TBS (20mM Tris, 150mM NaCl) containing 0.1% Triton-X100, 10% normal goat serum at room temperature for 1 hour. Tumor sections were then incubated at room temperature for 16 hours with anti-PrP^C mouse serum (1:250) (Chiarini *et al.*, 2002), anti-STII rabbit serum (1:100), anti-Ki67 (1:50, Dako), anti-CD31 (ebio) and anti-cleavage-caspase 3 (1:100, Cell Signaling) in TBS 0.1% Triton-X100 with 1% normal goat serum. Prior to Ki67 staining the slides were boiled in Tris-EDTA pH 9.5 buffer in microwave for 20 min for antigen retrieval. After washing, anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes) 1:3,000 or anti-rabbit Alexa-488 (Molecular Probes) 1:3,000 were added on slices and incubated in the same buffer for 1 hour at room temperature followed by DAPI staining. After additional washes, the slides were mounted with Fluorsave (Calbiochem). Immunolabeled cells were imaged Olympus immunofluorescence microscope. Image processing was done with Photoshop (Adobe Systems) and Image J software (National Institute of Health).

Immunoblotting analysis: Protein extracts or conditioned medium prepared from U87-MG (cultured or xenograft) or A172 cells in Laemmli buffer were resolved in 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with polyclonal antibody anti-STII (1:10,000) (Chiarini *et al.*, 2002). Protein loading control was performed with anti-actin polyclonal antibody (1:200, Sigma). Rabbit non-immune purified IgG was used as immunoblotting negative control (data not shown). CDK-4 antibody (1:1000, Santa Cruz) was used as cell lysis control.

Flow cytometry: A total of 0.5×10^6 cells were trypsinised, washed twice with PBS and incubated with polyclonal antibody anti-PrP^C (1:100) (Zanata *et al.*, 2002) diluted in PBS 5% BSA for 30 minutes at 4°C. After three washes, secondary antibody anti-mouse Alexa-488 (Molecular Probes) 1:3,000, was incubated for additional 30 min at 4°C. FACS analysis was performed using a FACSCALIBUR (Becton Dickinson) connected to a Macintosh running CellQuest Software. Cells were analyzed for forward scatter, side scatter and fluorescence using an Argon Laser (480nm

excitation, 520nm emission).

ELISA assay: A 96-well Greiner MICROLON® 600 high binding plate (Greiner, Frickenhausen, Germany) was coated overnight at 4°C with 50 µL of each pair of fractions of CM from U87MG culture or tumor samples in PBS, pH 7.4. Afterwards, the wells were washed three times with wash buffer (0.3% Triton X-100 in PBS). Each well was filled with 100 µl of blocking buffer (5% milk in PBS) and the plate was incubated for 2h at 37°C. After washing, 50 µl of anti-STI1 (1:300) (Zanata *et al.*, 2002) in PBS was incubated 2h at 37°C, the solution was removed, the wells were washed and 50 µl of anti-rabbit-HRP conjugated (1:2000) (Amersham) in PBS was added to the wells. After incubation for 1 h at 37°C, wells were washed and 50 µl of an orthophenilenediamine solution (0.33 mg/ml in 0.5 M citrate buffer, pH 5.2, and 0.4% hydrogen peroxide) was added to each well. After 5 min at room temperature, protected from light, the enzymatic reaction was stopped through the addition of 50 µL of 4 M sulfuric acid. The absorbance (490 nm) was measured using a Bio-Rad Benchmark Microplate Reader.

Quantitative-Real Time PCR: *Tissue samples:* Fresh surgical samples of glioblastoma and of non-tumor samples of the CNS (temporal lobectomy tissue from epilepsy surgeries) were macrodissected and immediately snap-frozen in liquid nitrogen upon surgical removal. Necrotic and non-neoplastic areas were removed from the frozen block and the tumor tissue was microdissected prior to the RNA extraction procedure. This study was approved by the University of Sao Paulo School of Medicine Hospital Ethics Committee, and informed consent was obtained from all patients. For quantitative real time RT-PCR 17 samples of non-tumoral and 82 glioblastomas were evaluated. *Total RNA isolation and cDNA synthesis:* Total RNA was extracted from normal and tumor tissues using guanidine isothiocyanate. Conventional reverse transcription was performed to obtain single-strand cDNA for real time RT-PCR. The STI1 expression levels were determined by real time PCR analysis. Primers were designed to amplify a DNA fragment of 101-bp length. Primer sequences were as follows (5' to 3'): F:CCTGGGCACGAACTACAAGA, R:GCAATCTCTTCCTCCTCATCC. All primers were synthesized by Sigma.

The minimum concentration of primers was determined by the lowest threshold cycle and maximum amplification efficiency while minimizing non-specific

amplification. Analysis of DNA melting curves demonstrated a single peak for both primers. The reactions consisted of: 3 μ l of primer mixture (final concentration of 100nM), 3 μ l of cDNA sample, and 6 μ l SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems). Reactions were run on an ABI Prism 5700 sequence detector (Applied Biosystems). DNA melting curve analysis showed a single peak for STI1 amplified product. Quantitative data was normalized relative to the internal housekeeping control (BCRP- Breastcancer resistance protein; HPRT-hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase and β -glucuronidase).

The $1,73^{-\Delta\Delta Ct}$ equation was applied to calculate the relative expression of the STI1 in tumor samples versus the median of normal CNS tissues, where $\Delta Ct = Ct$ gene - Ct normalized, and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tumor - mean ΔCt normal tissues.

Tissue microarray: The tissue microarray block of 150 formalin-fixed and paraffin-embedded tumor samples of the central nervous system was prepared. A neuropathologist (Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres) evaluated the tumors using H&E-stained standard slides and pinpointed one histologically representative tumor region in each case from which a sample was included in the block. The microarray block was constructed with a custom-built instrument (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) as described earlier (Kononen *et al.*, 1998). The sample diameter was 1mm, and the spacing between adjacent specimens was 100 μ m. The tissue microarray included 150 gliomas (30 astrocytoma grade I, 30 grade II, 30 grade III and 30 glioblastoma) and 30 samples of normal tissue. For immunohistochemical analysis, antigen retrieval was performed by treatment in a pressure cooker for 5 min. Standard indirect immunoperoxidase procedures were used for immunohistochemistry. A rabbit polyclonal antibody anti-STI1/hop (1:1000 (Zanata *et al.*, 2002) was incubated overnight at 4°C diluted in PBS plus 0.5 g/l nonfat dry milk and 1.5 g/l normal goat serum, followed by incubation for 60 min at 37°C with EnVision Labeled Polymer peroxidase (Dako). Color was developed using DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma) and counterstained with hematoxylin. Sections were visualized in an Olympus IMT2-NIC microscope.

