ESTUDO DO PAPEL DE GALECTINA-3 NO FENÓTIPO MALIGNO DE CÉLULAS DE MELANOMA PRIMÁRIO E METASTÁTICO

PATRICIA ABRÃO POSSIK

Tese de Doutorado apresentada à Fundação Antônio Prudente para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Possik, Patricia Abrão Estudo do papel de galectina-3 no fenótipo maligno de células de melanoma primário e metastático / Patricia Abrão Possik. – São Paulo, 2008. 124p. Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia. Orientador: Luiz Fernando Lima Reis. Descritores: 1. MELANOMA. 2. GALECTINA 3. 3. INTERFERÊNCIA DE RNA. 4. NEOPLASIAS. 5. LENTIVIRUS. I find that the great thing in this world is not so much where we stand, as in what direction we are moving.

Oliver Wendell Holmes

DEDICATÓRIA

Ao meu querido pai, Renaldo Abrão Possik

O exemplo de sabedoria e humanidade mais importante da minha vida

AGRADECIMENTOS

À todas as pessoas que passaram pela minha vida durante estes quatro anos. Cada pessoa que me acrescentou um pouco de conhecimento, humano e científico. Cada pessoa que discordou e me mostrou um ponto de vista diferente. Cada um que me mostrou o lado bom das coisas, e também à quem me mostrou o lado ruim. À cada pessoa que me fez rir em momentos difíceis ou chorar de tanto rir. À todas as pessoas que contribuíram para me formar uma pessoa mais forte e capaz de se equilibrar em mundo onde o que mais falta é o equilíbrio.

Ao meu orientador Luiz Fernando Lima Reis, por ter acreditado em mim desde o início. Por me deixar envolver em um projeto que me fez encarar alegrias, frustrações, motivação, nervosismo, ansiedade e glória. E que, resumidamente, me fez ganhar auto-confiança, me formou pesquisadora e me fez sentir capaz de dar passos cada vez maiores.

Ao meu supervisor Meenhard Herlyn, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por ter facilitado minha adaptação, por ter sempre confiado em meu potencial, por ter me mostrado diferentes faces da pesquisa, por ter me dado oportunidades de aprender ciência além do meu projeto e por ter se preocupado em me formar pesquisadora.

Aos meus pais Diney e Renaldo, e as minhas irmãs Priscila, Paula, por acreditarem que eu sou "a pesquisadora de maior potencial em todo o mundo". Por não me deixarem cair em nenhum momento. Por me darem muito amor.

Às minhas queridas avós, Dilce e Chance, por estarem sempre por perto. Pelo amor, carinho e orgulho que me faz andar sempre para frente. Ao meu tio André Polito Lomar pelo incessante incentivo, entusiasmo e atenção. Detalhes que fizeram com que eu acreditasse em mim mesma e me convenceram que tudo isso vale à pena.

Ao meu tio Rafael Abrão Possik, meu sincero agradecimento pela amizade e presença nos momentos importantes de minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro com a concessão da bolsa de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela oportunidade de estágio no exterior através do Programa PDEE.

Ao Meenhard e ao Instituto Wistar, pelo auxílio financeiro concedido para a extensão da minha estadia como visitante na instituição.

À Fundação Antonio Prudente, pela estrutura e apoio na execução deste projeto e pela grande contribuição na minha formação de Doutora em Ciências.

Às secretárias do Programa de Pós Graduação Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira, pela paciência, bom humor e eficiência.

À Sueli Franscisco e à todos os funcionários da Biblioteca do Hospital A.C.Camargo, pela constante colaboração e formatação final deste trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dr. Enrique Boccardo e Dra. Mariângela Esther Alencar Marques, pela avaliação periódica e sugestões que contribuíram imensamente para a execução deste projeto.

Ao Dr. Enrique Boccardo, pela colaboração na elaboração de experimentos de reconstituição dérmica com células de melanoma que, embora não

tenham sido utilizadas neste trabalho, foram muito importantes na minha formação.

