



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**mec**  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
CLEMENTE ESTABLE



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesis para obtener el título de Licenciatura en Ciencias  
Biológicas - Opción Biología Molecular

INDUCCIÓN DEL ESTRÉS CELULAR EN  
ADENOCARCINOMA MAMARIO DE RATÓN  
MEDIADO POR NANOPARTÍCULAS  
SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE HIERRO

LUCÍA VÁZQUEZ ALBERDI

Tutora: Dra. María Bausero

Co - Tutora: Dra. Alejandra Kun

Montevideo, Uruguay

2018

*“La alegría de ver y entender,  
es el más perfecto don de la naturaleza”*

*Albert Einstein*

A mis padres, hermanos y familia.

A los que están y los que me guían desde el cielo.

Al amor de mi vida que sin él no lo hubiese logrado.

Gracias.

## **RESUMEN**

El cáncer de mama es el más frecuente en la población uruguaya, donde 1 de cada 10 mujeres pueden desarrollarlo durante su vida. Los patrones particulares de expresión molecular de las células tumorales, impulsan la búsqueda de terapias dirigidas, que permitan tratar a grupos de pacientes de manera más “personalizada”. La nanotecnología ha incorporado un enorme abanico de posibilidades, con la estrategia dirigida a atacar directamente a la masa tumoral. La nanopartícula superparamagnética de óxido de hierro (SPION) es un ejemplo de ello ya que, gracias a su cubierta biocompatible, es posible adosarle diversas moléculas, que serán transportadas hasta su diana: el tumor. Las SPIONs han sido estudiadas y se conoce que, en cierto rango de concentraciones, no poseen efectos citotóxicos (evaluados por MTT, ensayo de ROS, etc). Sin embargo, los mecanismos que se desencadenan por la entrada de las SPIONs *per se* en las células, no han sido aún explorados.

Con el fin de verificar la hipótesis de que la respuesta de estrés celular podría estar involucrada con la entrada de las SPIONs en las células, nos planteamos evaluar el comportamiento de las proteínas que participan en el mecanismo de la respuesta de estrés térmico, Hsp27 y su factor de transcripción HSF1, frente al tratamiento con SPIONs en diferentes líneas celulares. Encontramos que, las líneas normales, NIH3T3 y J774, mostraron aumentos tanto de HSF1 como de Hsp27 luego del tratamiento con SPIONs; mientras que, en la línea de adenocarcinoma mamario murino, 4T1, el aumento de HSF1 fue más marcado en el citoplasma luego del tratamiento con SPIONs, junto con la existencia de agregados perinucleares de dicho factor. La literatura indica el incremento de HSF1 y de Hsp27 tienen un efecto tumorigénico evidenciado por Carpenter et al., 2007, Garrido et al., 2006, Gökmen-

polar y Badve, 2016 y Hattori et al. 2017 entre otros. De confirmarse esto, nuestro hallazgo pone de manifiesto condiciones que promoverían un posible efecto oncogénico por parte de la nanopartícula, promovido por activación del mecanismo HSF1-Hsp27.

Los resultados obtenidos obligan a considerar en la perspectiva de las terapias antitumorales mediadas por SPIONs, el balance entre el aparente efecto negativo de la entrada de las SPIONs *per se* a las células y el efecto beneficioso dosis-dependiente de las drogas anti-tumorales a utilizarse. De la resultante de estas variables, se desprenderá el verdadero efecto de la comunión entre el vehículo y la droga que actuarán en el paciente, con efecto terapéutico.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo el cáncer de mama ocupa el primer puesto en incidencia y mortalidad, evaluado en ambos sexos y estandarizado por edades (*International Agency for Research on Cancer 2012*).

En Uruguay, el cáncer de mama es el más frecuente. Actualmente se diagnostican 5 casos por día y alrededor de 650 mujeres fallecen por año debido a este tipo de cáncer. Se estima además que 1 de cada 10 mujeres pueden desarrollarlo a lo largo de su vida (*Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer 2016*).

El constante desarrollo de terapias que permitan mejorar la calidad y la expectativa de vida del paciente, hace necesario comprender en detalle los procesos biológicos que subyacen en el establecimiento y progresión de la enfermedad. Por otra parte, la complejidad de la patología, hace cada vez más clara la necesidad de tratar el cáncer de mama de manera multidisciplinaria. Por ello las estrategias que apuntan a la búsqueda de alternativas terapéuticas reúnen a médicos, físicos, químicos, biólogos y otros profesionales, en post de encontrar terapias cada vez más dirigidas a una posible disminución en las dosis de quimioterápicos.

Esta búsqueda trae aparejado el análisis exhaustivo de los efectos sobre el sistema de trabajo, las posibles complicaciones y la relación costo-beneficio frente a las posibles ventajas para determinar si será factible su uso, para luego finalmente llevarlo a la práctica. La etapa de estudio de los efectos sobre la patología implica el uso de modelos biológicos que representan lo que sucede en el sistema. Existe una gran variedad de modelos biológicos, pero para el cáncer de mama algunos se

destacan: de los modelos animales, el modelo murino es el más utilizado. Es fisiológicamente consistente y que permite realizar extrapolaciones hacia los humanos (Fernández Lomónaco 2012; Tao et al. 2008). En la actualidad los científicos plantean la utilización de modelos *in vivo*, donde el animal es utilizado para estudiar la iniciación, progresión y desarrollo de las diferentes etapas de la afección, existiendo ventajas y desventajas en cada variante de estos modelos (Holen et al. 2017).

Otro modelo de estudio implica el uso de líneas celulares que pueden ser obtenidas cuando se injertan células tumorales humanas a animales inmunocomprometidos (Holen et al. 2017; Holliday and Speirs 2011). Existiendo así una amplia diversidad dependiendo del perfil de la enfermedad que se pretenda estudiar, las líneas celulares poseen como ventaja remarcable la capacidad de proveer un suministro celular estable relativamente homogéneo de células que es capaz de replicarse en medio de cultivo (Holliday and Speirs 2011). Un ejemplo son las células de adenocarcinoma mamario murino de la línea 4T1, que presentan un comportamiento similar a lo que ocurre en el cáncer de mama humano en estadio IV, es decir, metastásico (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001) y tienen la posibilidad de realizar metástasis en modelos de trasplantes singénicos de ratón (Holen et al. 2017).

### 1.1 Respuesta al choque térmico como modelo de estrés celular

Uno de los procesos que pueden modelarse con las células 4T1 es la respuesta al estrés celular. Por definición la respuesta al estrés celular puede entenderse como los mecanismos de protección que posee cada organismo, que permiten la adaptación a las variaciones ambientales y fisiológicas (Berlangua

Chiquero 2011). Diferentes condiciones como el estrés térmico, radiación UV, estrés oxidativo, influyen en la síntesis de proteínas, plegamiento, ensamble, desnaturalización, agregación y degradación, afectando su funcionalidad (Morimoto and Westerheide 2010; Richter, Haslbeck, and Buchner 2010; Verghese et al. 2012). Bajo estas condiciones, diferentes procesos se desencadenan en la célula para poder subsanar estos errores, siendo una de la más conocidas la respuesta al choque térmico (en inglés *Heat Shock Response*) (Benarroch 2011; Verghese et al. 2012), considerado uno de los mecanismos endógenos citoprotectores fundamentales en los organismos (Wong 2005).

La primera evidencia de la respuesta de estrés celular aparece en el trabajo de F. Ritossa de 1962, donde se reporta que células de *Drosophila* podían desarrollar una actividad transcripcional muy fuerte cuando se las expone a temperaturas elevadas lo que es evidenciado por la aparición de engrosamientos cromosomales (*puffings*). A este fenómeno, denominado desde entonces como respuesta de choque térmico, llevó a la identificación de las proteínas de choque térmico Hsps (del inglés *Heat Shock Proteins*) (Ritossa 1962). El estudio posterior no solo de este fenómeno permitió entender que este patrón se pone de manifiesto tanto frente a variaciones de temperatura como frente a diferentes estímulos que producen estrés sobre el sistema (Benarroch 2011; Berlanga Chiquero 2011; Ritossa and Von-Borstel 1964).

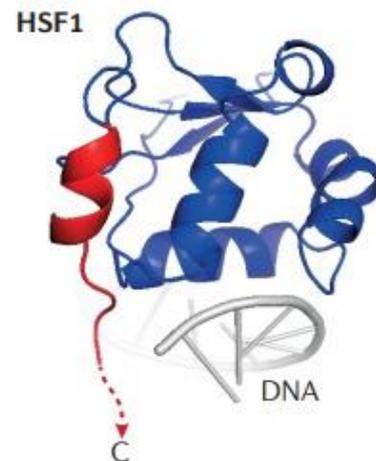
En una situación de estrés térmico, oxidativo, metabólico, mecánico o fisiológico (como ocurre en enfermedades) (Ivan and Huang 2014), las células disponen de un amplio conjunto de proteínas que ofician como mediadoras de la respuesta para tratar de detener el estrés y restablecer las condiciones fisiológicas óptimas. La respuesta al choque térmico, a través de la síntesis elevada de

chaperonas y proteasas moleculares, es rápida de acuerdo con la intensidad y duración de las señales de estrés para restablecer el balance de tráfico, síntesis y degradación de proteínas, conocido como proteostasis, y prevenir un daño proteico mayor (Morimoto and Westerheide 2010). La exposición transitoria a temperaturas elevadas e intermedias tiene efectos citoprotectores contra exposiciones sostenidas, normalmente letales al estrés (Joly et al. 2010; Morimoto and Westerheide 2010; Verghese et al. 2012).

### 1.2 Regulación de la respuesta al choque térmico: HSF1

La regulación de la respuesta al choque térmico está a cargo de los denominados factores de estrés térmico HSFs (del inglés *Heat shock factors*) (Morimoto and Westerheide 2010; Nakai 2016; Yasuda et al. 2017). Los HSFs están altamente conservados y son necesarios para el crecimiento y desarrollo celular normal, además de su importancia central en la adaptación al estrés, la supervivencia y la enfermedad. En humanos, se expresan cuatro genes HSF (HSF1, 2, 3 y 4) siendo el HSF1 (75-80 kDa) esencial para la respuesta al choque térmico (Fig. 1) (Morimoto and Westerheide 2010; Vihervaara and Sistonen 2014; S. Wu et al. 2017).

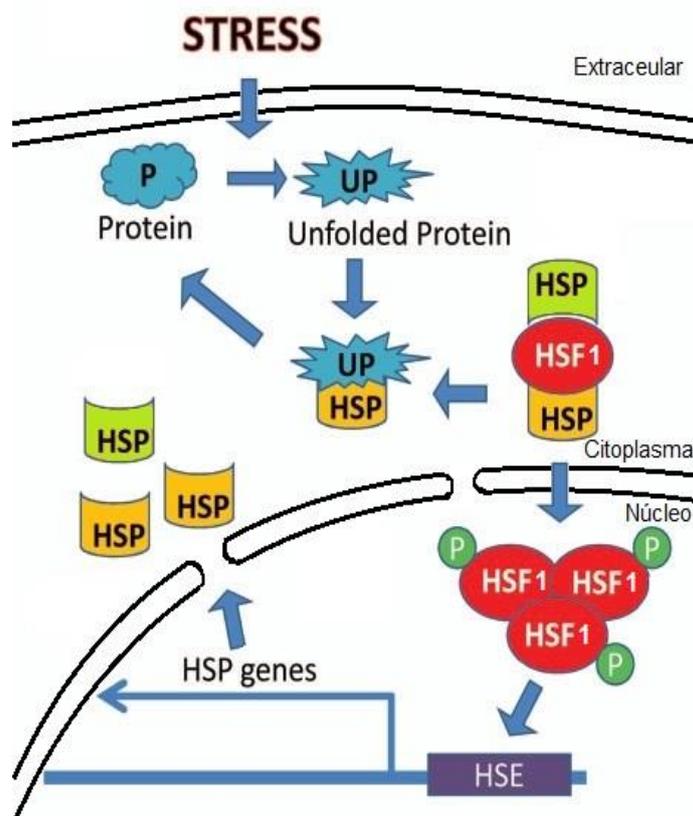
En ausencia de estrés, los monómeros inactivos de HSF1 se encuentran en el citoplasma formando complejos con otras proteínas de estrés térmico tales como



**Figura 1. Estructura del Heat Shock Factor 1, HSF1.** Esquema de la estructura y su interacción con el ADN. Modificado de Gomez-Pastor, Burchfiel, & Thiele, 2017.

Hsp90, Hsp90 y Hsp40 (Gomez-Pastor, Burchfiel, and Thiele 2017; Nakai 2016). Cuando la célula censa una situación de estrés, HSF1 es activado, causando la disociación del complejo de inhibición. En ese momento ingresa al núcleo, se trimeriza con otras dos moléculas de HSF1 y sufre modificaciones post-transcripcionales que promueven su interacción con los elementos de inducción de estrés a nivel del ADN, (del inglés *Heat shock Elements*, HSE) provocando la transcripción de los genes de choque térmico (Gomez-Pastor, Burchfiel and Thiele 2017; Morimoto and Westerheide 2010; Rossin et al. 2018).

HSF1 es el principal factor activado por estrés y se une a los elementos de choque térmico del ADN que consisten en múltiples repeticiones contiguas



**Figura 2. Esquema del inicio y acción de la respuesta al choque térmico.** Heat shock factor 1 (HSF1) inactivado por un complejo de Heat shock proteins (Hsp) se disocia de la mismas frente a una situación de estrés, translocando al núcleo. Allí se trimeriza y se une a los Heat shock elements (HSE) que activan la transcripción de las Hsp. Modificado de Krivoruchko and Storey 2010.

invertidas de la secuencia nGAAn ubicadas en las regiones promotoras de todos los genes de choque térmico (Fig. 2) (Morimoto and Westerheide 2010).

Cuando la respuesta de choque térmico debe apagarse, HSF1 sufre nuevas modificaciones post-traduccionales inhibitorias que conducen a su disociación con el ADN y a la ruptura del homotrímero, provocando su inhibición (Gomez-Pastor, Burchfiel, and Thiele 2017).