Statistical analysis: In proliferation assays, the mean values of at least three independent datasets are shown in the figures; the error bars represent standard error

of measurement (SEM). One way ANOVA followed by Tukey-HSD test was used for multiple comparisons. Results were considered statistically significant when p was < 0.05 . For quantitative RT-PCR statistical analysis was applied to gene expression data obtained from both glioblastomas and normal CNS tissues. Mann-Whitney test was used and the results were considered statistically significant when p was < 0.05 . Kaplan-Meier curves were used for survival assays and the differences between curves were evaluated by use of the log-rank test.

Results

Peptide STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ abrogates glioblastoma proliferation mediated by secretable STI1/Hop

We have shown earlier that STI1/hop secreted by a non-tumorigenic glioma cell line (A172) induces proliferation in a PrP^C-surface expression dependent manner (Erlich *et al.*, 2007). Here, we assess whether the proliferative effect mediated by secretable STI1/hop through membrane attached-PrP^C is also observed on a tumorigenic glioblastoma cell line (U87MG). We first evaluated the STI1/hop and PrP^C expression in the U87MG cell line. Flow cytometry analysis confirmed the presence of PrP^C on U87MG viable cell surface, showing that the molecule is properly synthesized and located (Figure 1A). Immunoblotting assays from U87MG cell extracts probed for STI1/hop showed a single band at the expected molecular weight (66kDa) (Figure 1B).

It has been reported that STI1/hop can be efficiently secreted, being found in extracellular milieu from primary astrocyte cultures (Lima *et al.*, 2007), HT-1080 and A172 fibrosarcoma and glioma cell lines respectively (Eustace *et al.*, 2004a; Erlich *et al.*, 2007). To verify the presence of STI1/hop in the conditioned medium (CM) of U87MG cells, immunoblotting analysis was conducted. STI1/hop was readily detected in a corrected molecular size (a 66kDa band), displaying higher levels in U87MG than A172 CM, indicating that the extracellular presence of STI1/hop could be related to cell tumorigenicity. An antibody for a soluble protein, Cyclin kinase dependent-4 (CDK4), was probed for cell lysis control (data not shown). These data suggest that secretable STI1/hop can act as an autocrine factor to regulate cell growth of U87MG lineage.

The proliferative effect mediated by STII/hop-PrP^C interaction has been previously reported in A172 and U87MG cell lines through [3H]-thymidine incorporation (Erlich *et al.*, 2007). In a preliminary assay, we also show that a STII/hop peptide (STII/hop₂₃₀₋₂₄₅), which mimics PrP^C binding site, had no effect increasing A172 cell proliferation mediated by STII/hop (data not shown), suggesting that this peptide could be used to disrupt STII/hop-PrP^C interaction and consequently to control cell growth.

To address whether STII/hop-mediated proliferation could be blocked by STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, U87MG cells cultured in a serum-free medium were pre-treated with STII/hop peptides (STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ or STII/hop₆₁₋₇₆) followed by recombinant STII/hop incubation. Proliferation was determined by BrdU incorporation and figure 1C shows representative images of BrdU nuclear staining pattern in U87MG cells in the absence (control) or presence of STII/hop incubated alone or with its peptides (STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ or STII/hop₆₁₋₇₆). Note that the number of BrdU stained cells (green) is decreased only when the peptide STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ is pre-incubated. The total nuclei are labeled with DAPI (blue) (Figure 1C). Each condition mentioned above, of at least three independent experiments, was counted and the graph (Figure 1D) shows the percentage of BrdU positive cells. Both concentrations (0.17 and 8μM) of STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, were able to abrogate the proliferative effect promoted by STII/hop decreasing the number of BrdU positive cells until basal levels as denoted by control (15%) (Figure 1D). An irrelevant peptide at higher concentration (8μM), which corresponds to N-terminal STII/hop sequence (STII/hop₆₁₋₇₆), was used as control and had no effect upon proliferation induced by STII/hop (Figure 1D). Similarly as reported before in A172 lineage (data not shown), both STII/hop₂₃₀₋₂₄₅ and STII/hop₆₁₋₇₆ peptides incubated alone had no effect (Figure 1D).

These data point out STII/Hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide as a putative candidate to control glioblastoma proliferation mediated by STII/hop-PrP^C association.

STII/hop is secreted and co-localize with PrP^C on human glioblastoma xenograft

To ensure that STII/hop is not merely needed for tumor cell growth in culture conditions, we next investigated whether STII/hop expression and secretion is also

required for the tumor growth *in vivo*. For intracranial xenograft, U87MG cells were implanted through a guide-screw into the right striatum of nude mice on day 0 and after 20 days post-incubation the animals were euthanized. The figure 2A depicts the histological image of the brain tumor-bearing mice stained with HE (ipsilateral, arrow). A higher magnification of the tumor site HE stained is showed in Figure 2A (right panel), note high cell density and numerous vessels (arrows head). To check the STI1/hop and PrP^C expression *in situ*, immunofluorescence analysis was performed on frozen slices of resected tumors grown intracerebrally for 20 days (Figure 2B). In figure 2B either PrP^C or STI1/hop is highly and uniformly expressed and co-localized *in situ*, indicating that both proteins can interact *in vivo*. To assess whether U87MG cells xenograft release STI1/hop to extracellular environment, tumors were harvested from mice 14 days after cell injection and maintained in culture. After 48h, the conditioned medium (CM) was recovered and subjected to immunoblotting analysis. STI1/hop appeared as a single and specific band of 66kDa in all CM-tumor samples (Figure 2 C, lanes 1 to 4). To ensure that STI1/hop found extracellularly is not a product of cell lysis, CM was re-probed with anti-CDK4 (Figure 2C). U87MG protein extracts were used as positive controls for both antibodies (anti-STI1 and anti-CDK4) (Figure 2C). These results validate the use of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ to inhibit the autocrine effect of endogenous secretable STI1/hop upon *in vivo* glioblastoma proliferation.

Local intracerebral delivery of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ reduces the growth of human glioblastoma xenograft regulating cell proliferation and death

Since U87MG cell line secretes STI1/hop and expresses its receptor, PrP^C, on cell surface, it was therefore chosen for *in vivo* experiments to evaluate the capacity of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ in tumor growth inhibition. U87MG cells were implanted into the right striatum of nude mice on day 0, and intratumoral treatment with saline or peptides was initiated on day 1 after tumor injection. Treatment was continued three times a week over 2 weeks. Compared with the control groups (saline) or irrelevant peptide STI1/hop₆₁₋₇₆, the mean tumor volume in mice treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ was reduced in a dose dependent manner (Figure 3A). Tumor sizes ranged from 3.42 to 29.25 mm³ in the STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅-treated animals, and from 21.4 to 36 mm³ in controls (saline and STI1/hop₆₁₋₇₆, Figure 3A).