À todos do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, onde conheci amigos eternos e pesquisadores brilhantes.

Aos meus colegas e amigos do Instituto Wistar, pelo excelente ambiente de trabalho e acesso à pesquisa de extrema qualidade.

Ao pessoal do laboratório de Meenhard Herlyn, em especial À Sandy Parsons, John T Lee, Ronan MacDaid, Mizuho Fukanaga-Kalabis, Susan Zabierovski, Ling Li, Gabi Martinez, Angela Cipolla, Nikolas Haass, Keiran Smalley, Jun e Gao Zhang pela ajuda de todos os dias e por fazerem do laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

Aos meus amigos que ficaram na Filadélfia: Érica, Elisa, Isabela, Melissa, Marcio, Jana, Paulinho, Sibele, Júlia, Juliana, Rodrigo, Cláudio. Por todos os dias que eles não deixaram eu me sentir sozinha, nem deixar a bola cair.

À todos os membros e ex-membros dos laboratórios de Genômica Funcional e de Experimentação Animal da Fundação Antonio Prudente. Em especial, aos que mais me agüentaram: Luiz FL Reis, Aline Pacífico, Sarah Marques, Mariana Santos, Waleska Martins, Mariana Morato, Graziela Spilborghs, Juliana Real, Chamberlein Mendonça, Ana Helena Pagotto, Anna Coló, Nair Muto, Tatiana Munhoz, Alex Fiorini e Adriana Abalen, Bianca Barreto, Letícia Lerner, Camila Melo, Marina Baeta, Bárbara Mello, Anderson Souza e Vladmir Lima.

À Dra. Anamaria Camargo e ao Dr. Newton Verbisck, pela contribuição na metodologia de RNAi e por serem tão solícitos quando eu precisei de algo.

Ao Dr. Roger Chammas, pelas conversas e conselhos que contribuíram imensamente para o meu aprendizado em Biologia Celular e Molecular de Tumores, claro que especialmente em Galectina-3.

Aos amigos Fred e a Jamie da *Microscopy Facility*, pela alegria diária, pelo auxílio e treinamento no uso dos Microscópios e pelo incessante apoio durante a execução da maioria dos experimentos.

Ao Carlinhos Nascimento e à Sueli Nogogaki, pela realização de análises imunoistoquímicas de excelente qualidade.

Aos amigos Nair Muto e Vladmir Lima, pelas sugestões fornecidas durante a composição desta tese.

À Juliana Real, pela companhia e auxílio na impressão final da tese, após um dia de muitas emoções.

RESUMO

Possik PA. Estudo do papel de galectina-3 no fenótipo maligno de células de melanoma primário e metastático. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Galectina-3 (Gal-3) é uma proteína com atividades pleiotrópicas expressa em uma grande variedade de células e tecidos. Suas diversas atividades variam de acordo com o compartimento celular em que esta é encontrada. Estudos recentes demonstram que a expressão e distribuição intracelular de Gal-3 em melanoma está correlacionada com a progressão tumoral. Desta forma, o efeito do silenciamento de Gal-3, obtido através da técnica de shRNA mediado por lentivírus, foi estudado em células de melanoma de diferentes fases de progressão tumoral. Células de melanoma de crescimento vertical (WM793) deficientes para Gal-3 (shGal-3) apresentaram alteração da morfologia, menor habilidade de crescimento independente de ancoragem (soft agar) e capacidade reduzida de invasão em matriz de colágeno. Finalmente, o crescimento de tumores gerados pela injeção subcutânea de WM793 shGal-3 em camundongos NOD/SCID é drasticamente afetado. Interessantemente, não foram observadas alterações fenotípicas nas células metastáticas 1205Lu shGal-3. O silenciamento de Gal-3 nas células WM793 é acompanhado da diminuição da ativação de AKT e o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas. Concomitantemente, é observado o aumento da expressão de p16 e hipofosforilação de Rb. Análises por microscopia confocal demonstram que silenciamento de Gal-3 diminui a presença de β -catenina nuclear. Entretanto, em melanócitos e células de crescimento radial, a ausência de Gal-3 nuclear não impede a distribuição nuclear de β-catenina. Os dados apresentados aqui indicam que Gal-3 possui um papel crucial em melanomas de crescimento vertical. O silenciamento de Gal-3 não parece ser suficiente

para afetar melanomas metastáticos, que possivelmente adquirem estratégias complementares de sobrevivência para o escape de mecanismos supressores de tumor.