Con relación al cáncer de mama, se ha visto que la elevada expresión de HSF1 se correlaciona con un pronóstico negativo de sobrevida en pacientes positivos para receptores de estrógenos (ER positivo) (Gökmen-polar and Badve 2016). Además, el potencial efecto tumorigénico de HSF1 ha sido estudiado en células de cáncer de mama humano, encontrándose que su silenciamiento por pequeños RNA de interferencia (siRNA) disminuye la metástasis en el hígado (Hattori et al. 2017). Otros trabajos indican que la inhibición de este factor tiene efectos supresores sobre las células madre en cáncer de mama (Carpenter et al. 2017).

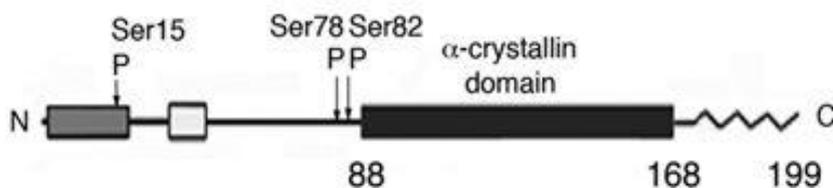
### 1.3 Efectores de la respuesta al choque térmico: Hsps

La característica más importante de la respuesta de choque térmico es la producción de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (Hsps) (Lianos et al. 2015; Morimoto, Kroeger, and Cotto 1996; Pirkkala, Nykänen, and Sistonen 2001; J. Wu et al. 2017). Este conjunto de proteínas es altamente conservado, están distribuidas en todos los compartimientos subcelulares y sus integrantes son clasificadas según su peso molecular: Hsps100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y pequeñas Hsps de menos de 40 kDa (Ito, Honda, and Kobayashi 2006; Khalil et al. 2011; Lianos et al. 2015; Morimoto and Westerheide 2010).

En condiciones normales algunas proteínas sintetizadas pueden plegarse espontáneamente, pero aquellas que poseen multidominios se alteran fácilmente y forman agregados (Arrigo 2011). El reto, *in vivo*, dentro del ambiente densamente empaquetado de la célula es asegurar que los polipéptidos nacientes se plieguen, transloquen y ensamblen en complejos multiméricos; y que los intermediarios no nativos, que se acumulan durante la síntesis normal o que se potencian debido a mutaciones o a estrés, sean captados de manera eficiente y dirigidos a un proceso de replegamiento o degradación (Morimoto and Westerheide 2010; Strauch and Haslbeck 2016).

Parte de esta tarea es llevada a cabo por el grupo de pequeñas Hsps (del inglés, *small Heat Shock Proteins*, sHsps), un conjunto de proteínas de 13 a 43 kDa, tienen en común un dominio  $\alpha$ -cristalino a nivel C-terminal (cerca del 40% de la proteína), extremo C-terminal flexible y una región menos conservada en el extremo N-terminal que contiene un motivo hidrofóbico WDPF (Fig. 3) (Arrigo 2011; Rajagopal et al. 2015). Las pequeñas proteínas forman complejos homo o heteroméricos de 2 hasta 40 subunidades (Arrigo 2011; Haslbeck and Vierling 2015; Khalil et al. 2011; Reddy et al. 2017).

La importancia funcional de este grupo se atribuye a su capacidad de prevenir la agregación *in vitro* de proteínas desplegadas a través de interacciones



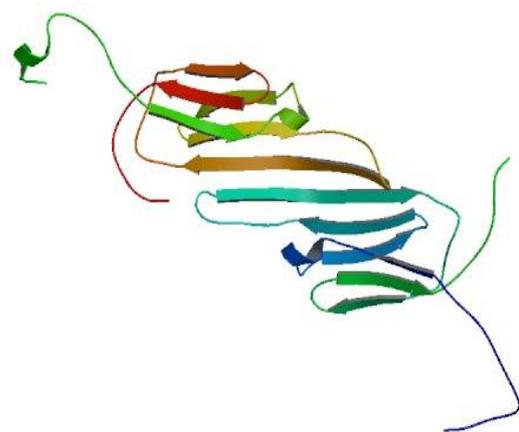
**Figura 3. Estructura lineal de las Hsps.** Representación esquemática de las Hsps que muestra su extremo C-terminal flexible; su dominio  $\alpha$ -cristalino (rectángulo negro); extremo N-terminal con región hidrofóbica WDPF (rectángulo gris) y región conservada (rectángulo claro). Con P son marcados los residuos fosforilados de las serinas 15, 78 y 82 (modificado de Arrigo, 2011).

hidrofóbicas y la habilidad de formar oligómeros altamente heterogéneos en tamaño y composición que expande dramáticamente el espectro de las propiedades y funciones en la célula (Arrigo 2011; Mymrikov, Seit-Nebi, and Gusev 2011). Una vez unidas las sHsps, estas transfieren la proteína mal plegada a chaperonas dependientes de ATP para que finalicen el proceso de replegamiento (Chatterjee and Burns 2017; Reddy et al. 2017). Si este proceso no puede concluirse correctamente, ocurrirá la degradación proteasomal de la proteína desplegada (Arrigo 2011; Morimoto and Westerheide 2010; Reddy et al. 2017).

#### 1.4 Hsp27 y su rol en la respuesta al choque térmico

Una integrante del grupo de sHsps (o su homólogo en ratón, Hsp25) es la Hsp27 (Fig. 4) (Lianos et al. 2015; Reddy et al. 2017; Strauch and Haslbeck 2016). Como su nombre lo indica, posee un peso molecular de 27 kDa y su ubicación ha sido reportada tanto en el citosol (Verghese et al. 2012; Wettstein et al. 2012), como en el núcleo (Bryantsev, Chechenova, and Shelden 2007; Michaud et al. 2008). Según la nomenclatura propuesta por Kampinga *et al.* 2009, que se basa en la nomenclatura genómica del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) y las referencias secuenciales consensuales para humanos y los ortólogos murinos), Hsp27 es denominada HSPB1 (Kampinga et al. 2009).

Hsp27 o (HSPB1) es sintetizada de manera constitutiva en numerosas



**Figura 4. Estructura de Hsp27.** Fragmento de estructura tridimensional de Hsp27 con gran cantidad de láminas de hojas  $\beta$  que le confiere gran rigidez a la estructura (PDB ID 2N3J) (Rajagopal et al. 2015)

células humanas, pero su síntesis es inducida en condiciones patológicas (Homaei-Shandiz et al. 2016; Vidyasagar, Wilson, and Djamali 2012). Esta proteína posee tres serinas conservadas que constituyen sitios de fosforilación frente a situaciones de estrés por activación vía p38 MAP quinasa (figura 3A) (Gaestel et al. 1991; Mao et al. 2005).

Los estados de fosforilación, generados por las diferentes combinaciones de serinas fosforiladas, son los que van a determinar en parte la funcionalidad de la Hsp27. La unión de los grupos fosfatos conlleva al desensamblaje de los oligómeros (hipo-fosforilados), generando monómeros o dímeros fosforilados. Por ello, la capacidad dinámica y compleja de formación/desensamblaje de oligómeros hace que el cambio entre dichos estados, en estas proteínas, pueda verse como un sensor del estado fisiológico de las células (Arrigo 2011; Doshi, Hightower, and Lee 2010).

En la medida que una célula experimenta estrés, Hsp27 fosforilada actúa como chaperona, uniéndose a proteínas con una estructura secundaria total o parcialmente desplegada (Arrigo 2017; Doshi, Hightower, and Lee 2010). Además se transloca del citosol a la región perinuclear, siendo este un marcador clásico de la respuesta al estrés celular (Doshi, Hightower, and Lee 2010; Ehrnsperger et al. 1999).

Como muchas de las sHsps, Hsp27 exhibe una actividad enzimática independiente de ATP (denominada en inglés “holdase activity”) (Arrigo 2011, 2017; Clouser and Klevit 2017). Las holdasas se unen a formas intermedias de plegamiento de proteínas para evitar su agregación pero sin replegarlos directamente. Esta función de Hsp27 es modulada por la variación dinámica en los perfiles de oligomerización que permiten la interacción con las proteínas

desnaturalizadas. Finalmente puede que los polipeptidos estabilizados recompongan su estructura nativa, y con ello su funcionalidad, o bien pueden ser degradados (Arrigo 2011; Okuno et al. 2016; Rajagopal et al. 2015).

### 1.5 Funciones celulares y Hsp27

Observaciones realizadas en células tanto en presencia como en ausencia de estrés, apuntan al hecho de que las sHsps están involucradas en muchos mecanismos celulares diferentes, sugiriendo que tienen funciones variadas en la célula. Esta aparente actividad pleiotrópica de este grupo de proteínas probablemente se deba a su actividad holsada independiente de ATP, que les permite unirse y estabilizar el plegamiento de un gran número de proteínas dianas. (Arrigo 2011; Wettstein et al. 2012).

En particular, Hsp27 se expresa en diferentes tejidos donde participa en procesos que no son directamente dependientes de situaciones de estrés como son: el crecimiento celular (Garrido et al. 1997; Spector et al. 1993); la diferenciación celular (Mehlen et al. 1997; Shakoori et al. 1992); apoptosis (Garrido et al. 1999; Joly et al. 2010); tumorigénesis (Garrido et al. 1998; Wettstein et al. 2012); transducción de señales y modulación de proteínas del citoesqueleto (Doshi, Hightower, and Lee 2010; Lavoie et al. 1993; Wettstein et al. 2012).

#### 1.5.1 Modulación del citoesqueleto de actina por parte de Hsp27

En relación a la remodelación del citoesqueleto, los estudios muestran que Hsp27 juega un rol en el mantenimiento de la integridad tanto en filamentos intermedios como en microfilamentos (Wettstein et al. 2012), pero su acción relevante recae sobre las subunidades que componen los microfilamentos o filamentos de actina (Doshi, Hightower, and Lee 2010; Wettstein et al. 2012).

Hsp27 interacciona con las fibras de actina, bloqueando el extremo más, lo que previene la fijación de nuevos monómeros de actina, actuando por tanto como un inhibidor de la polimerización. Esta actividad inhibitoria por parte de Hsp27 es, sin embargo, sólo efectiva cuando Hsp27 se encuentra en estado de monómero no fosforilado (Benndorf et al. 1994; Doshi, Hightower, and Lee 2010). La interacción entre Hsp27 y la F-Actina puede ocurrir de manera directa o indirecta a través de otras proteínas de unión a la actina (Doshi, Hightower, and Lee 2010; Wettstein et al. 2012).

Los monómeros fosforilados de Hsp27, frecuentes durante una respuesta de estrés, están involucrados en la estabilización de los filamentos de actina, previniendo su agregación (Doshi, Hightower, and Lee 2010; Wettstein et al. 2012). Es decir que durante situaciones de estrés celular Hsp27 funciona como chaperona, mientras que en ausencia del estímulo, dicha proteína brinda estabilidad al citoesqueleto (Clarke and Mearow 2013; Doshi, Hightower, and Lee 2009).

### 1.5.2 Hsp27 en cáncer

En relación con la apoptosis, se ha visto que Hsp27 tiene un alto nivel de expresión en múltiples tumores humanos, inhibiendo dicho proceso mediante la interacción con componentes claves de la señalización apoptótica como las caspasas, Interaccionando con ellas directamente o induciendo la expresión de factores inhibitorios para estas proteínas (Arrigo and Gibert 2014; Benarroch 2011; Garrido et al. 1999; Holliday and Speirs 2011; Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2001). La caspasa-3 interactúa con Hsp27, exhibiendo como resultado de esta interacción la degradación proteolítica dependiente del proteasoma (Arrigo 2011; Reddy et al. 2017). Sin embargo, también ha sido reportado que los fragmentos

generados como consecuencia de la escisión de Hsp27 por parte de la Metaloproteinasa-9 (MMP-9), actúan como fragmentos anti-angiogénicos, que desempeñan un papel clave en la inhibición de la progresión tumoral (Choi et al. 2014).

En relación al cáncer de mama, se ha reportado que Hsp27 provee al tumor de resistencia a diferentes fármacos, favoreciendo la rápida progresión de los procesos de malignización, siendo por tanto un marcador de pronóstico negativo (Bausero et al. 2005; Garrido et al. 2006; Zhang et al. 2015). Además se ha visto que inhibidores de Hsp27 suprimen la resistencia a la droga, teniendo un efecto positivo en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama (Heinrich et al. 2016). También ha sido reportado que el silenciamiento del gen Hsp25 murino por siRNA disminuye la proliferación celular e inhibe la migración, afectando su potencial metastásico (Bausero et al. 2005).

### 1.6 Estrés celular y cáncer: terapias dirigidas

Es un hecho bien documentado que el aumento de estrés celular promueve el desarrollo tumoral (Andrisic et al. 2018; Ivan and Huang 2014; Mohamed, Cao, and Rodriguez 2017; Reuter et al. 2010) y por ello debe ser considerado un factor crucial a la hora de desarrollar terapias específicas. En la actualidad existen diversas terapias tumorales: aquellas enfocadas a matar de forma genérica todas las células que se dividen con rapidez, como la quimioterapia; pero cada vez más la ciencia está avocada al desarrollo y aplicación de terapias dirigidas. Estas últimas tienen como objetivo actuar sobre determinados blancos celulares y/o moleculares, restringiendo su acción al tumor y su microambiente (Hong and Nam 2014; Huang et al. 2013). Entre las diferentes terapias dirigidas, se destacan la aplicación de

pequeños siRNA para apagar la expresión de genes específicos y el empleo de nanopartículas portadoras de fármacos destinados a blancos celulares tumorales (Hong and Nam 2014; Li et al. 2016; Matokanovic et al. 2013).