The efficacy of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ treatment in tumor growth was also tested reducing the number of injections. Intratumoral treatment with saline or STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ (12µg) was initiated on day 1, day 2, day 4, day 7, day 9 or day 11 after tumor injection. The animals were euthanized on day 14 and the tumor volume measured. Similarly as in 6 treatments (Figure 3A), two treatments with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ were enough to reduce the tumor volume by 30% (Figure 3B).

Histological sections of tumors removed from STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ and STI1/hop₆₁₋₇₆ groups (Figure 3A) were examined with anti-CD31, anti-cleaved-caspase 3 and ki67 to determine intratumoral vessel density, apoptotic index and cell proliferation, respectively. As depicted in representative images, tumors treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ resulted in a significant reduction of cell proliferation (ki67) and an increased number of apoptotic tumor cells (cleaved-caspase 3) when compared with STI1/hop₆₁₋₇₆ (Figure 3C). There was not difference in microvessel density (CD31) in both treatments (Figure 3C). The quantification of histological analysis showed that the proliferative activity was reduced by 27% in tumors of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅-treated mice when compared to the control (STI1/hop₆₁₋₇₆) (Figure 3D). STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅-treated animals display a 2.2-fold higher percentage of apoptotic tumor cells in comparison with STI1/hop₆₁₋₇₆ (Figure 3C). In STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅-treated mice, the percentage of intratumoral microvessel density was not significantly different from STI1/hop₆₁₋₇₆ ($p>0.05$) (Figure 3D). These results demonstrate a potential use of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ for glioblastoma treatment.

STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ modulates tumor arresting and animal survival increasing

Additionally, we investigated whether STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ treatment was also effective against pre-established tumors. Firstly, a tumor growth curve was done to define the appropriate day to initiate treatment (Figure 4A). The clinical signs were also monitored during tumor development (data not shown). The day 9 after cell injection was considered the most suitable day to initiate treatment, since tumor volume ranged from 6.6 to 11.2 mm³ and animals did not present neurological symptoms over 2 weeks (Figure 4A). On day 7 the tumors were considered too small for this purpose, presenting a volume around 4 to 4.7 mm³, whereas on days 11 and 14 the tumors were too big (Figure 4A) and glioblastoma-bearing mice presented earlier

onset neurological signs (data not shown), which would impair further tumor growth analysis in prolonged treatments. A representative picture of resected tumors is shown (Figure 4A, upper panel).

Peptides STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ or STI1/hop₆₁₋₇₆ were locally administrated at day 9 after cells inoculation, when the average tumor volume had reached approximately 7mm³, three times a week over 14 days. The mean tumor volume in mice treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ was similar to control, around 6.5mm³, indicating that the STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ is inhibiting the glioblastoma growth, instead of inducing tumor regression. In contrast, the tumors continued to grow when treated with irrelevant peptide (STI1/hop₆₁₋₇₆) and the average tumor volume on the final day of therapy was 14mm³. These data indicate an inhibitory effect for STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ upon glioma growth.

To additionally evaluate the clinical usefulness of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ therapy, we investigated the survival of glioblastoma bearing-mice. On day 9 post-inoculation, STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ treated-animals had a benefit on survival ($p < 0.0001$) with mean survival being day 49, when compared with day 32 for the STI1/hop₆₁₋₇₆ control group (Figure 4 C). Notably, mice treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ showed onset visible clinical symptoms, as assessed by neurological scores, significantly later than STI1/hop₆₁₋₇₆-treated mice (data not shown). The animals were euthanized for ethical reasons and tumors were harvested and measured. The size of tumors treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ did not differ from that of STI1/hop₆₁₋₇₆-xenografts (Figure 4D). These data suggest that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide only temporally delayed tumor growth leading to increase the animal survival. Although further studies are necessary to better assess the effect of the treatment with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide on long-term survival, our findings indicate that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ could represents a novel therapeutic tool for malignant gliomas.

STI1/hop secretion is enhanced according to tumor progression

The main purpose of glioblastoma therapy by intratumoral delivery of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ is blocking the binding of endogenous secreted STI1/hop to PrP^C-cell surface anchored and consequently reduce tumor cell proliferation. Next, we assessed whether the levels of endogenous STI1/hop secretion is altered during tumor progression. Resected tumors with volume ranging from 1.86 to 187mm³ obtained from *in vivo* experiments were cultured for 48h and the conditioned medium was

harvested and subjected to immunoblotting analysis. The levels of STI1/hop secretion increased when tumors achieved sizes from 50 to 150 mm³ and was statistically different from those that ranged from 0 to 50 mm³ (Figure 5A). STI1/hop was detected as a single and specific band of 66kDa in all tumor samples of CM and no cell lysis product was found using anti-CDK4 (Figure 5 A). In attempt to quantify total amounts of STI1/hop released by U87MG xenografts to CM, ELISA tests were performed. Similarly as observed by immunoblotting, the quantity of secreted STI1/hop in CM increased according to tumor progression. Small (0-50mm³) and large (50-200mm³) tumors released about 25 to 150ng of STI1/hop, respectively (Figure 5B). STI1/hop secretion levels were maintained stable when tumors achieved a volume higher than 100mm³ (Figure 5B). These findings indicate that the effectiveness of the peptide therapy might depend on amount used and for large tumors additional doses of peptide could be required to block efficiently the secreted STI1/hop.

STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ protects against cognition impairment promotes by tumor progression

As shown in Fig. 6A, animals obtained successful learning for OR when tested 90 min after training phase 9 days after tumor cells implantation. Tumor nude mice spent more time exploring the novel object indicating recognition of the familiar one (*p < 0.001 in ANOVA one way followed by Tukey's test). In the other hand, tumor nude mice that received irrelevant peptide, 12 and 17 days after cells implantation showed a decreased ability to discriminate between familiar and novel objects, completely lose OR memory retention (Fig. 6B). Fig 6C showed that the memory of xenotransplanted mice that received STI1/HOP₂₃₀₋₂₄₅ peptide was not affected by tumor growth. In parallel, control group with a guide-screw system without treatment was performed. As show in Fig. 6D, the guide-screw system had no effect on the animal's performance. Both IRR and STI1/HOP group spent the same amount of time exploring objects during the test phase (Fig. 6E). We can notice that the locomotor and exploratory activities are not altered.