SUMMARY

Possik PA. [Galectin-3 supports the malignant phenotype of vertical growth phase melanomas]. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Galectin-3 (Gal-3) is a pleiotropic protein expressed in a variety of tissues. It has diverse activities that are contingent upon its subcellular localization. Previous studies have demonstrated that Gal-3 expression and subcellular distribution is correlated to melanoma progression. Here, the effects of Gal-3 depletion were investigated in melanoma cells derived from different stages of tumor progression using lentiviral shRNA. Gal-3-deficient (shGal-3) vertical growth phase (WM793) melanoma cells displayed altered cell morphology, impaired growth in soft agar, as well as reduced invasiveness. Tumor growth in NOD/SCID mice injected subcutaneously with WM793 shGal-3 was dramatically affected. Interestingly, shGal-3 caused no phenotypic changes in metastatic melanoma cells. Impaired AKT activation and upregulation of pro-apoptotic proteins were detected, as well as upregulation of p16 and hipophosphorilation of Rb. Immunofluorescence analyses demonstrated that Gal-3 and β -catenin co-localize, and that Gal-3 knockdown caused decreased nuclear β -catenin localization. However the absence of nuclear Gal-3 in melanocytes and RGP melanoma cells do not affect nuclear βcatenin distribution. Together, these data demonstrate that Gal-3 has a crucial role in VGP melanoma. Furthermore, Gal-3 depletion is not sufficient to affect metastatic cells, which likely develop complementary survival strategies to escape tumor suppressive mechanisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo da pele	3
Figura 2	Números de casos estimados para cada tipos de câncer em 2008 na população brasileira	5
Figura 3	Principais alterações na transformação de melanócitos	8
Figura 4	Desenho esquemático do modelo de progressão do melanoma proposto por Clark	13
Figura 5	Esquema simplificado da estrutura primária da proteína Galectina-3	15
Figura 6	Implicações de Galectina-3 em vias que levam a morte celular por apoptose	18
Figura 7	Participação de Galectina-3 na Via Wnt/b-catenina	20
Figura 8	Mecanismo de Silenciamento por RNA de interferência	28
Figura 9	Análise do perfil de expressão gênica pela técnica de <i>Microarray</i>	30
Figura 10	Análise da expressão de Galectina-3 pela técnica de <i>Tissue</i> <i>Microarray</i>	32
Figura 11	Dados brutos da expressão de Gal-3 em linhagens de melanoma	52
Figura 12	Análise da expressão de Gal-3 em linhagens de melanoma	53
Figura 13	Inibição da expressão de Galectina-3 em células de melanoma	55

Figura 14	Morfologia de células de melanoma silenciadas para Gal-3	57
Figura 15	Análise da proliferação celular pelo método de MTT	58
Figura 16	Ensaio de Crescimento independente de ancoragem de células WM793 e 1205Lu	59
Figura 17	Ensaio de Crescimento independente de ancoragem de células WM983A e WM983B	60
Figura 18	Ensaio de Migração Celular com as células WM793 shGal-3 e WM793 pLKO.1	62
Figura 19	Ensaio de Migração Celular com as células 1205Lu shGal-3 e 1205Lu pLKO.1	63
Figura 20	Quantificação da migração de células silenciadas para Gal-3 e controle	64
Figura 21	Ensaios de invasão tumoral	65
Figura 22	Diferença no potencial de invasão das células controles e as silenciadas para Gal-3	66
Figura 22 Figura 23	Diferença no potencial de invasão das células controles e as silenciadas para Gal-3 Crescimento Tumoral das linhagens WM793 e 1205Lu silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID	66 67
Figura 22 Figura 23 Figura 24	Diferença no potencial de invasão das células controles e as silenciadas para Gal-3 Crescimento Tumoral das linhagens WM793 e 1205Lu silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID Crescimento Tumoral de linhagens WM983A e WM983B silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID	66 67 68
Figura 22 Figura 23 Figura 24 Figura 25	Diferença no potencial de invasão das células controles e as silenciadas para Gal-3 Crescimento Tumoral das linhagens WM793 e 1205Lu silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID Crescimento Tumoral de linhagens WM983A e WM983B silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID Análise da expressão de proteínas relacionadas à p53 e ao mecanismo de apoptose em células silenciadas para Galectina-3	66 67 68 70