El éxito de las terapias con siRNA parece ser directamente proporcional a la posibilidad de sortear las barreras propias del huésped (fagocitosis, endonucleasas exógenas) que interfieren con la llegada de estos pequeños RNA a su sitio blanco. (Whitehead, Langer, and Anderson 2009). La incursión de la nanotecnología ha permitido la utilización de diferentes nanopartículas como vehículos de agentes terapéuticos, posibilitando la expansión del estudio de sus efectos y alcances en diferentes modelos tumorales (Kievit and Zhang 2011; Matokanovic et al. 2013; Riki et al. 2013; Wahajuddin and Arora 2012).

### 1.7 Nanopartículas de uso médico

El desarrollo de diferentes sistemas de entrega de drogas como liposomas, emulsiones, polímeros y proteínas, permiten la llegada de las drogas a su sitio blanco, delimitando de esta manera su radio de acción (Riki et al. 2013). Algunos de estos sistemas permiten encapsular el contenido, como es el caso de los liposomas; y en otros la estrategia consiste en la adhesión de la droga a su superficie, como es el caso de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, SPIONs (del inglés, *Superparamagnetics Iron Oxide Nanoparticles* SPIONs) (Muzio et al. 2017; Wahajuddin and Arora 2012). Las SPIONs son pequeñas partículas de maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), magnetita (Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) o hermatita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) con un núcleo que va desde los 10 nm a los 100 nm de diámetro, siendo la magnetita y la maghemita los que tienen mayores aplicaciones biomédicas (Wahajuddin and Arora 2012).

Uno de los diseños para aplicaciones médicas de estas partículas, implica el agregado de una capa externa orgánica o inorgánica que le permiten la interacción con drogas y es dirigida a su tejido diana por la acción de un imán externo (Silva et al. 2016; Wahajuddin and Arora 2012). Por tanto, se pueden adosar a la superficie de las SPIONs distintas estructuras, como siRNA y DNA plasmídico, permitiendo evaluar sus efectos en los sistemas biológicos (Kievit and Zhang 2011; Wahajuddin and Arora 2012).

Está bien documentado que las nanopartículas a determinadas concentraciones no generan efectos citotóxicos en las células, considerándose biocompatibles para su uso en células vivas (Kaur and Tikoo 2013; Kim et al. 2015; Lindemann et al. 2014; Mojica Pisciotti et al. 2014; Murray et al. 2013).

Sin embargo, los niveles y el tipo de estrés celular provocado por la incorporación de nanopartículas en el proceso de la nanoterapia, así como su eventual impacto tumorigénico, han sido escasamente explorados. La evaluación del efecto *per se* del vehículo (nanopartícula) como disparador del estrés celular, podría ser crucial en el balance riesgo/beneficio de estas terapias debiendo ser incorporado como posible control de calidad de las nanopartículas de uso médico.

## **2. HIPÓTESIS**

La incorporación de las nanopartículas SPIONs incrementan el estrés celular en células tumorales, mediado por el incremento del HSF1 y de Hsp27.

## **3. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de las SPIONs en la inducción de estrés celular mediado por HSF1 y Hsp27, en células tumorales murinas que modelizan el cáncer de mama.

### **Objetivos específicos**

Para cumplir con el objetivo general se instrumentarán los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer cultivos de la línea celular tumoral 4T1 de adenocarcinoma mamario murino (población blanco), fibroblastos murinos NIH3T3 y macrófagos murinos J774 (poblaciones control).
2. Establecer los protocolos experimentales para la incorporación de nanopartículas SPIONs en los cultivos mencionados en 1.
3. Determinar la expresión diferencial de las proteínas de estrés HSF1 y Hsp27 luego del tratamiento con nanopartículas SPIONs mediante reconocimiento de su expresión *in situ* (immunomicroscopía confocal cuantitativa) y a través de métodos bioquímicos convencionales (SDS-PAGE-Western blot).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Para el presente trabajo se utilizaron diferentes líneas celulares: 4T1, línea de adenocarcinoma mamario murino; J774, línea de macrófagos monocitarios aislados de ratones BALB/c y fibroblastos embrionarios normales de ratón, NIH3T3.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en condiciones óptimas para su crecimiento como fue descrito previamente por diferentes autores (Bausero et al. 2005; Matokanovic et al. 2013). En síntesis, las células fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% Suero Bovino fetal - FBS (Capricorn Scientific, Alemania), 1X de antibióticos penicilina, estreptomycin y neomicina - PSN (Gibco® 100X, EEUU), 1% piruvato de sodio (PAN™ Biotech stock 100 mM, Alemania), 1X aminoácidos no esenciales (BioWest 100X, EEUU) y 1% glutamina estable (Capricorn Scientific, stock 200 mM, Alemania) en estufa a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Anticuerpos

Los anticuerpos para la detección de Hsp27 y HSF1 por Inmunocitoquímica y Western Blot se describen en la tabla 1 y tabla 2 respectivamente. Para Hsp27 se utilizó un anticuerpo contra fragmentos Hsp25 y Hsp27, que permite detectar homodímeros con masas aparentes de 44 y 27 kDa (Benndorf et al. 2018).

**Tabla 1.** Combinación de anticuerpos primarios con sus correspondientes pares de anti-anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos utilizados para Inmunocitoquímica.

Anticuerpos específicos			Anti-anticuerpos		
	#catálogo	Isotipo		#catálogo	Imunógeno
<b>αHSF1</b>	SMC-118	Rata	<b>Alexa 488</b>	Ab150157	Rata
<b>αHsp25/27</b>	SMC-114D	Ratón	<b>Alexa 546</b>	A-11030	Ratón

Los anticuerpos específicos fueron obtenidos de StressMarq – eBiosciences inc. El anti-anticuerpo unido al fluoróforo Alexa 488 fue obtenido de la empresa Abcam, mientras que el unido al fluoróforo Alexa 546 se obtuvo de la empresa Thermo Fisher Scientific. Los anti-anticuerpos biotinilados conjugados a peroxidasa fueron obtenidos de la empresa Vector Laboratories.

**Tabla 2.** Combinación de anticuerpos primarios con sus correspondientes pares de anti-anticuerpos biotinilados conjugados peroxidasa utilizados para Western Blot.

Anticuerpos específicos			Anti-anticuerpos		
	#catálogo	Isotipo		#catálogo	Imunógeno
$\alpha$ HSF1	SMC-118	Rata	Biot - $\alpha$ Rat	BA-4000	IgG FC Rata
$\alpha$ Hsp25/27	SMC-114D	Ratón	Biot - $\alpha$ Mouse	BA-2000	Ratón

#### 4.3 Nanopartículas

Fueron utilizadas las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro donadas por el Dr. Enio Lima Jr. del Laboratorio de Resonancias Magnéticas del Centro Atómico Bariloche/CONICENT.

Las partículas poseen un diámetro de 20 nm y presentan una bicapa de ácido oleico conjugado a metil-polietilenglicol con un peso molecular de 2000 Da (mPEG2000) con el fin de cambiar su carácter hidrofóbico, a hidrofílico (Silva et al. 2016). Para los tratamientos con estas nanopartículas fueron utilizados los datos de concentración no citotóxica establecidos por Silva et al., siendo la misma de 100  $\mu$ g/ml para una concentración celular de  $1 \times 10^5$  cel/ml (Silva et al. 2016).

#### 4.4 Determinación de la viabilidad celular

Para determinar la concentración óptima de trabajo con las diferentes líneas celulares se realizó ensayo de MTT el cual permite monitorear la citotoxicidad *in*

*in vitro* en muestras de interés. El componente es el 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT, Thermo Fisher Scientific). La viabilidad celular es evaluada mediante la reducción del MTT por parte de en la enzima mitocondrial succinato- deshidrogenasa, en cristales de formazán (color púrpura). Los cristales son disueltos en DMSO y la solución resultante es medida por espectrofotometría a 570 nm (Oddone et al. 2016).

En placa de 96 pocillos se siembran diferentes concentraciones de manera seriadas de las 3 líneas celulares 4T1, J774 y NIH3T3 entre 5.000 células/pocillo hasta 80 células/pocillo. Luego de sembradas, la placa se incuba por 24 h en estufa a 37°C y a 5% CO<sub>2</sub>.

Transcurrido ese tiempo, se realiza un cambio de medio, volviendo a la estufa a 37°C. Al día siguiente, se remueve el medio y se le agrega nuevo, conteniendo el MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml. Tras 3 h de incubación a 37°C y a 5% de CO<sub>2</sub> con el compuesto, se retira el medio de cultivo y los cristales de formazán se solubilizan añadiendo 100 µl de DMSO. Luego de 5 minutos en agitación orbital las placas se leyeron a una longitud de onda de 570 nm y 630 nm, esta última como medida umbral. La absorbancia total se cuantificó como la diferencia entre ambas absorbancias. Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas en un lector de multi-placas institucional Varioskan Flash.

#### 4.5 Inmunocitoquímica

Para obtener localizaciones sub-celulares de las proteínas de interés, así como la intensidad de fluorescencia entre líneas celulares y las diferencias sin y con tratamiento de nanopartículas, se realizó la técnica de Inmunocitoquímica. Este ensayo cualitativo y cuantitativo fue realizado en portaobjetos de 8 campos,

sembrándose cada portaobjeto con un tipo celular con uno de las dos condiciones diferentes: sin tratamiento de SPIONs y con tratamiento de SPIONs. Además, tanto para las 4T1, J774 y NIH3T3 se realizaron controles para asegurar la no reactividad del anticuerpo secundario a ninguna estructura subcelular.

En cada campo se sembraron 250 células/50 µl de medio, se dejaron crecer 48 h. Para la realización del tratamiento con SPIONs se tomaron en cuenta las condiciones y concentraciones utilizadas por los autores que crearon y caracterizaron las partículas (Silva et al. 2016). A las muestras que les correspondía tratamiento con SPIONs transcurrido ese tiempo se les removió el medio y le agregó 50 µl de una solución de 100 µg/ml de SPIONs en medio de cultivo completo y luego de 24 h de exposición a las nanopartículas se comenzó con el protocolo establecido que fue realizado en dos días.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% en buffer PHEM (25 mM HEPES, 60 mM pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2-7,6), 4°C, durante 15 min. Las membranas fueron permeabilizadas con Triton-X-100 al 0,1% en buffer PHEM por 30 min y los grupos aldehídos libres del tejido y los generados por la fijación fueron bloqueados con 1% de Borhidruro de sodio en buffer PHEM por 10 min. Las tres etapas fueron seguidas de lavados que eliminaron los restos de fijador, detergente y borohidruro. Luego se bloquearon los sitios de unión inespecífica de los anti-anticuerpos con buffer de incubación (BI) (glicina 100 nM, 0,1% BSA en PHEM) con 5% de suero normal de cabra (NGS) por 30 min y finalmente las células se incubaron con los anticuerpos específicos en BI (Tabla 1), por 24 h. a 4°C. Ambos anticuerpos se trabajaron en una dilución de trabajo de 1:400. La incubación con los anti-anticuerpos (45 minutos a temperatura ambiente - TA - y en oscuridad), fue precedida de lavados (3 de 15 min) en BI. Los anti-

anticuerpos fueron también diluidos en BI, junto con la sonda DAPI. Las concentraciones de trabajo fueron para Alexa 546 y DAPI de 1:1000, mientras que para Alexa 488 fue de 1:800. Luego se realizan lavados con BI y posteriormente con buffer PHEM. Después de ello se elimina el exceso de humedad y se procede a realizar el montaje de los cubreobjetos con Prolong® Gold Antifade (Invitrogen, EEUU).

Las muestras inmunomarcadas fueron visualizadas y registradas en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 con módulo airscan que permite alcanzar casi un nivel de super-resolución (100 nm). Las condiciones de confiabilidad y los ajustes de parámetros utilizados (fotomultiplicador, intensidad el láser, magnificación, etc) fueron los mismos entre las líneas celulares, cuidándose siempre de que el valor de fotomultiplicador no diera señales en los controles negativos ni tampoco resultara en una imagen saturada, es decir que no permitiera evaluar las estructuras.

#### 4.6 Electroforesis SDS PAGE

Esta técnica permite detectar proteínas en distintas muestras, separándolas únicamente por su tamaño (). Para poder realizar esta técnica fueron sembradas las diferentes líneas celulares mencionadas anteriormente.

El diseño experimental consistió en controles positivos y negativos para poder evaluar el comportamiento de las células tratadas con SPIONs. Para ello se utilizó como control negativo células sin tratar y como control positivo células a las cuales se les realizó un tratamiento de choque térmico.

El tratamiento de choque térmico fue realizado en un horno de hibridación con temperatura controlada a 42°C donde las células fueron expuesta a dicha

temperatura por 40 min. Luego de transcurrido ese tiempo las células volvieron a la estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 24 h.

Conjuntamente con la aplicación del tratamiento de choque térmico, las células correspondientes fueron tratadas con SPIONs en la concentración establecida, y volvieron a la estufa por 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Transcurrido ese tiempo las células fueron removidas, lavadas en PBS y resuspendidas en un buffer de lisis Tris- HCL 5 mM; EGTA 2 mM y 1X de anti-proteasas a pH 7,3 - 7,5. A partir de este momento las muestras fueron mantenidas en cadena de frío y se procedió a homogeneizar las distintas muestras mediante sonicación.

Una vez que se obtuvieron los homogeneizados tanto de 4T1, J774 y NIH3T3 en sus diferentes condiciones, control negativo (C-); control positivo (C+) y tratadas con SPIONs (c/Sp), los mismos fueron evaluados por el método de Bradford para determinar la concentración de proteínas de las muestras, midiéndola a 595 nm en el equipo institucional Varioskan Flash.