STI1/hop is overexpressed on glioblastoma ex vivo human glioblastoma

We next investigated STI1/hop gene expression profile from 82 glioblastomas samples using quantitative RT-PCR. The mRNA levels of STI1/hop in glioblastoma samples were significantly higher ($p < 0.05$) than in normal tissues (Figure 7A). Moreover, immunohistochemical analysis of brain glioma tissue microarray (TMA) confirms the mRNA findings. Immunohistochemical staining of the STI1/hop (negative versus positive) showed a strong correlation with tumor malignancy grade of astrocytoma (Figure 7B). Hence, these findings indicate that STI1/hop is upregulated in malignant glioma supporting our *in vitro* and *in vivo* assays that show that STI1/hop secretion might be associated to tumor aggressiveness.

Discussion

Due to intrinsic resistance of aggressive tumors such as human malignant gliomas to established therapies, current attempts to improve the survival of cancer patients largely depend on strategies to target tumor-cell resistance and to identify novel anticancer agents. As control of tumor growth in target cells is a key mechanism for most antitumor therapies, approaches to inhibit exacerbated tumor proliferation are required.

We have shown that the engagement of secreted STI1/hop to cell surface-PrP^C attached promotes proliferation of glioblastoma-derived cell line through MAPK and PI3K signaling pathways. In contrast, STI1/hop has no effect upon proliferation of normal astrocytes (Erlich *et al.*, 2007). That evidence prompted us to ask whether the blockage of STI1/hop-PrP^C interaction could be a key control point in modulating tumor proliferation and likely be considered a potent therapeutic target for brain tumors.

Here, using a peptide that mimics PrP^C binding site on STI1/hop molecule (STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅), we report that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ represents a novel promising cancer therapeutics to potentiate tumor arrest and animal survival. Our conclusion is based on several independent pieces of evidence. First, STI1/hop is highly expressed and secreted by U87MG cells and its major receptor, PrP^C, is correctly located on cell line surface. STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ is able to block *in vitro* the proliferative effect of glioblastoma-derived cell line mediated by STI1/hop-PrP^C interaction, suggesting its

potential use for tumor growth control *in vivo*. Second, STI1/hop co-localizes with PrP^C in glioblastoma xenograft suggesting that both proteins interact *in vivo*. The putative use of such peptide as therapeutic tool to treat intracranial glioblastoma was validated through experiments that show high levels of endogenous STI1/hop being secreted by glioblastoma xenografts. These results supported our purpose to use the peptide STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ to inhibit the autocrine/paracrine effect of STI1/hop upon tumor growth. Third, intratumoral treatment with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide at day 1 after cell injection strongly inhibits glioblastoma growth and the volumes of U87MG tumors were reduced by ~70%. In contrast, the growth of U87MG cells *in vivo* was not affected by the N-terminal peptide STI1/hop₆₁₋₇₆, suggesting that the peptide has efficacy only when active autocrine or paracrine effects mediated by STI1/hop requires PrP^C and in this case only the peptide mimicking PrP^C binding site (STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅) has activity. The potential mechanisms for antitumor effect of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, including direct effects on tumor cell proliferation and death. Autocrine stimulation of U87MG glioblastoma cell proliferation was strongly inhibited by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide *in vivo*, and the proliferative activity of tumor cells was reduced by about 80%. This finding is consistent with the anti-proliferative effects of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ *in vitro*. Although the effect was modest, the fraction of apoptotic tumor cells was increased by 50% in tumors treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ *in vivo*. Fourth, intratumoral treatment of pre-established U87MG orthotopic xenografts with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ delays tumor growth and prolongs animal survival in mice for ~10 days. In accordance with the above observation, local intracerebral delivery of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide is accompanied by highest decrease of cell proliferation and increase in apoptosis index (data not show). Fifth, STI1/hop secretion is regulated by tumor size and large tumors (150mm³) secreted ~ 150ng of protein, indicating that the levels of STI1/hop secretion might be related to tumor progression. Sixth, STI1/hop gene expression from biopsy samples, measured by real-time quantitative PCR, is positively regulated according to glioma aggressiveness and is found less expressed in normal tissues and low-grade astrocytoma and overexpressed in glioblastoma. Immunohistochemical analysis of several glioma biopsies of varying grade demonstrated that STI1/hop expression levels are more elevated in astrocytomas high-grade than low-grade suggesting a functional role in astrocytoma progression.

Our findings demonstrate for the first time the feasibility of using STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide to induce anti-proliferative and pro-apoptotic stimuli in malignant glioma

cells *in vitro* and *in vivo*. A schematic model for the action of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ in glioma physiology is showed in the figure 7.

In vitro analysis has shown that the amino acid sequence that constitutes STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide is essential for binding to PrP^C. A recombinant STI1/hop deletion mutant lacking residues 230-245 is unable to bind to PrP^C. Furthermore, STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, in higher concentrations, is able to compete by STI1/hop-PrP^C interaction abrogating this binding and consequently impairing associated-biological function (Zanata *et al.*, 2002;Lopes *et al.*, 2005). Likewise, the specificity of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide to binding PrP^C was attested with other STI1/hop peptides chosen randomly (Zanata *et al.*, 2002). We have previously demonstrated that STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide was able to promote neuronal survival (Zanata *et al.*, 2002;Chiarini *et al.*, 2002) and neuronal differentiation (Lopes *et al.*, 2005) *ex vivo*.

STI1/hop peptides have also been tested *in vivo*. Recently, our group demonstrated that the intra-hippocampal infusion of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ in rats, had a potent enhancing effect on memory performance suggest that STI1/hop-PrP^C interaction should be explored as a potential target for pharmacological enhancement of cognition (Coitinho *et al.*, 2007).

The improvement in treatments of patients with brain cancer leads to a greater risk of cognitive deficits particularly because of side effects of drugs and radiotherapy. The use of agents designed to protect neurons against apoptosis or neurodegeneration is an interesting approach to be considered (Gehring *et al.*, 2008).

In keeping with these findings, STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide can have a dual effect in the treatment of glioblastomas. The first one is the decrease on tumor proliferation mediated by secreted STI1/hop and the second one is its protective effects in neurons and improvement in patients' cognition. In fact, no detectable toxicity was observed in normal brain tissue of glioblastoma-bearing mice treated intracerebrally (data not shown).

The higher therapeutic efficacy of the local intracerebral delivery is probably related to the fact that anti-tumor peptides are more easily available at the tumor site and at the same time less susceptible to degradation of proteases. In human gliomas, local delivery is currently considered the most promising route for the application of any drug that, due to its proteolytic sensitivity or poor permeability, needs to bypass the blood-brain barrier. Several promising phase I and II clinical trials were conducted using convection-enhanced drug delivery (intratumoral infusion) for the delivery of

cytostatic drugs or toxin conjugates in gliomas (Westphal and Tonn, 2003). Because STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ is very small and unstable molecule, due to its proteolytic sensitivity, intratumoral delivery was ideally suited to its release in our orthotopic model.