Figura 27	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em melanócitos	74
Figura 28	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de WM35	75
Figura 29	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células WM793	76
Figura 30	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células WM278 e WM983	77
Figura 31	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de 1205Lu	78
Figura 32	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células WM1617 e WM983B	79
Figura 33	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de melanoma WM793 shGal-3	80
Figura 34	Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de melanoma 1205Lu shGal-3	81
Figura 35	Análise da expressão de componentes da via Wnt/ catenina em células silenciadas para Gal-3	82
Figura 36	Regulação do Ciclo Celular	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Células	melanocíticas	separadas	em	melanócitos	е	
	melanom	as de diferentes	fases de des	senvol	vimento	、	36
Quadro 2	Lista de fabricante	anticorpos primes	arios utilizad	os e	seus respectiv	'OS 4	48
Quadro 3	Descrição TP53, Cl	o das mutaçõe DK4 e PTEN em	s dos genes linhagens de	BRA melai	<i>F</i> , <i>NRAS</i> , <i>M</i> Y noma	′C,	98

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Sigla	Definição Inglês	Definição Português
254CF	254 Calcium Free	254 Livre de Cálcio
	Apoptotic Protease Activating	Fator Ativador de Protease
APAF-1	Factor 1	Apoptotica
ARF	Alternative Reading Frame	Fase Alternativa de Leitura
BAD	Bcl-2 Antagonist of Cell Death	Antagonista de Bcl-2 Pró-morte Celular
BAX	Bcl-2 Associated X Protein	Proteína X Associada a Bcl-2
Bcl-2	B cell CLL/Limphoma 2	Célula B CLL/Linfoma 2
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
DIM	Bcl-2 Interacting Mediator of	Mediador de Morte Celular que
BIN	Cell Death	interage com Bcl-2
	Nucleatide Desis Less	Ferramenta de Busca de
BLASTn	Alignment Search Tool	Alinhamento Local Básico de
		Nucleotídeos
BrDu	BromodeoxyuridinE	Bromodioxiuridina
BSA	Bovine Serum Albumin	Albumina de Soro Bovino
сАМР	cyclic Adenosine monophosphate	Adenosina Monofosfato Cíclico)
FTG6	Cyclin D1	Ciclina D1
CDK2	Cyclin-dependent Kinase 2	Ciclina dependente de Quinases 2
CDK4	Cyclin-dependent Kinase 4	Ciclina dependente de Quinases 4
CDKN2A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A	Inibidor de Ciclinas dependente de Quinases 2A
cDNA CEP	complementary DNA	DNA complementar Comitê de Ética em Pesquisa