Para detectar la presencia de HSF1 y Hsp27 se hicieron dos geles (gemelo y transferido) los cuales se cargaron con la misma cantidad de proteínas (15 µg/pocillo) y fueron resueltos por SDS-PAGE. De esta manera las muestras pasaron inicialmente por un gel concentrador de 5% de acrilamida bis-acrilamida (ABA) a un voltaje constante de 80 mV (amperaje variable) y posteriormente fueron separadas por un gel de 15% de ABA a 100 mV utilizando un buffer de corrida (25 mM de Tris, 190 mM Glicina 0,1% SDS). El marcador de peso molecular utilizado fue SDS Molecular Weight Marker MW-SDS-70L (Sigma-Aldrich®, EEUU). Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se desmontaron. Uno de ellos, gel gemelo, se tiñó con una solución de azul de Coomassie al 2% manteniéndose en

agitador orbital por 2 h. Transcurrido dicho tiempo, fue cambiado a una solución de desteñido, que consiste en 50% de etanol y 10% de ácido acético en agua, y mantenido en el agitador orbital hasta que se visualizan bandas discretas. El otro gel, fue utilizado para realizar la transferencia y el posterior Western Blot (WB). Se utilizó membrana PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro (Imobilon-P, Merck Milipore, EEUU). La transferencia se realizó en cuarto frío, a 35 mA (voltaje variable) por 18 h, utilizando buffer de transferencia (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 20% Etanol). Transcurrido ese tiempo, el gel transferido sigue el mismo procedimiento que el gel gemelo; el control para asegurar la no reactividad del anticuerpo secundario a ninguna estructura subcelular y el marcador de peso molecular fueron recortados de la membrana. Este último fue revelado con AmidoBlack al 0,2%; mientras que sobre el resto de la membrana se realiza el protocolo de WB (membrana con muestras y control).

Para el bloqueo se utilizó una solución de PBS-Tween 0,1% (PBS-T) con 0,5% de leche descremada (PBS-T-LD), incubando la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados para eliminar el exceso de bloqueador. Todos los lavados fueron realizados en PBS-T por 5 min a TA. Las concentraciones de trabajo fueron de 1:5000 para el anticuerpo Hsp25/27 y para el anticuerpo HSF1 1:1000. La incubación de los mismos fue realizada por 15 min a TA, luego a 4°C por 24 h y finalmente a TA por 45 min. Tres lavados se realizaron previo a la incubación con los anti-anticuerpos biotinilados diluidos en solución de PBS-T-LD (Tabla 2), la cual se incubó por 1 h a TA. Para la detección se utilizó el kit Vectastain® Elite ABC HRP - peroxidasa (Cat. N° PK-6100, Vector Laboratories®, EEUU) y como cromógeno se utilizó el kit DAB sustrato de peroxidasa (Cat. N° SK-4100, Vector Laboratories®, EEUU)

#### 4.7 Procesamiento de imagen y análisis estadístico

Las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji – ImageJ, GraphPad Prism 6 y compaginadas con Adobe Photoshop®. Todos los valores de fluorescencia obtenidos en Image- J fueron analizados con el test *t - student* con una significación estadística  $p < 0,05$ .

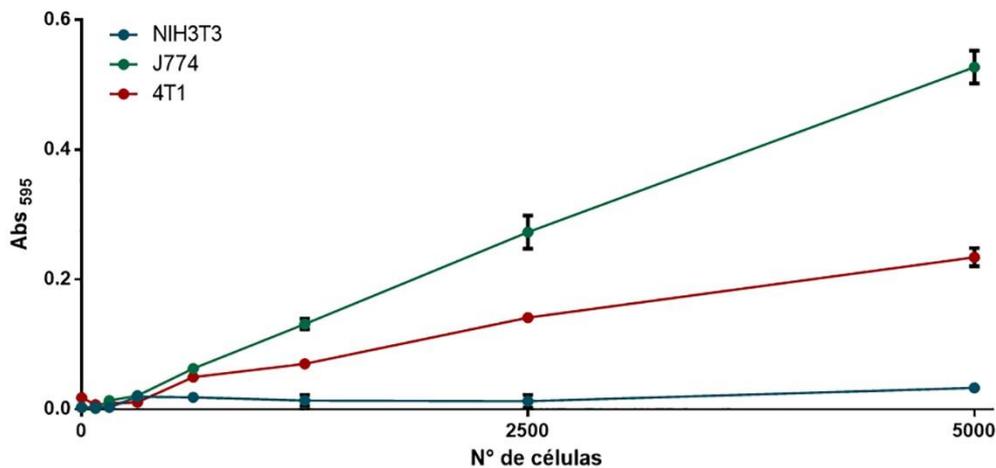
Para el análisis del incremento de intensidad de HSF1 y de Hsp27 por el efecto de las SPIONs, los valores de intensidad de cada compartimento fueron ordenados, en condiciones con tratamiento y sin tratamiento, para realizar posteriormente el cociente: Con SPIONs/Sin SPIONs para cada par de valores.

Con el objetivo de evaluar las variaciones de intensidades de HSF1 y de Hsp27 entre compartimentos en función del tratamiento con SPIONs, se estableció un factor que se calculó como el cociente entre los valores de intensidad del núcleo/ intensidad del citoplasma, en cada tipo celular sin y con tratamiento de SPIONs

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Viabilidad celular por MTT

Se estudió el crecimiento de las líneas celulares midiendo su viabilidad celular por ensayo de MTT (Fig. 5). Los valores obtenidos muestran que las células con mayor tasa de crecimiento son los macrófagos; mientras que aquellos que muestran un crecimiento más lento son los fibroblastos.



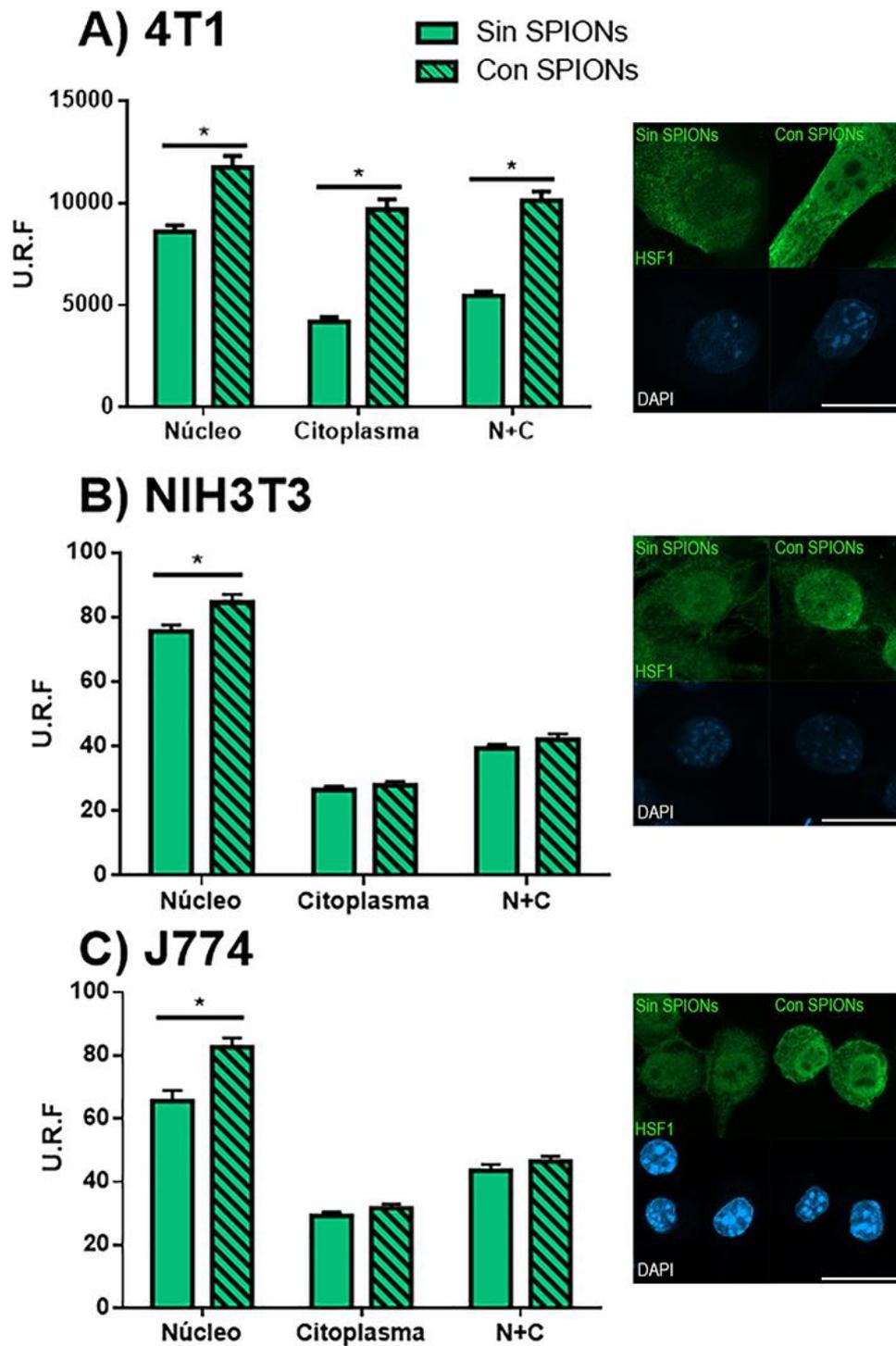
**Figura 5. Crecimiento celular por ensayo de MTT.** Se estudió el crecimiento de las tres líneas empleadas en el presente trabajo. La línea de macrófagos murinos J774 presentó un mayor crecimiento, seguida por la línea tumoral de adenocarcinoma mamario murino 4T1 y por último la línea de fibroblastos murinos NIH3T3.

### 5.2 Cuantificación y distribución de HSF1 por ICQ

Estudios realizados en las diferentes líneas celulares por inmunomarcación indirecta ponen de manifiesto patrones de intensidad de fluorescencia característicos de cada tipo celular y sus diferencias entre células no tratadas y con tratamiento de SPIONs.

**Tabla 3.** Valores de intensidad de fluorescencia promedio para HSF1 en las tres líneas celulares de trabajo, sin y con el tratamiento de SPIONs. U.R.F. Unidades relativas de fluorescencia.

HSF1(U.R.F) $\bar{X} \pm \text{SEM}$	Sin SPIONs		Con SPIONs	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
<b>4T1</b>	8608,4 $\pm$ 300,3	4210,9 $\pm$ 209,5	11761 $\pm$ 560,7	9698,7 $\pm$ 501,7
<b>NIH3T3</b>	75,6 $\pm$ 2,0	26,5 $\pm$ 1,1	84,6 $\pm$ 2,5	28 $\pm$ 1,2
<b>J774</b>	65,7 $\pm$ 3,2	29,3 $\pm$ 1,2	82,7 $\pm$ 2,8	31,8 $\pm$ 1,2



**Figura 6. Intensidad de fluorescencia de HSF1.** Valores de intensidad e imágenes de las líneas celulares sin tratamiento (barras lisas) y con tratamiento (barras con líneas oblicuas) de SPIONs. A) Línea de adenocarcinoma mamario de ratón, 4T1, muestra diferencias significativas por el tratamiento de SPIONs en el núcleo y en el citoplasma. B) Fibroblastos embrionarios murinos normales, NIH3T3. Diferencias significativas solo en el núcleo. C) Línea celular de macrófagos normales murinos, J774. Con diferencias significativas solo en el núcleo. Se consideró diferencia significativa los valores con un  $p < 0,05$ . Escala 20  $\mu\text{m}$ .

Los valores de intensidad de fluorescencia, y los histogramas obtenidos del análisis de microscopía confocal para HSF1 se muestran en tabla 3 y figura 6 respectivamente.

En 4T1, la intensidad de fluorescencia basal de HSF1 muestra valores mayores en el núcleo con respecto del citoplasma (Fig. 6A, barras lisas). Luego del tratamiento con SPIONs, se vio un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de HSF1 tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. 6A, barras con líneas oblicuas). Para la línea de fibroblastos normales, NIH3T3, se vio una intensidad de fluorescencia basal de HSF1 en ambos compartimientos, siendo mayor en el núcleo (Fig. 6B, barras lisas).

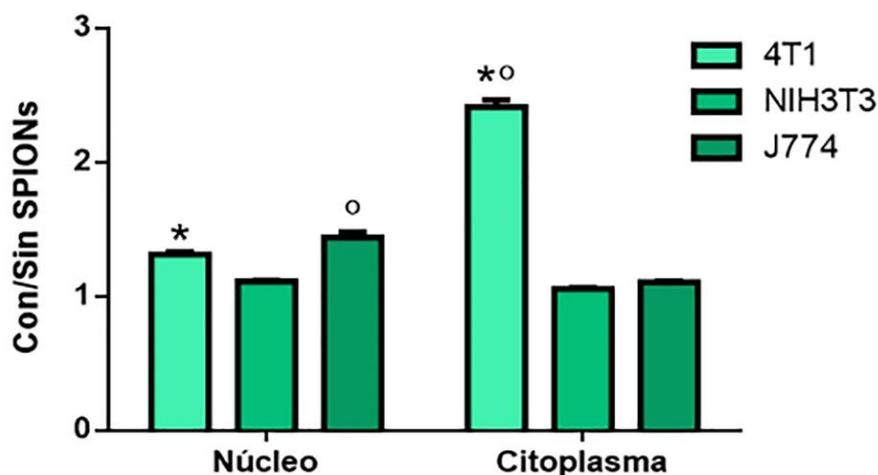
Los valores de intensidad luego del tratamiento con nanopartículas, mostraron un aumento que solo fue significativo en el compartimiento nuclear de los fibroblastos murinos (Fig. 6B, barras con líneas oblicuas). Para la línea J774, la intensidad de fluorescencia de base marcó valores mayores para el núcleo con respecto del citoplasma (Fig. 6C, barras lisas). Posterior al tratamiento con SPIONs, los valores mostraron un aumento en ambos compartimientos, pero solo fue significativo en el núcleo (Fig. 6C, barras con líneas oblicuas).

**Tabla 4.** Valores de intensidad promedio de la relación Con SPIONs/Sin SPIONs para HSF1 en las líneas celulares estudiadas.