Clinically, uncontrolled proliferation and resistance to apoptosis is a major cause of primary or acquired nonresponsiveness of cancer cells leading to treatment failure. By demonstrating that the proliferation of tumor cells can be reduced by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅, our studies performed in glioblastoma cell lines and in a malignant glioma tumor model *in vivo* have important implications for the development of novel strategies in cancer therapy. Thus, in terms of clinical perspective the STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ seems to be a promising anti-glioma agent that may be able to effectively complement the currently available conventional treatment strategies but with an exclusive property in neuroprotection.

Legends

Figure 1: STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ blocks tumorigenic glioblastoma cell line proliferation mediated by secretable STI1/hop. **A)** PrP^C expression on U87MG cell surface was determined by flow cytometry; **B)** Western blotting analysis of STI1/hop expression and secretion from U87MG cells extracts and concentrated conditioned medium (CM), respectively. STI1/hop secretion of a non-tumorigenic cell line A172 was also evaluated. **C)** Representative images for BrdU incorporation in U87MG cells treated with STI1/hop and its peptides STI1/Hop₂₃₀₋₂₄₅ and STI1/Hop₆₁₋₇₆. Staining for BrdU (green) and DAPI (blue), magnification x200. **D)** U87MG cells cultured in serum-free medium were treated with FCS (Fetal calf serum), STI1/hop (170nM) alone or with its peptides (Hop₂₃₀₋₂₄₅ and an irrelevant Hop₆₁₋₇₆) for 24h and the cell proliferation was measured through BrdU incorporation. Values are expressed as mean ± SE)* p<0.01 and are representative of at least three independent experiments.

Figure 2: STI1/hop is secreted by human glioblastoma xenograft and co-localizes with PrP^C. **A)** Representative histological images of frozen sections stained with H&E of U87MG-derived tumors grown intracerebrally in mice (ipsilateral). The contralateral hemisphere is shown (magnification, x40). Right panel represents a higher magnification (400X) of glioblastoma site, note the numerous small capillaries (arrows). **B)** Frozen sections of resected tumor were immunostained with anti-PrP^C

(red) and anti-STI1/hop (green). The nuclei were stained with DAPI (blue). High *in situ* STI1/Hop-PrP^C co-localization is observed (yellow, merge). Magnification, x200. **C)** Immunoblotting analysis of CM of U87MG xenografts (lanes 1 to 4) developed with anti-STI1/hop and anti-CDK4 (cell lysis control).

Figure 3: Intratumoral treatment of glioblastoma xenograft with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide decreases tumor volume and modulates cell proliferation and death. **A)** U87MG were implanted intracerebrally into the right striatum of athymic mice and the treatment with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅, STI1/hop₆₁₋₇₆ or saline in different concentrations was initiated on day 0 and was continued three times a week over 14 days. Animals were euthanized and the tumors resected. Tumors volumetric measurements were used to assess therapeutic effect. * Statistical significance of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ when compared to saline or STI1/hop₆₁₋₇₆: $p < 0.05$ ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons Test. **B)** Mice bearing U87MG xenograft were treated with decreasing injections of STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ which were initiated on day 0 (6 injections), day 2 (5 injections), day 4 (4 injections) day 7 (3 injections), day 9 (2 injections) and day 11 (1 injection). On day 14 all animals were euthanized and the resected tumors measured. * Statistical significance when compared to saline or one injection: $p < 0.05$ ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons Test. **C)** Representative images of tumor sections immunostained with markers for cell death, vascularization and proliferation (anti-cleaved-caspase 3, anti-CD31 and Ki67, respectively). Nuclei were stained with DAPI (blue). **D)** Comparisons of fluorescence measurements for immunostaining with ki67, CD-31 or cleaved-caspase 3 between tumors treated with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ or STI1/hop₆₁₋₇₆. The percentage of positive cells in the total population (DAPI counterstained) was quantified. Values are expressed as mean \pm SE)* $p < 0.01$ and are representative of at least three independent experiments.

Figure 4: Therapy of mice bearing established U87MG xenograft with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ promotes tumor growth inhibition and prolongs animal survival. **A)** U87MG derived-tumors grown intracerebrally in athymic mice were excised on days 7, 9, 11, 14 and 28 and the volume calculated. **B)** Pre-established tumors were treated from day 9 (CTR-DIV9) three times a week with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ (12 μ g) or STI1/hop₆₁₋₇₆ (12 μ g) in a total of 6 injections. Animals were euthanized on day 23 for

the evaluation of tumor volumes. * Statistical significance when compared to STI1/hop₆₁₋₇₆: $p < 0.05$ ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparisons Test. **C**) Glioblastoma bearing mice were treated three times a week with STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ (12 μ g) or STI1/hop₆₁₋₇₆ (12 μ g) at day 9 after cell injection until present neurological symptoms grade 4, when the animals were euthanized and had their tumors resected and measured (**D**). The animals were observed at regular intervals until grade 4 and Kaplan-Meier curves were drawn to demonstrate the survival in the different groups. Mice from both experiments were carefully evaluated for clinical symptoms (levels of alertness, behavior and weight and appearance of focal neurological deficits, *e.g.*, paresis). Differences between curves were evaluated by the use of log-rank test ($p < 0.001$).

Figure 5: STI1/hop secretion is regulated by tumor size. CM from 48h as fragment culture, from U87MG xenografts (sizes from 50 to 200 mm³), were subjected to immunoblotting (**A**) or ELISA (**B**) assays developed with anti-STI1/hop antibody. Immunoblots performed for STI1/hop were quantified by densitometry (**C**).

Figure 6: STI1/HOP peptide treatment prevents cognitive deficit in nude mice bearing tumor evaluated by object recognition task. Total exploration time is showed in four days which the OR task was performed in xenotransplanted mice. A guide-screw system (Plastic One) was used to perform the intracerebral tumor cell engraftment and subsequent intratumoral injections of STI1/HOP or irrelevant peptides (see methods). 9 days after the injection of U87 cells, nude mice were submitted to first OR. For this purpose, one of the objects used at training (a1 and a2) was replaced by a novel one (denoted by b) and mice exploratory behavior toward familiar and novel objects was quantified 90 min later. Treatments of xenotransplanted nude mice were initiated with IRR peptide (**B**) or STI1/HOP peptide (**C**) from 9 days after cells implantation. OR was repeated on 12th, 17th and 25th days after cells implantation using different objects (denoted by c, d on 12th, e, f on 17th and g, h on 25th days). (**E**) In parallel, control group with a guide-screw system without treatment was performed. Data are presented as mean (\pm SEM) of the percentage of time exploring a particular object over the total time of object exploration. Data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's test

*p < 0.001. (F) Both IRR and STI1/HOP group spent the same amount of time exploring objects during the test phase. Data are presented as sum (\pm SEM) of the total time exploring novel and familiar objects during LTM. Statistical analyses were performed using ANOVA one way followed by Tukey's test. N=4 to 8 per group.