HSF1 $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Con/Sin SPIONs	
	Núcleo	Citoplasma
<b>4T1</b>	1,31 $\pm$ 0,02	2,41 $\pm$ 0,05
<b>NIH3T3</b>	1,11 $\pm$ 0,01	1,06 $\pm$ 0,01
<b>J774</b>	1,44 $\pm$ 0,04	1,1 $\pm$ 0,01

La tabla 4 muestra los valores obtenidos del cociente ‘Con SPIONs/Sin SPIONs’ para cada línea celular y la figura 7 muestra la gráfica resultante.

En todas las líneas celulares, el factor ‘Con SPIONs/Sin SPIONs’ es mayor a 1, lo que indica que, sin importar la línea y el compartimiento, hubo un aumento de la intensidad de fluorescencia en presencia de las SPIONs. Sin embargo, al comparar la línea tumoral, 4T1, con las líneas celulares normales, NIH3T3 y J774, vemos diferencias entre los compartimientos (Fig.7). Cuando comparamos 4T1 con NIH3T3, los valores de la línea tumoral son significativamente mayores que los de la línea normal, tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig 7., indicado con ‘\*’). Por el contrario, al comparar 4T1 con J774, vemos que en el compartimiento nuclear, los valores del factor son mayores en J774, mientras que en el citoplasma los valores mayores corresponden a la línea tumoral (Fig.7., indicado con ‘°’).

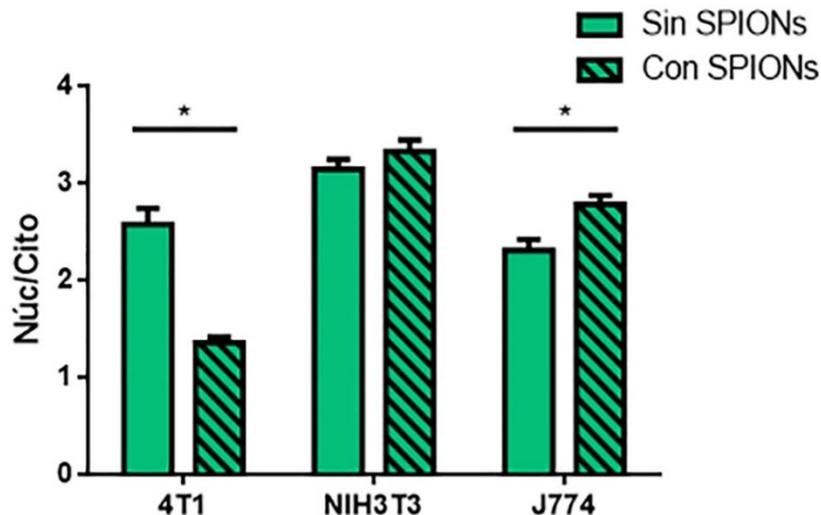


**Figura 7. Relación de intensidad de HSF1 ‘Con SPIONs/Sin SPIONs’.** Valores obtenidos para cada línea celular evaluado en el compartimiento nuclear y citoplasmático. (\*) Comparación entre 4T1 y NIH3T3. (°) Comparación entre 4T1 y J774. Se tomaron diferencias significativas con un p valor <0,05.

**Tabla 5.** Valores de intensidad promedio de la relación Núcleo/Citoplasma en líneas celulares 4T1, NIH3T3 y J774 con y sin tratamiento de SPIONs para HSF1 en las líneas celulares estudiadas.

HSF1 $\bar{x} \pm SEM$	Núcleo/Citoplasma	
	Sin SPIONs	Con SPIONs
<b>4T1</b>	2,58 $\pm$ 0,16	1,36 $\pm$ 0,06
<b>NIH3T3</b>	3,15 $\pm$ 0,10	3,33 $\pm$ 0,12
<b>J774</b>	2,31 $\pm$ 0,12	2,79 $\pm$ 0,09

Los valores obtenidos del cociente de intensidades Núcleo/citoplasma se muestran en la tabla 5. El comportamiento del factor en cada línea celular estudiada muestra diferencias en la relación núcleo-citoplasma de HSF1 (Fig.8): en las líneas celulares normales, solo en J774 se vio un aumento significativo del factor, comparando células sin tratar con células tratadas, lo cual se traduce en un aumento de HSF1 en el compartimiento nuclear. Por el contrario, en la línea tumoral, se observó un descenso del factor cuando el cultivo fue tratado con



**Figura 8. Factor de intensidad de HSF1 Núcleo/Citoplasma.** Relación entre compartimientos en células sin tratamiento y con tratamiento de SPIONs. 4T1 muestra una disminución del factor luego de tratamiento con NPs, mientras que J774 presenta un aumento del factor. Valores significativos con un p valor < 0,05.

SPIONs. Esta baja se relaciona con un aumento de la intensidad de HSF1 a nivel citoplasmático.

### 5.3 Cuantificación y distribución de Hsp27 por ICQ

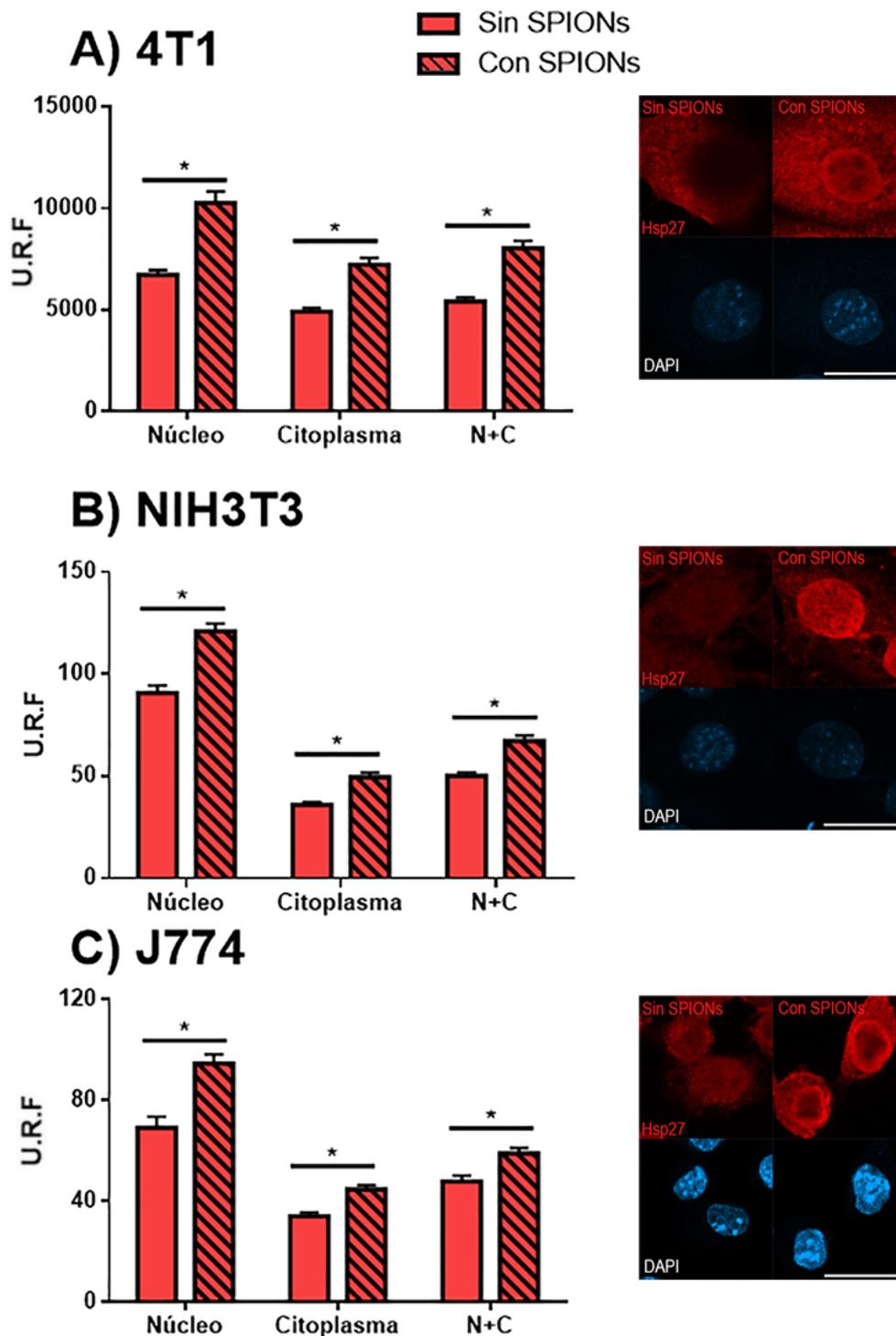
El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de la proteína Hsp27 se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que para HSF1. Inicialmente se obtuvieron valores sobre la intensidad basal de cada línea celular y posteriormente se evaluó el cambio en la intensidad que tuvo cada uno de los cultivos cuando fueron tratados con SPIONS (Tabla 6, Fig. 9).

Los valores obtenidos en condiciones de no tratamiento (Fig. 9, barras lisas) marca un nivel de intensidad basal mayor en el núcleo en relación al citoplasma para las tres líneas estudiadas. La línea 4T1 mostró, frente al tratamiento con nanopartículas, aumentos en la intensidad de fluorescencia de la proteína Hsp27 en ambos compartimientos (Fig. 9A, barras con líneas oblicuas). De la misma manera, se vieron aumentos significativos en los fibroblastos y macrófagos murinos luego del tratamiento del SPIONs (Fig. 9B y 9C, barras con líneas oblicuas).

La evaluación de la relación de intensidad entre valores con y sin SPIONs (tabla 7) revela que, en el compartimiento nuclear, existió un aumento significativo solo comparando la línea tumoral con los macrófagos, siendo mayores los valores de estos últimos (Fig. 10, indicado con ‘°’).

**Tabla 6.** Valores de intensidad de fluorescencia promedio para Hsp27 en las tres líneas celulares de trabajo, sin y con el tratamiento de SPIONs

Hsp27(U.R.F.) X̄±SEM	Sin SPIONs		Con SPIONs	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
<b>4T1</b>	6726,3 ± 251,0	4929,3 ± 188,8	10280 ± 574,1	7241,9 ± 332,6
<b>NIH3T3</b>	90,9 ± 3,5	36,1 ± 12,1	121,1 ± 3,8	49,5 ± 2,3
<b>J774</b>	69,7 ± 4,4	34,1 ± 1,4	94,6 ± 3,9	44,8 ± 1,8



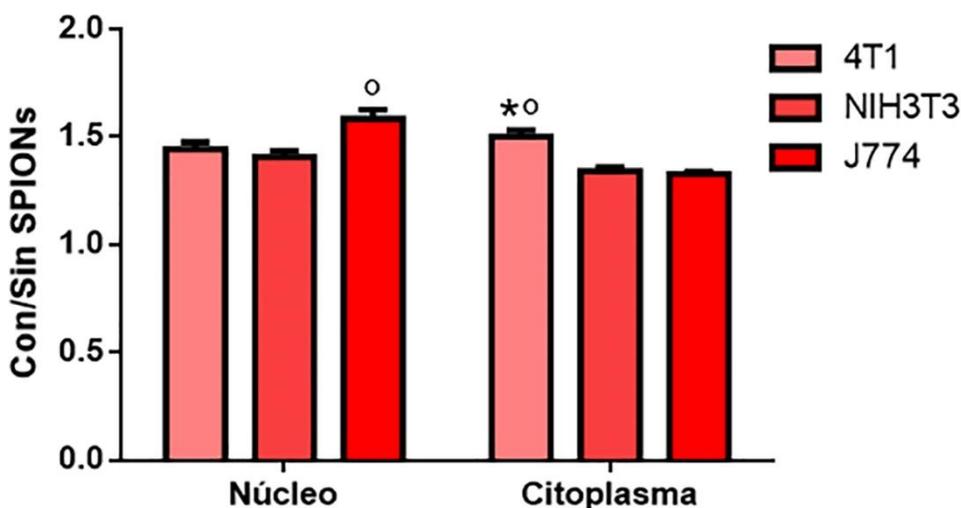
**Figura 9. Intensidad de fluorescencia de Hsp27.** Valores de intensidad e imágenes de las líneas celulares sin tratamiento (barras lisas) y con tratamiento (barras con líneas oblicuas) de SPIONs. A) Línea de adenocarcinoma mamario de ratón, 4T1, muestra aumento de intensidad por el tratamiento de SPIONs en el núcleo y en el citoplasma. B) Fibroblastos embrionarios murinos normales, NIH3T3, evidencian diferencias significativas en ambos compartimientos. C) Línea celular de macrófagos normales murinos, J774, con aumento de intensidad en el compartimento nuclear y citoplasmático. Se consideró diferencia significativa los valores con un  $p < 0,05$ . Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 7.** Valores de intensidad promedio de la relación Con/Sin SPIONs para Hsp27 en las líneas celulares estudiadas.

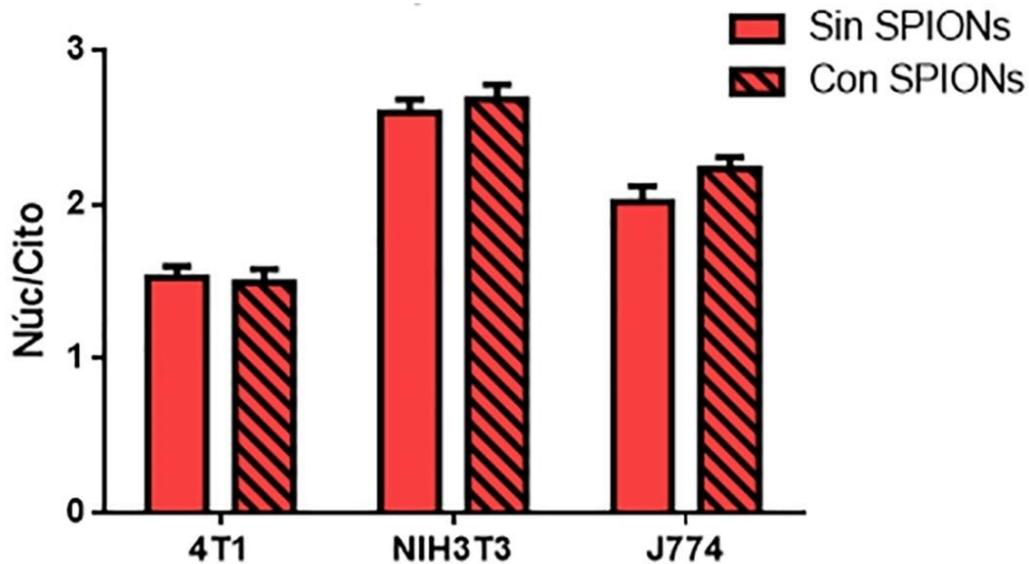
Hsp27 $\bar{X} \pm SEM$	Con/Sin SPIONs	
	Núcleo	Citoplasma
<b>4T1</b>	1,44 ± 0,03	1,5 ± 0,03
<b>NIH3T3</b>	1,41 ± 0,03	1,34 ± 0,02
<b>J774</b>	1,58 ± 0,04	1,33 ± 0,01

En cambio, en el citoplasma, la línea tumoral mostró una variación significativa en comparación tanto con NIH3T3 (en la imagen, ‘\*’) como con J774 (‘°’), siendo mayores los valores mostrados por la línea 4T1 (Fig. 10).

La distribución de la intensidad de la proteína entre compartimientos, no reveló diferencias entre la relación núcleo/citoplasma antes y después del tratamiento (Figura 11). Es decir, la intensidad de cada cultivo aumentó, pero la relación entre los compartimientos se mantuvo constante.



**Figura 10.** Relación de intensidad de Hsp27 ‘Con SPIONs/Sin SPIONs’. Valores obtenidos para cada línea celular evaluado en el compartimiento nuclear y citoplasmático. En el núcleo, se observa un incremento de la relación entre 4T1 y J774, mientras que, en el citoplasma, 4T1 posee valores mayores en comparación con líneas normales. (\*) 4T1 frente a NIH3T3. (°) 4T1 frente a J774. Se tomaron diferencias significativas con un p valor <0,05.

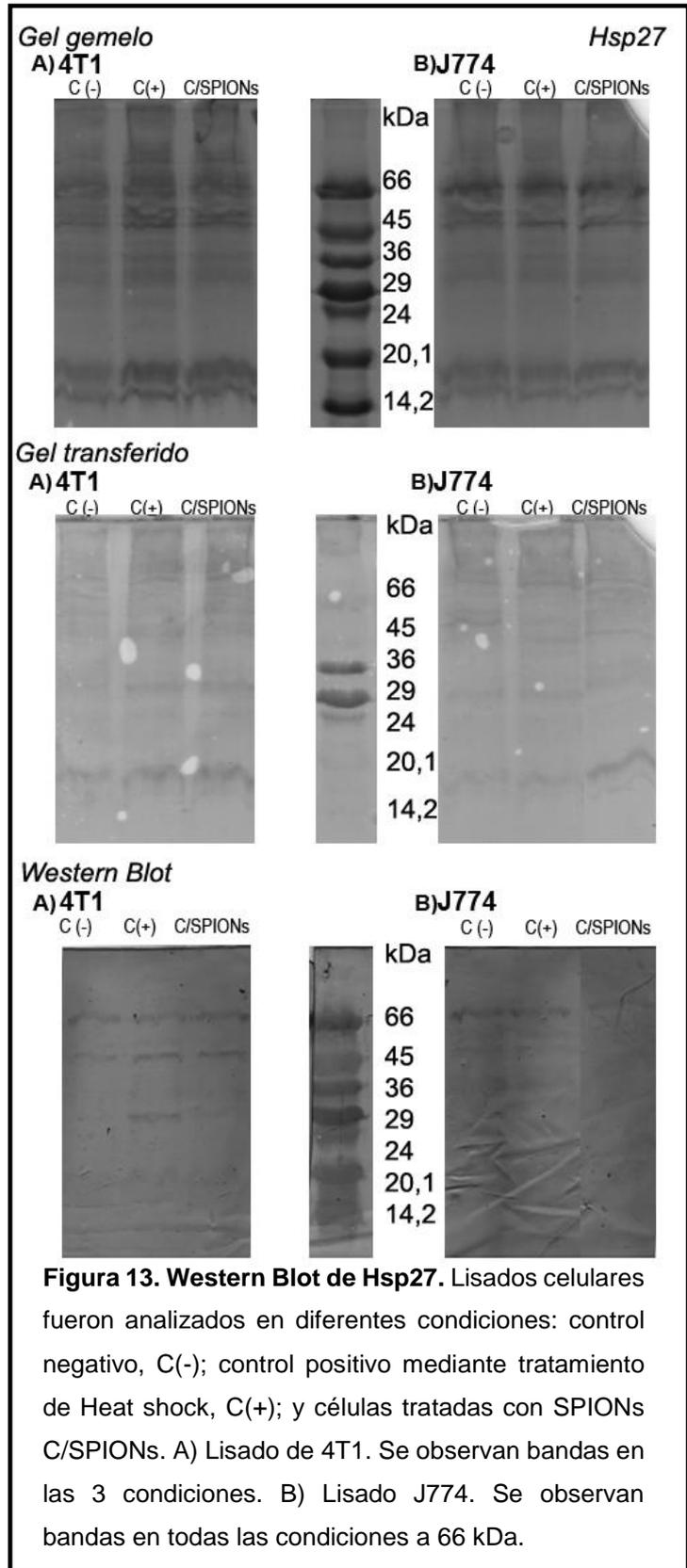
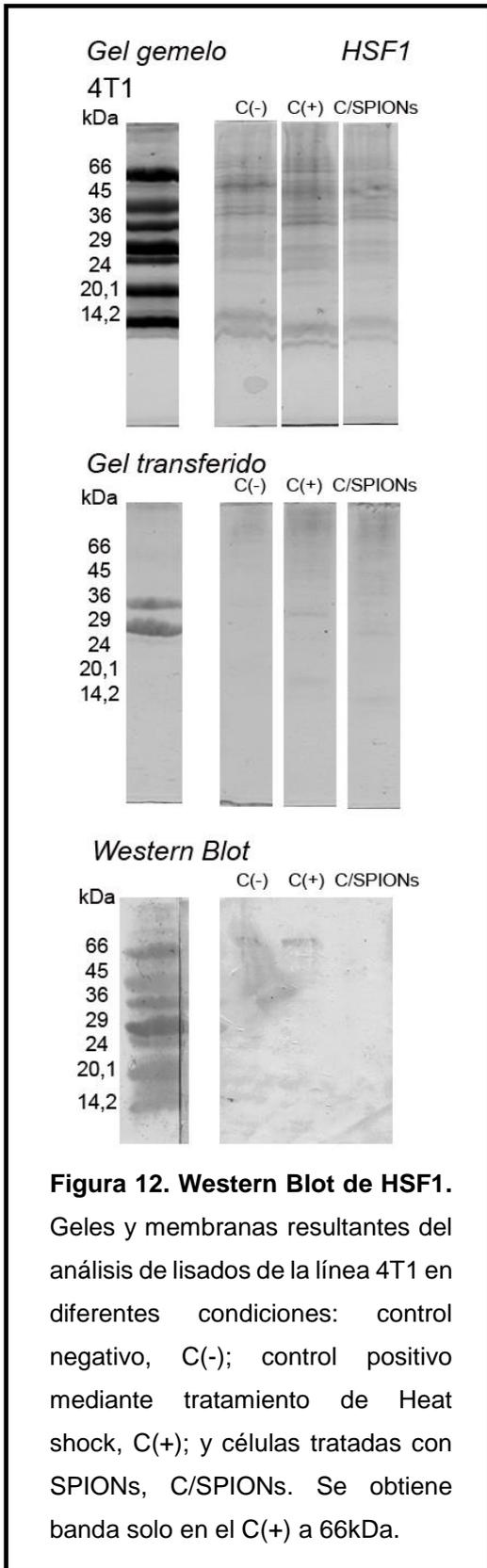


**Figura 11. Factor de intensidad de Hsp27 Núcleo/Citoplasma.** Relación entre compartimientos en células sin tratamiento y con tratamiento de SPIONs. No existen diferencias significativas en cultivos con y sin tratamiento de nanopartículas.

#### 5.4 Expresión de HSF1 y Hsp27 en lisados celulares por WB

El análisis bioquímico fue realizado en células tumorales 4T1 y macrófagos J774 en tres condiciones: células sin tratamiento (control negativo, C(-)); células con tratamiento de shock térmico (control positivo, C(+)) y células tratadas con SPIONs (C/SPIONs). En todos los casos se compararon los geles gemelos frente a los transferidos, para evaluar la eficiencia de la transferencia, obteniendo como resultado procesos que ocurrieron con gran efectividad.

En 4T1, encontramos que la banda de HSF1 aparece en el control negativo y positivo, cercana a la banda de 66 kDa (Fig. 12). En cambio, para Hsp27 se observaron bandas en las tres diferentes condiciones en diferentes tamaños: C(-) 66 y 45 kDa; C(+) 66, 45 y 29 kDa; C/SPIONs 66 kDa (Figura 13. A). Para la línea J774 vimos que la proteína Hsp27 la encontramos en todas las condiciones con una banda bien marcada a 66 kDa y otras, en C(-) y C(+), menos intensas a entre

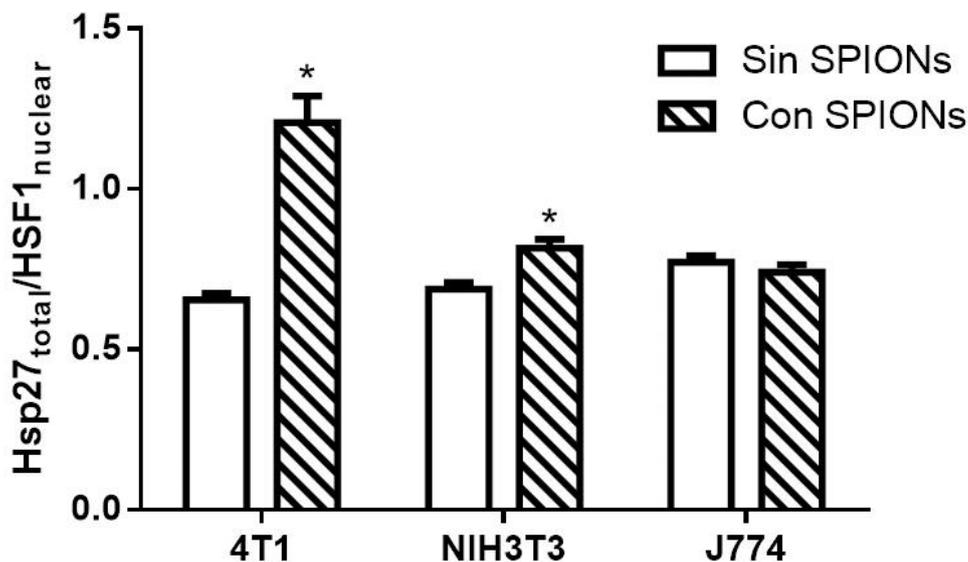


45 y 66 kDa (Figura 13 B). El análisis bioquímico de la línea J774 continúa en curso, por esta razón solamente obtuvimos resultados para la expresión de la proteína Hsp27.

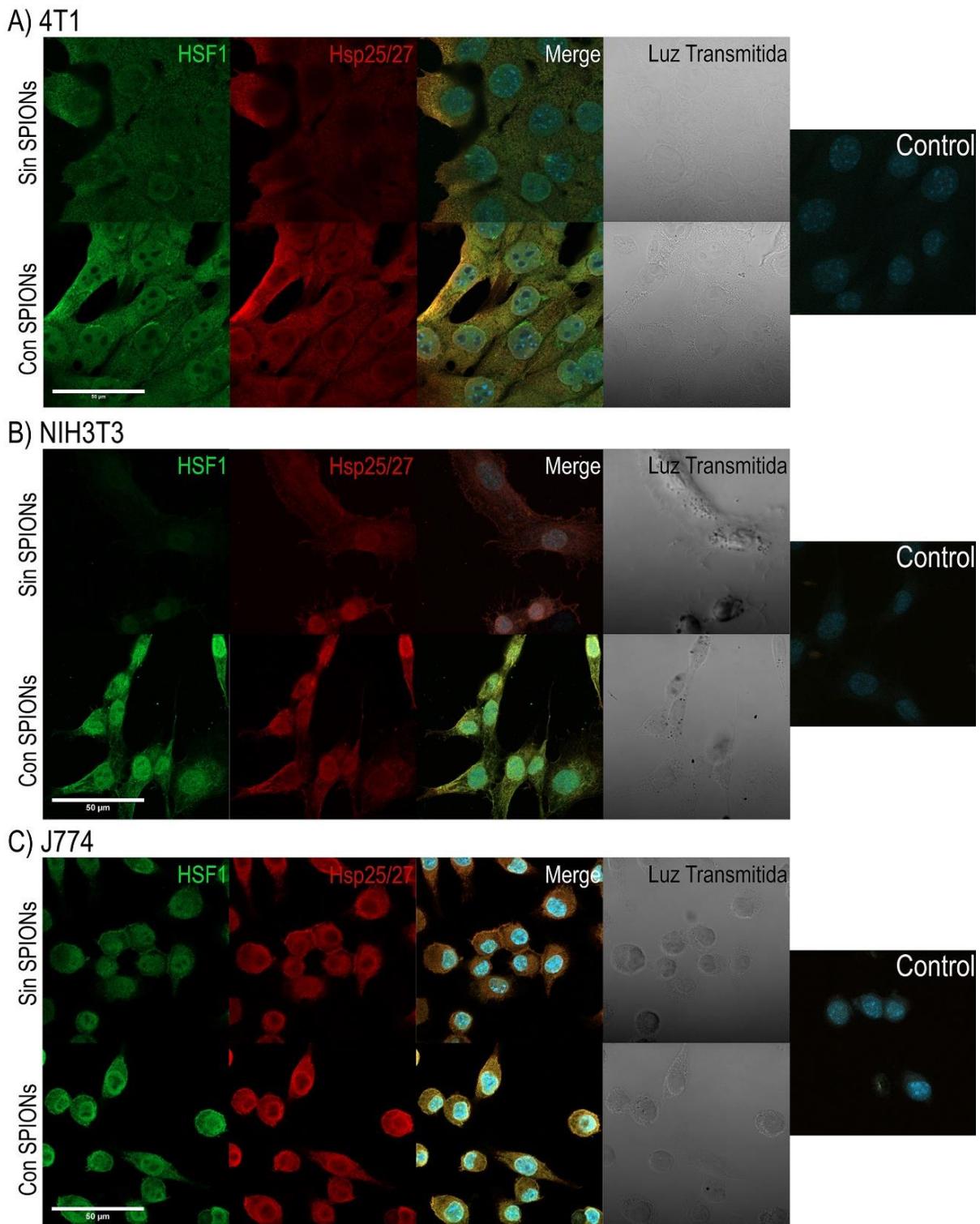
### 5.5 Respuesta de estrés generada por SPIONs

Para estudiar la inducción de HSF1 sobre Hsp 27 se tomaron los valores de intensidad correspondiente de cada célula para realizar un cociente entre  $Hsp27_{total}/HSF1_{nuclear}$ . Esta medida permite entender de qué manera el aumento de HSF1 repercute en la producción de proteína Hsp27 (Fig.14)

Encontramos que, dentro de las células normales, se dio un incremento significativo solo en los fibroblastos NIH3T3; mientras que en células tumorales 4T1, la relación de proteína total frente al factor aumentó casi dos veces con tratamiento de nanopartículas.