Figure 7: STI1/Hop is overexpressed in human glioblastomas samples. Normal brain tissues and gliomas samples were evaluated for STI1/hop expression using quantitative RT-PCR (A) or immunohistochemistry on tissue microarray (B). *Statistically significant from normal tissues, p<0.05.

Figure 8: Schematic model for STI1/hop-PrP^C interaction in glioblastoma proliferation. PrP^C located on cell surface when engaged with endogenously secreted STI1/hop induces proliferation signal by activating PI3K and Erk1/2. This effect can be abrogated by STI1/hop₂₃₀₋₂₄₅ peptide, a mimic of the PrP^C binding site, which interacts to PrP^C and impairs signaling transduction that control cell proliferation mediated by STI1/hop. Note that this peptide is a promising candidate to brain tumors due to its ability to enhance memory formation and its non-neurotoxicity property.

REFERENCES

1. Americo TA, Chiarini LB, and Linden R (2007) Signaling induced by hop/STI-1 depends on endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 620-625.
2. Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, and Martins VR (2009) Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia*, 57, 1439-1449.
3. Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN, Machado CF, Pinto AC, Magalhaes AC, Vieira MP, Americo TA, Massensini AR, Priola SA, Vorberg I, Gomez MV, Linden R, Prado VF, Martins VR, and Prado MA (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci*, 28, 6691-6702.
4. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, and Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J*, 21, 3317-3326.

5. Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, Rossato JI, Freitas AR, Castro CC, Cammarota M, Brentani RR, Izquierdo I, and Martins VR (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis*, 26, 282-290.
6. Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, Chiarini LB, Martins VR, and Moura N, V (2007) STII promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia*, 55, 1690-1698.
7. Eustace BK and Jay DG (2004a) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle*, 3, 1098-1100.
8. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, and Jay DG (2004b) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol*, 6, 507-514.
9. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, and Cavenee WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21, 2683-2710.
10. Gehring K, Sitskoorn MM, Aaronson NK, and Taphoorn MJ (2008) Interventions for cognitive deficits in adults with brain tumours. *Lancet Neurol*, 7, 548-560.
11. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, and Tse VC (2006) Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus*, 20, E5.
12. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, and Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-847.
13. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, and Lang FF (2000) An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *J Neurosurg*, 92, 326-333.
14. Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, and Martins VR (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem*, 103, 2164-2176.
15. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, and Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 88, 673-728.
16. Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, and Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and

- neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci*, 25, 11330-11339.
17. Louis DN (2006) Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*, 1, 97-117.
 18. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M, and Jaattela M (2002) Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res*, 62, 7139-7142.
 19. Odunuga OO, Longshaw VM, and Blatch GL (2004) Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. *Bioessays*, 26, 1058-1068.
 20. Ohba S, Hirose Y, Yoshida K, Yazaki T, and Kawase T (2009) Inhibition of 90-kD heat shock protein potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in human glioma cells. *J Neurosurg*.
 21. Ponder BA (2001) Cancer genetics. *Nature*, 411, 336-341.
 22. Santarelli JG, Sarkissian V, Hou LC, Veeravagu A, and Tse V (2007) Molecular events of brain metastasis. *Neurosurg Focus*, 22, E1.
 23. Song Y and Masison DC (2005) Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). *J Biol Chem*, 280, 34178-34185.
 24. Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, and Blomer U (2005) Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol*, 63, 162-169.
 25. Weissert R, Wallstrom E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, and Olsson T (1998) MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. *J Clin Invest*, 102, 1265-1273.
 26. Westphal M and Tonn JC (2003) Editors' remarks: Evolving concepts for local therapies for glioma. *Acta Neurochir Suppl*, 88, VII-VIX.
 27. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de OE, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, and Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J*, 21, 3307-3316.

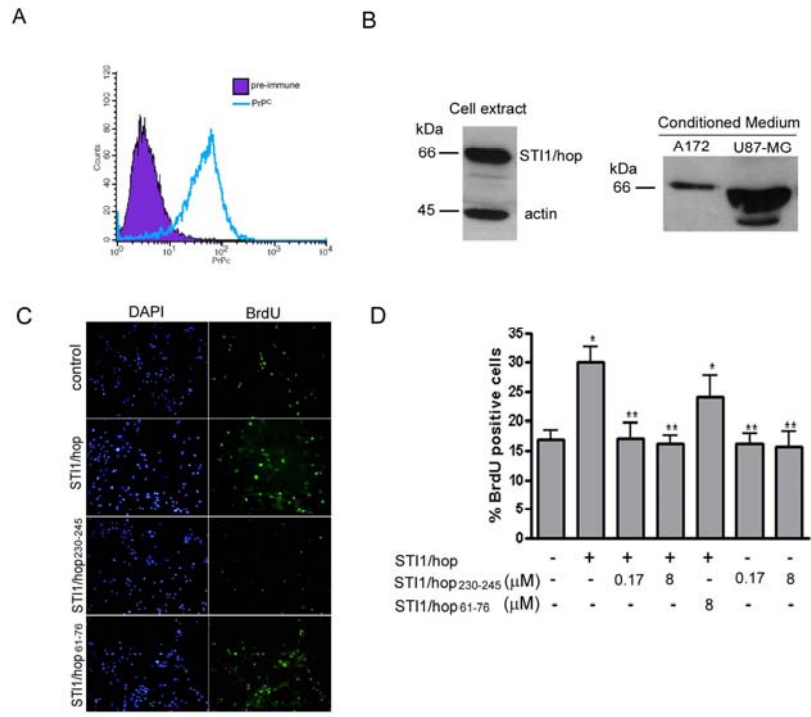
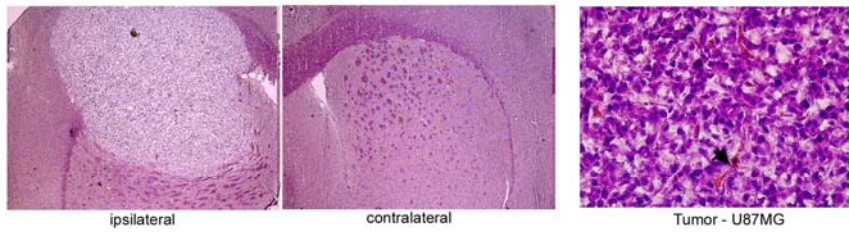
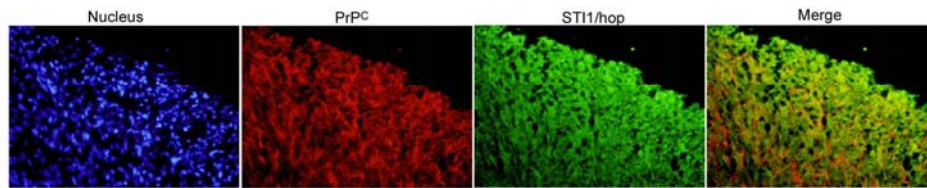