**Figura 14. Medida de la modulación de HSF1 nuclear sobre Hsp27 total.** Valores de intensidad de fluorescencia de la proteína total fueron divididos sobre las intensidades de HSF1 nuclear para cada célula, en cada línea celular, en condiciones de no tratamiento (barras lisas) y con tratamiento de SPIONs (barras con líneas oblicuas). En las líneas celulares normales, NIH3T3 y J774, solo vimos aumento significativo leve en fibroblastos normales NIH3T3. En 4T1 se vio un incremento de la relación casi al doble, es decir que se necesita la mitad del factor que, en condiciones de no tratamiento, para sintetizar la misma cantidad de Hsp27. Diferencias con un  $p$  valor < 0,05.



**Figura 15. Imágenes de microscopía confocal.** Imágenes de los cultivos celulares con la técnica de inmunomarcación inmunocitoquímica. Se observan HSF1 en verde, Hsp27 en rojo, el compilado con la son da DAPI (merge) y una imagen de luz transmitida. A) Línea celular de adenocarcinoma mamario murino, 4T1. B) Línea celular de fibroblastos embrionarios murinos, NIH3T3. C) Línea celular de macrófagos murinos, J774. Escala: 50µm.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la utilización de nanopartículas SPIONs, en concentraciones indicadas como no citotóxicas, promueven la respuesta de estrés, evaluado por el incremento de HSF1 y Hsp27 tanto en células tumorales como en células normales.

Según la teoría, la activación de la cascada de respuesta al estrés se inicia cuando monómeros de HSF1, que se encuentran en el citoplasma, son activados en respuesta a cualquier estrés. La fosforilación de HSF1 y su liberación del complejo de inhibición hace que los monómeros se transloquen al núcleo para pasar a la forma activa de homotrímeros. Esta forma es la que se une al ADN promoviendo la síntesis de diferentes proteínas Hsps, entre ellas Hsp27, para recomponer la proteostasis. Considerando a las nanopartículas como un evento generador de estrés, de acuerdo al concepto antes descrito y de nuestra hipótesis, era de esperar que el tratamiento con nanopartículas causara un aumento del HSF1 nuclear, ya que su acción ocurre en ese compartimiento, y este impulsara la producción de Hsp27, incrementándose tanto en el núcleo como el citoplasma. Este razonamiento fue el visualizado en las líneas normales, NIH3T3 y J774, donde el aumento de la proteína Hsp27 en ambos compartimientos se dio junto con el aumento de HSF1 nuclear en presencia de nanopartículas.

Sin embargo, en la línea tumoral 4T1 encontramos que el tratamiento de SPIONs provocó un aumento en ambos compartimientos celulares no solo en la proteína Hsp27, sino también del factor HSF1. El aumento de la intensidad de HSF1 en el núcleo es coherente con la línea de pensamiento, porque además vemos el aumento en la proteína Hsp27, a pesar de que la relación de intensidades

entre compartimientos de esta última se mantiene. Lo que se destaca es el aumento de HSF1 a nivel citoplasmático, que se visualiza claramente cuando hacemos el análisis de las relaciones calculadas posteriormente, donde ‘Con SPIONs/ Sin SPIONs’ muestra un valor para HSF1 de 2,41 en el citoplasma de células 4T1 tratadas y se da una baja en la relación ‘Núcleo/Citoplasma’ de 2,58 sin tratamiento a 1,36 en presencia de nanopartículas.

Las imágenes de las células inmunomarcadas muestran la existencia de agregados perinucleares de HSF1 en células 4T1 con tratamiento de SPIONs (Fig.15.A), siendo la posible causa de su incremento en ese compartimiento. Pero, este efecto no puede explicarse únicamente por el uso de la SPIONs, ya que el mismo no se visualiza en las líneas celulares normales.

Cuando comparamos células normales como macrófagos, que por su naturaleza están permanentemente censando el exterior, pretendíamos buscar un control que permitiera tener una gran actividad metabólica, similar a una célula tumoral. Cuando analizamos la relación ‘Con SPIONs/Sin SPIONs’ entre 4T1 y macrófagos vemos que tanto para HSF1 como para la proteína Hsp27 hay una diferencia significativa en favor de J774. Esto marca que hay una disminución de transporte entre compartimientos en la célula tumoral. Otro aspecto que resalta es que la medida que establecemos como “eficiencia transcripcional” muestra valores casi del doble cuando las células tumorales son tratadas con SPIONs. Esto indica que, en principio, habría una mejora de la eficiencia, ya que se necesita la mitad del factor que en condiciones normales para obtener la misma cantidad de proteína.

Nuestros hallazgos permiten plantear la hipótesis de que existe, en células tumorales, una independencia parcial de la proteína Hsp27 con relación al factor HSF1. Esta idea se basa en que la respuesta está igualmente activa a pesar de

que HSF1 se encuentra formando agregados citoplasmáticos perinucleares (presumiblemente inactivos), existiendo un incremento de la intensidad de fluorescencia de Hsp27 aun cuando el incremento del factor nuclear es menor que en condiciones sin tratamiento. Para poder responder esta cuestión debemos realizar un análisis de qPCR para evaluar la regulación transcripcional que el factor hace sobre la proteína. De esta manera podremos hacer de manera certera si la síntesis de la proteína depende o no de manera parcial o total de HSF1.

Entendiendo que la activación de la respuesta de estrés, en un contexto tumoral, favorece el desarrollo del tumor, contribuyendo al microambiente tumoral, vimos que el uso de nanopartículas, como vehículos de posibles fármacos, en las condiciones establecidas por otros autores como no citotóxicas, tienen un efecto de inducción sobre las proteínas de la respuesta de estrés térmico.

Repetir los hallazgos en función del conocimiento reportado es clave para continuar estudiando los posibles efectos de estas nanopartículas, en relación a su comportamiento en el contexto tumoral. Con ellos será posible establecer mayor cantidad de datos y evidencias que permita perfeccionar el uso de las mismas como sistemas de entrega y garantizar un efecto realmente positivo para los pacientes.

## **7. Conclusiones**

1- Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, propuestas como vehículo de drogas en terapias oncogénicas, modulan la expresión del factor HSF1 y la proteína Hsp27, células 4T1, NIH3T3 y J774.

2- La presencia de las nanopartículas en los tres tipos celulares estudiados produjo un incremento de la vía de estrés representada por un incremento nuclear de HSF1 y nuclear y citoplasmático de Hsp27.

3- En las células 4T1 (adenocarcinoma mamario murino), la presencia de HSF1 en el citoplasma, se incrementa casi al doble luego de la entrada de las nanopartículas en las células, observándose en agregados perinucleares.

4- El factor que relaciona el incremento global de Hsp27 con el incremento nuclear de HSF1 como consecuencia del tratamiento con nanopartículas, se duplicó en las células 4T1.

## **8. Perspectivas**

1- Análisis de la regulación transcripcional de HSF1 y Hsp27 por qPCR

2- Evaluar el curso temporal de HSF1, evaluando fracciones nucleares y citoplasmáticas enriquecidas por Western Blot.

3- Realizar el estudio de los estados de fosforilación de HSF1 y Hsp27.

4- Evaluar comportamiento celular con otros tipos de estrés.

5- Estudiar la activación de la vía de estrés HSF1-Hsp27 en células tumorales, luego del ingreso de nanopartículas en el interior celular, debe reevaluarse con la incorporación de drogas al vehículo.

6- El diseño de terapia dirigida así ajustado, deberá ser testeado en el modelo murino *in vivo*.

## 9. Bibliografía

- Andrisic, Luka et al. 2018. "Short Overview on Metabolomics Approach to Study Pathophysiology of Oxidative Stress in Cancer." *Redox Biology* 14(July 2017): 47–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.009>.
- Arrigo, André-Patrick. 2011. "Structure-Functions of HspB1 (Hsp27)." *Methods in Molecular Biology* 787: 105–19. [http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-295-3\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-295-3_9) (May 2, 2018).
- . 2017. "Mammalian HspB1 (Hsp27) Is a Molecular Sensor Linked to the Physiology and Environment of the Cell." *Cell Stress and Chaperones* 22(4): 517–29.
- Arrigo, André-Patrick, and Benjamin Gibert. 2014. *6 Cancers HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins*.
- Bausero, Maria A. et al. 2005. "Silencing the Hsp25 Gene Eliminates Migration Capability of the Highly Metastatic Murine 4T1 Breast Adenocarcinoma Cell." *Tumour biology* 27(1): 17–26. [http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=3&SID=V1FSPb1BRhyamVJHqP&page=1&doc=1%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1764206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=3&SID=V1FSPb1BRhyamVJHqP&page=1&doc=1%5Chttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1764206&tool=pmcentrez&rendertype=abstract).
- Benarroch, Eduardo E. 2011. "Heat Shock Proteins: Multiple Neuroprotective Functions and Implications for Neurologic Disease." *Neurology* 76(7): 660–67.
- Benndorf, Rainer et al. 1994. "Phosphorylation and Supramolecular Organization of Murine Small Heat Shock Protein HSP25 Abolish Its Actin Polymerization-Inhibiting Activity." *Journal of Biological Chemistry* 269(32): 20780–84.
- . 2018. "Small Heat Shock Protein Speciation: Novel Non-Canonical 44 KDa HspB5-Related Protein Species in Rat and Human Tissues." *Cell Stress and Chaperones*: 1–14.
- Berlanga Chiquero, Juan J. 2011. "RESPUESTA AL ESTRÉS CELULAR. IMPLICACIONES EN ENVEJECIMIENTO Y OTRAS PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA EDAD Juan José Berlanga Chiquero Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid." *Encuentros multidisciplinares* 53: 1–7.
- Bryantsev, Anton L., Maria B. Chechenova, and Eric A. Shelden. 2007. "Recruitment of Phosphorylated Small Heat Shock Protein Hsp27 to Nuclear Speckles without Stress." *Experimental Cell Research* 313(1): 195–209.
- Carpenter, Richard L. et al. 2017. "Combined Inhibition of AKT and HSF1 Suppresses Breast Cancer Stem Cells and Tumor Growth." *Oncotarget* 8(43): 73947–73963.
- Chatterjee, Suman, and Timothy F. Burns. 2017. "Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach." *International Journal of Molecular Sciences* 18(9).
- Choi, Seo-hyun et al. 2014. "MMP9 Processing of HSPB1 Regulates Tumor Progression." *PloS one* 9(1): e85509. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085509>.
- Clarke, Joseph P., and Karen M. Mearow. 2013. "Cell Stress Promotes the Association of Phosphorylated HspB1 with F-Actin." *PLoS ONE* 8(7).
- Clouser, Amanda F., and Rachel E. Klevit. 2017. "PH-Dependent Structural Modulation Is Conserved in the Human Small Heat Shock Protein HSPB1." *Cell Stress and Chaperones* 22(4): 569–75.
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. 2016. "Cáncer de Mama - El Sistema Linfático de La Mama." *Comision Honoraria de Lucha contra el Cáncer*: 1–21. <http://www.comisioncancer.org.uy>.
- Doshi, Bindi M., Lawrence E. Hightower, and Juliet Lee. 2009. "The Role of Hsp27 and Actin in the Regulation of Movement in Human Cancer Cells Responding to Heat Shock." *Cell Stress and Chaperones* 14(5): 445–57.
- . 2010. "HSPB1, Actin Filament Dynamics, and Aging Cells." In *Annals of the New York Academy of Sciences*, , 76–84.
- Ehrnsperger, Monika, Hauke Lilie, Matthias Gaestel, and Johannes Buchner. 1999. "The Dynamics

- of Hsp25 Quaternary Structure.” *The Journal of biological chemistry* 274(21): 14867–74.
- Fernández Lomónaco, Marcelo. 2012. “Utilización de Modelos Animales En Investigación Del Cáncer ARTÍCULO ESPECIAL.” *Salud Militar* 31: 55–58.
- Gaestel, Matthias et al. 1991. “The Phosphorylation Sites of the Murine Small Heat Shock Protein Hsp25\*.” *Journal of Biological Chemistry* 266(c): 14721–24.
- Garrido, Carmen et al. 1997. “HSP 27 as a Mediator of Confluence-Dependent Resistance to Cell Death Induced by Anticancer Drugs.” *Cancer Research* 57: 2661–67.
- . 1998. “Heat Shock Protein 27 Enhances the Tumorigenicity of Immunogenic Rat Colon Carcinoma Cell Clones.” *Cancer research* 58: 5495–99.
- . 1999. “HSP27 Inhibits Cytochrome C-Dependent Activation of Procaspase-9.” *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(14): 2061–70.
- . 2006. “Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties.” *Cell Cycle* 5(22): 2592–2601.
- Gökmen-polar, Yesim, and Sunil Badve. 2016. “Upregulation of HSF1 in Estrogen Receptor Positive Breast Cancer.” *Oncotarget* 7(51): 84239–45.
- Gomez-Pastor, Rocio, Eileen T. Burchfiel, and Dennis J. Thiele. 2017. “Regulation of Heat Shock Transcription Factors and Their Roles in Physiology and Disease.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm.2017.73>.
- Haslbeck, Martin, and Elizabeth Vierling. 2015. “A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis.” *Journal of Molecular Biology* 427(7): 1537–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>.
- Hattori, Yoshiyuki, Takuto Kikuchi, Kei-Ichi Ozaki, and Hiraku Onishi. 2017. “Evaluation of in Vitro and in Vivo Therapeutic Antitumor Efficacy of Transduction of Polo-like Kinase 1 and Heat Shock Transcription Factor 1 Small Interfering RNA.” *Experimental and therapeutic medicine* 14(5): 4300–4306.
- Heinrich, Jörg C. et al. 2016. “New HSP27 Inhibitors Efficiently Down-Regulate Resistance Development in Cancer Cells.” *Oncotarget* 7(42): 68156–69.
- Holen, Ingunn, Valerie Speirs, Bethny Morrissey, and Karen Blyth. 2017. “In Vivo Models in Breast Cancer Research: Progress, Challenges and Future Directions.” *Disease Models & Mechanisms* 10(4): 359–71. <http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.028274>.
- Holliday, Deborah L., and Valerie Speirs. 2011. “Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research.” *Breast cancer research: BCR* 13: 215. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3236329&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Homaei-Shandiz, Fatemeh et al. 2016. “Anti-Heat Shock Protein-27 Antibody Levels in Women with Breast Cancer: Association with Disease Complications and Two-Year Disease-Free Survival.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17(10): 4655–59.
- Hong, Cheol Am, and Yoon Sung Nam. 2014. “Functional Nanostructures for Effective Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics.” *Theranostics* 4(12): 1211–32. <http://www.thno.org/v04p1211.htm> (September 20, 2016).
- Huang, Gang et al. 2013. “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Amplifying Ros Stress to Improve Anticancer Drug Efficacy.” *Theranostics* 3(2): 116–26.
- International Agency for Research on Cancer. 2012. “Cancer Today - Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.” : [consulta: marzo 2018]. <http://globocan.iarc.fr/>.
- Ito, Akira, Hiroyuki Honda, and Takeshi Kobayashi. 2006. “Cancer Immunotherapy Based on Intracellular Hyperthermia Using Magnetite Nanoparticles: A Novel Concept of ‘Heat-Controlled Necrosis’ with Heat Shock Protein Expression.” *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 320–28.
- Ivan, Mircea, and Xin Huang. 2014. 772 Tumor Microenvironment and Cellular Stress *Tumor*

- Microenvironment and Cellular Stress*. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5915-6>.
- Joly, Anne L. et al. 2010. "Dual Role of Heat Shock Proteins as Regulators of Apoptosis and Innate Immunity." *Journal of innate immunity* 2(3): 238–47.
- Kampinga, Harm H. et al. 2009. "Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins." *Cell Stress and Chaperones* 14(1): 105–11.
- Kaur, Jasmine, and Kulbhushan Tikoo. 2013. "Evaluating Cell Specific Cytotoxicity of Differentially Charged Silver Nanoparticles." *Food and Chemical Toxicology* 51: 1–14.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006254>.
- Khalil, Ashraf A., Nihal F. Kabapy, Sahar F. Deraz, and Christopher Smith. 2011. "Heat Shock Proteins in Oncology: Diagnostic Biomarkers or Therapeutic Targets?" *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1816(2): 89–104.
- Kievit, Forrest M., and Miqin Zhang. 2011. "Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy." *Accounts of Chemical Research* 44(10): 853–62.  
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054769977&partnerID=40&md5=4caf107015be62c49843a27347cb612f>.
- Kim, You-Kyoung et al. 2015. "PK11195-Chitosan-Graft-Polyethylenimine-Modified SPION as a Mitochondria-Targeting Gene Carrier." *Journal of drug targeting* 24(5): 1–11.  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1061186X.2015.1087527>.
- Krivoruchko, Anastasia, and Kenneth B. Storey. 2010. "Forever Young: Mechanisms of Natural Anoxia Tolerance and Potential Links to Longevity." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3(3): 186–98.
- Lavoie, Josée N., Eileen Hickey, Lee A. Weber, and Jacques Landry. 1993. "Modulation of Actin Microfilament Dynamics and Fluid Phase Pinocytosis by Phosphorylation of Heat Shock Protein 27." *The Journal of biological chemistry* 268(32): 24210–14.
- Li, Yuhuan et al. 2016. "Delivery of SiRNA Using Lipid Nanoparticles Modified with Cell Penetrating Peptide." *ACS Applied Materials & Interfaces*: acsami.6b09991.  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.6b09991>.
- Lianos, Georgios D. et al. 2015. "The Role of Heat Shock Proteins in Cancer." *Cancer Letters* 360(2): 114–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.026>.
- Lindemann, Antje et al. 2014. "Biological Impact of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging of Head and Neck Cancer Cells." *International journal of nanomedicine* 9: 5025–40.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4218924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mao, Li, Anton L. Bryantsev, Maria B. Chechenova, and Eric A. Shelden. 2005. "Cloning, Characterization, and Heat Stress-Induced Redistribution of a Protein Homologous to Human Hsp27 in the Zebrafish *Danio Rerio*." *Experimental Cell Research* 306(1): 230–41.
- Matokanovic, Mirela, Karmela Barisic, Jelena Filipovic-Grcic, and Dusica Maysinger. 2013. "Hsp70 Silencing with SiRNA in Nanocarriers Enhances Cancer Cell Death Induced by the Inhibitor of Hsp90." *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 50(1): 149–58.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098713001280>.
- Mehlen, Patrick et al. 1997. "Hsp27 as a Switch between Differentiation and Apoptosis in Murine Embryonic Stem Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31657–65.
- Michaud, Sébastien, Sébastien Lavoie, Marie-Odile Guimond, and Robert M. Tanguay. 2008. "The Nuclear Localization of *Drosophila* Hsp27 Is Dependent on a Monopartite Arginine-Rich NLS and Is Uncoupled from Its Association to Nuclear Speckles." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1783(6): 1200–1210.
- Mohamed, Eslam, Yu Cao, and Paulo C. Rodriguez. 2017. "Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Tumor Growth and Anti-Tumor Immunity: A Promising Opportunity for Cancer Immunotherapy." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 66(8): 1069–78.
- Mojica Piscioti, Mary L. et al. 2014. "In Vitro and in Vivo Experiments with Iron Oxide Nanoparticles

- Functionalized with DEXTRAN or Polyethylene Glycol for Medical Applications: Magnetic Targeting.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 102(4): 860–68. <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33068>.
- Morimoto, Richard I., Paul E. Kroeger, and José J. Cotto. 1996. “The Transcriptional Regulation of Heat Shock Genes: A Plethora of Heat Shock Factors and Regulatory Conditions.” *Stress-Inducible Cellular Responses* 77(31): 139–63.
- Morimoto, Richard I., and Sandy D. Westerheide. 2010. *3 Handbook of Cell Signaling, 2/e The Heat Shock Response and the Stress of Misfolded Proteins*. Second Edi. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00268-0>.
- Murray, Ashley R. et al. 2013. “Oxidative Stress and Dermal Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles In Vitro.” *Cell Biochemistry and Biophysics* 67(2): 461–76. <http://link.springer.com/10.1007/s12013-012-9367-9>.
- Muzio, Giuliana et al. 2017. “Innovative Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles Coated with Silica and Conjugated with Linoleic Acid: Effect on Tumor Cell Growth and Viability.” *Materials Science and Engineering C* 76: 439–47.
- Mymrikov, Evgeny V., Alim S. Seit-Nebi, and Nikolai B. Gusev. 2011. “Large Potentials of Small Heat Shock Proteins.” *Physiological reviews* 91(4): 1123–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013208> (November 23, 2017).
- Nakai, Akira. 2016. “Molecular Basis of HSF Regulation.” *Nature Structural and Molecular Biology* 23(2): 93–95.
- Oddone, Natalia et al. 2016. “In Vitro and in Vivo Uptake Studies of PAMAM G4.5 Dendrimers in Breast Cancer.” *Journal of Nanobiotechnology* 14(1): 1–12.
- Okuno, Mitsuru et al. 2016. “The Clinical Significance of Phosphorylated Heat Shock Protein 27 (HSPB1) in Pancreatic Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(1): 1–8.
- Pirkkala, Lila, Päivi Nykänen, and Lea Sistonen. 2001. “Roles of the Heat Shock Transcription Factors in Regulation of the Heat Shock Response and Beyond.” *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(7): 1118–31.
- Pulaski, Beth A., and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2001. “Mouse 4T1 Breast Tumor Model.” *Current protocols in immunology* Chapter 20: Unit 20.2.
- Rajagopal, Ponni et al. 2015. “Structure of the  $\alpha$ -Crystallin Domain from the Redox-Sensitive Chaperone, HSPB1.” *Journal of Biomolecular NMR* 63(2): 223–28.
- Reddy, V. Sudhakar, Satish K. Madala, Jamma Trinath, and G. Bhanuprakash Reddy. 2017. “Extracellular Small Heat Shock Proteins : Exosomal Biogenesis and Function.” *Cell Stress and Chaperones* 23: 441–54.
- Reuter, Simone, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, and Bharat B. Aggarwal. 2010. “Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked?” *Free Radical Biology and Medicine* 49(11): 1603–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- Richter, Klaus, Martin Haslbeck, and Johannes Buchner. 2010. “The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death.” *Molecular Cell* 40(2): 253–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>.
- Riki, Toita et al. 2013. “Biological Evaluation of Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin.” *International Journal of Nanomedicine* 8: 1989–99.
- Ritossa, Ferruccio. 1962. “A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*.” *Experientia* 18(12): 571–73.
- Ritossa, Ferruccio, and Reid C. Von-Borstel. 1964. “Chromosome Puffs in *Drosophila* Induced by Ribonuclease.” *Science* 145(3631): 513–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14163779>.
- Rossin, Federica et al. 2018. “TG2 Regulates the Heat-Shock Response by the Post-Translational Modification of HSF1.” *EMBO Reports*: 1–15.
- Shakoori, Abdul Rauf et al. 1992. “Expression of Heat Shock Genes during Differentiation of Mammalian Osteoblasts and Promyelocytic Leukemia Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 48(3): 277–87.

- Silva, Adny H. et al. 2016. "Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles MPEG350- and MPEG2000-Coated: Cell Uptake and Biocompatibility Evaluation." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(4): 909–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.371>.
- Spector, Neil L. et al. 1993. "Heat Shock Protein Is a Unique Marker of Growth Arrest during Macrophage Differentiation of HL-60 Cells." *Journal of cellular physiology* 156(3): 619–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360264>.
- Strauch, Annika, and Martin Haslbeck. 2016. "The Function of Small Heat-Shock Proteins and Their Implication in Proteostasis." *Essays in biochemistry* 60(2): 163–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744332> (November 23, 2017).
- Tao, Kai, Min Fang, Joseph Alroy, and G. Gary Sahagian. 2008. "Imagable 4T1 Model for the Study of Late Stage Breast Cancer." *BMC Cancer* 8(1): 228. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-228>.
- Vergheze, Jacob, Jennifer Abrams, Yanyu Wang, and Kevin A. Morano. 2012. "Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*) as a Model System." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(2): 115–58. <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.05018-11>.
- Vidyasagar, Aparna, Nancy A. Wilson, and Arjang Djamali. 2012. "Heat Shock Protein 27 ( HSP27 ): Biomarker of Disease and Therapeutic Target." *Firogenesis & Tissue Repairs* 27: 1–7.
- Vihervaara, Anniina, and Lea Sistonen. 2014. "HSF1 at a Glance." *Journal of Cell Science* 127(2): 261–66. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.132605>.
- Wahajuddin, and Sumit Arora. 2012. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatforms as Drug Carriers." *International Journal of Nanomedicine* 7: 3445–71.
- Wettstein, Guillaume, Pierre S. Bellaye, Oliver Micheau, and Philippe Bonniaud. 2012. "Small Heat Shock Proteins and the Cytoskeleton: An Essential Interplay for Cell Integrity?" *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(10): 1680–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.024>.
- Whitehead, Kathryn A., Robert Langer, and Daniel G. Anderson. 2009. "Knocking down Barriers: Advances in SiRNA Delivery." *Nature reviews. Drug discovery* 8(2): 129–38.
- Wong, Hector R. 2005. 5 NeuroImmune Biology *Endogenous Cytoprotective Mechanisms*. Elsevier Masson SAS. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-7443\(05\)80008-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-7443(05)80008-0).
- Wu, Jianming et al. 2017. "Heat Shock Proteins and Cancer." *Trends in Pharmacological Sciences* 38(3): 226–56.
- Wu, Shu-yue et al. 2017. "HSF1 : A Potential Target for Therapeutic Intervention in Cancer." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 10(3): 5637–48.
- Yasuda, Kazuyo et al. 2017. "Phosphorylation of HSF1 at Serine 326 Residue Is Related to the Maintenance of Gynecologic Cancer Stem Cells through Expression of HSP27." *Oncotarget* 8(19): 31540–53. <http://www.oncotarget.com/fulltext/16361%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28415561%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5458228>.
- Zhang, Sai et al. 2015. "Heat Shock Protein 27 Promotes Cell Proliferation through Activator Protein-1 in Lung Cancer." *Oncology Letters*: 2572–76. <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2015.3073>.