Figure 1

A



B



C

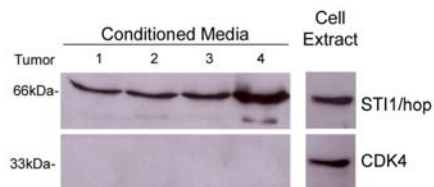


Figure 2

Lopes et al.,

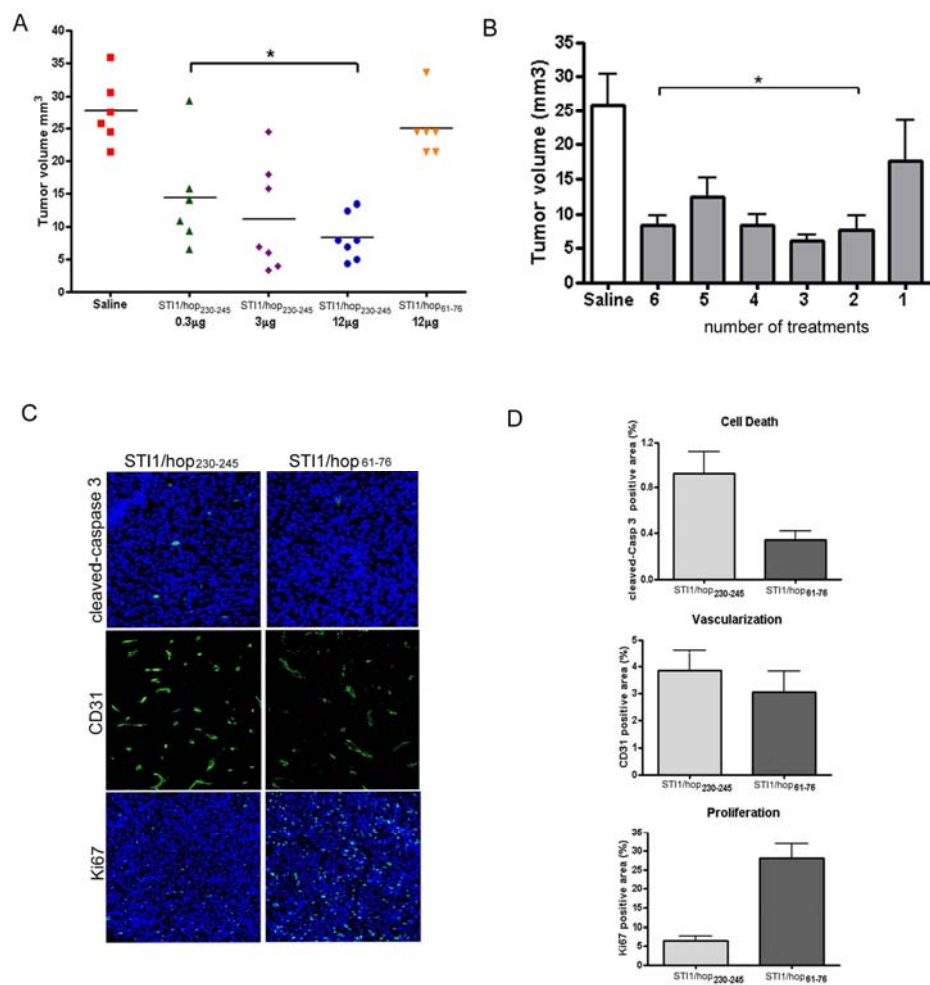


Figure 3

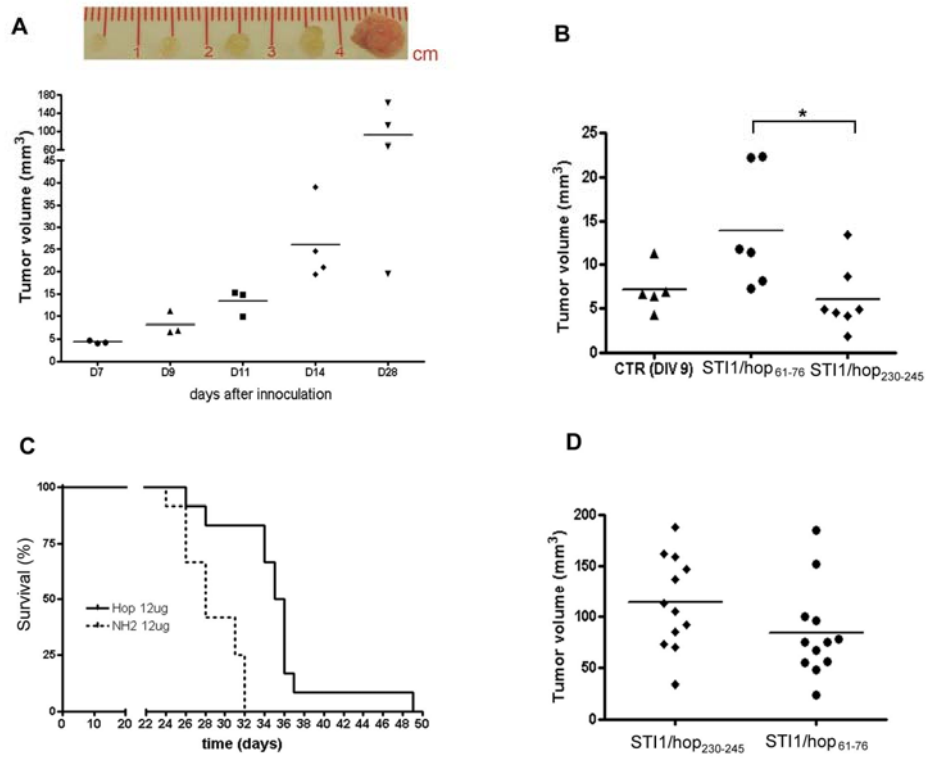


Figure 4

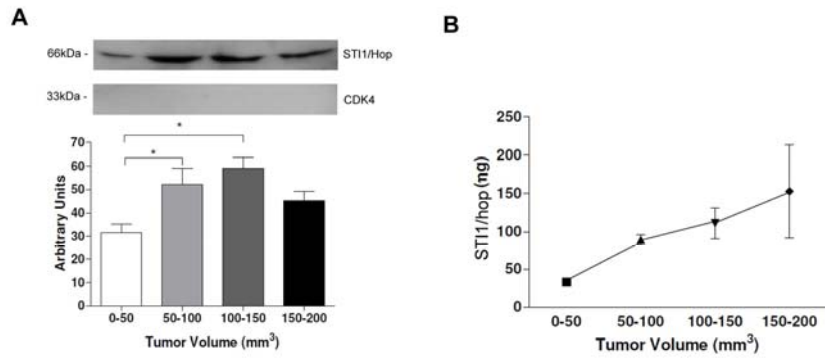


Figure 5

Lopes et al.,

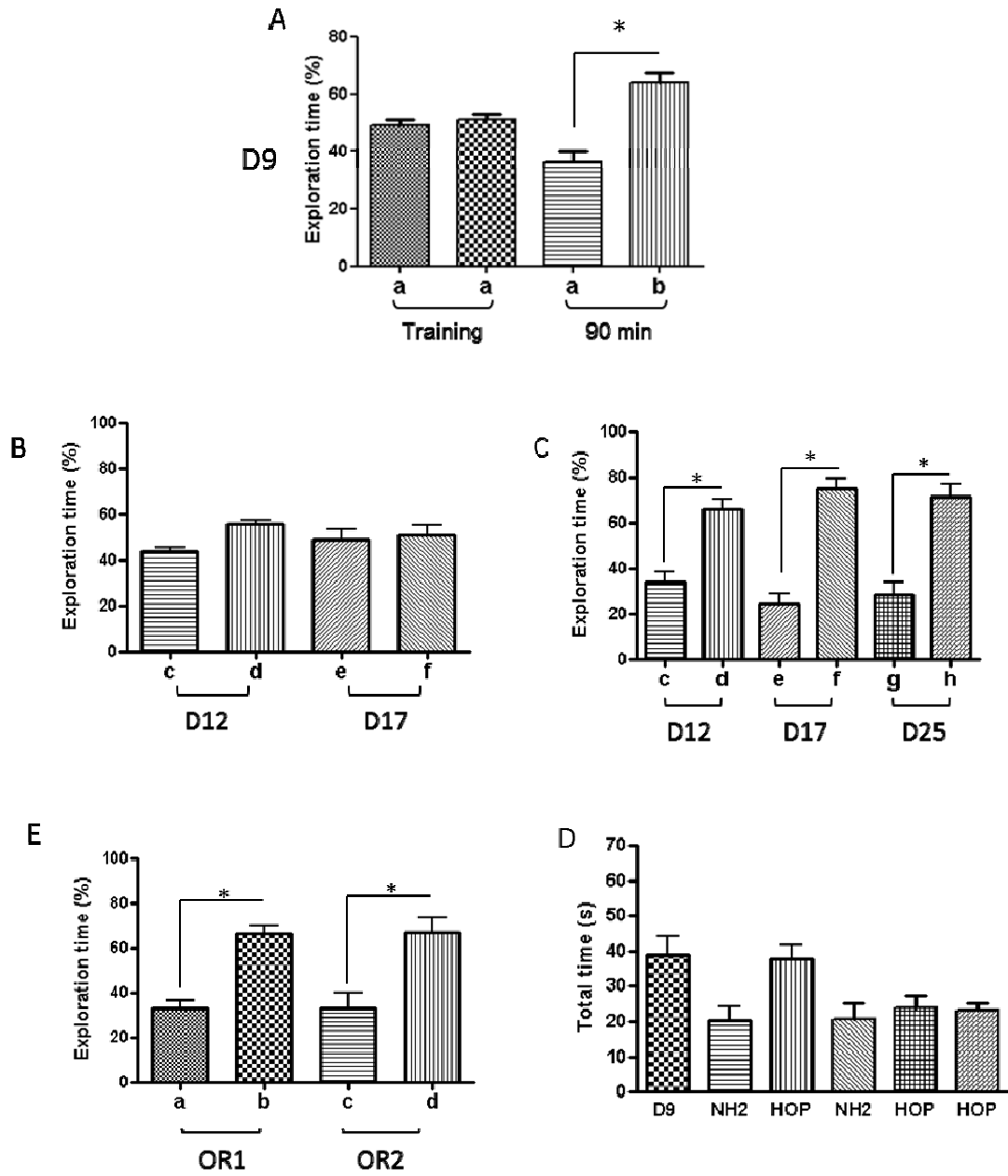


FIGURE 6

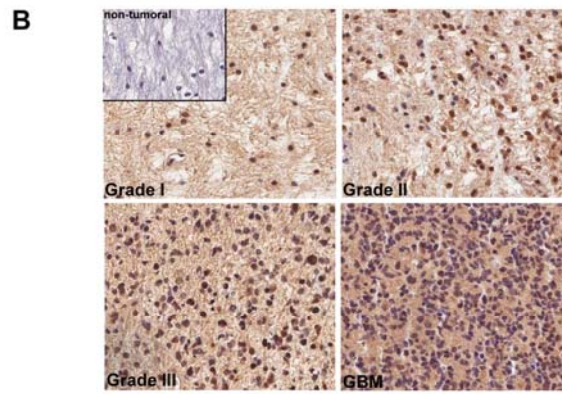
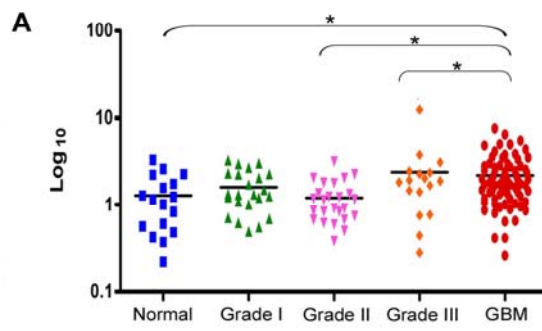


Figure 7

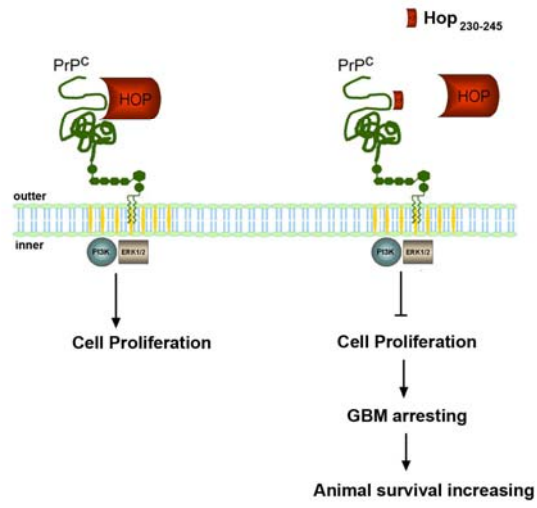


Figure 8