CCU	Comparative Genome	Hibridização Genômica
СОП	Hybridization	Comparativa
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	Leucemia Linfocítica Crônica
	Carbohydrate Recognition	Domínio de Reconhecimento de
CRD	Domain	Carboidratos
CRE	cAMP responsible element	Elemento Responsivo a cAMP
	Death-Inducing Signaling	Complexo Sinalizador Induzido
DISC	Complex	por Morte
	Dulbelcco's Modified Eagle's	Meio de Eagle Modificado por
	Medium	Dulbelcco
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Dimetil Sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Ácido Desoxirribonucléico
ECM	Extracellular Matrix	Matriz Extracelular
	Ethylanadiamina tatragootia agid	Ácido Etilenodiamino-tetra-
EDIA	Ethylenediamine-tetraacetic acid	acético
	Eagle's Minimum Essencial	Maia Mínima Essanaial da Esala
	Medium	Melo Minimo Essencial de Eagle
ENV	Envelope	Envelope
ET-3	Endothelin 3	Endotelina 3
EACS	Fluorescence-activated Cell	Separação de Células ativada por
1 400	Sorting	Fluorescência
FBS	Fetal Bovine Serum	Soro Fetal Bovino
FF	Foreskin Fibroblasts	Fibroblastos de prepúcio
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2	Fator de Crescimento de
1012		Fibroblastos 2
FM		Faculdade de Medicina
FMRP		Faculdade de Medicina de
		Ribeirão Preto
GAG	Group-specific Antigen	Antígeno Grupo-especifico
Gal-3	Galectin-3	Galectina-3
GFP	Green Fluorescent Protein	Proteína Verde Fluorescente
GSK38	Glycogen Synthase Kinase 3 R	Quinase 3 β da Sintase do
Conop		Glicogênio
		Ū

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	Solução Salina Balanceada de
		Hank
HDM2	Human Double Minute 2	Doublé Minute 2 Humano
HEPES	Hydroxiethyl Piperazine	Hidroxietil Piperazina Acido
	Ethanesulfonic Acid	Etanosulfônico
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Fator de Crescimento de
_		Hepatócitos
HIPK2	Homeodomain Interacting	Proteína Quinase 2 que interage
	Protein Kinase 2	com Homeodomínio
HIV-1	Human Immunodeficiency Vírus	Vírus da Imunodeficiência
	1	Humana
	Institutional Animal Care and	Comitê Institucional de Cuidado e
IACUC	Use Committee	Uso Animal
INCA		Instituto Nacional de Câncer
L15	Leibovitz 15	
LB	Luria Bertani	
MDM2	Mouse Double Minute 2	Double Minute 2 Murino
MMP2	Metaloprotease 2	Metaloprotease 2
MMP9	Metaloprotease 9	Metaloprotease 9
мтт	Dimethylthiazol	Brometo de Dimetiltiazol
	Diphenyltetrazolium Bromide	Dipeniltetrazolium
	Non Obaca Diabatia/Source	Diabético Não
	Combined Immuned afficient	Obeso/Imunodeficiente Severo
SCID	Combined immunodencient	Combinado
		Domínio Anti-morte -
NWGR	Anti-Death Domain	Asparagina,Triptofano,Glicina,
		Arginina
OMS		Organização Mundial da Saúde
550		Solução Salina Tamponada com
PBS	Phosphate Buffered Saline	Fosfato
DON :	Proliferating Cell Nuclear	Antígeno Nuclear de Células
PCNA	Antigen	Proiferativas
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Quinase 3 Fosfoinosinositídeo

РКВ	Protein Kinase B	Proteína Quinase B
PMSF	Phenylmethanesulphonylfluoride	Fenilmetilsulfonilflúor
POL	Polymerase	Polimerase
DTEN	Phosphatase and Tensin	Homólogo de Fosfatase e
PIEN	homolog	Tensina
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	Fluoreto de Polivinilideno
Rb	Retinoblastoma	Retinoblastoma
RGP	Radial Growth Phase	Fase de Crescimento Radial
RNA	Ribonucleic Acid	Acido Ribonucléico
RNAi	RNA interference	RNA de interferência
RNAm		RNA mensageiro
RPM	Rotations per minute	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	
SCF	Stem Cell Factor	Fator de Células Tronco
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate –	Sulfato Dodecil de Sódio-
	Polyacrilamide Gel	Eletroforese de Gel de
FAGE	Eletrophoresis	Poliacrilamida
shRNA	short hairpin RNA	RNA em grampo curto
siRNA	small interfering RNA	RNA pequeno de interferência
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Polimorfismo de Nucleotídeo
0.04		
SP1	Specificity Protein 1	Proteina Especifica 1
TBS-T	Tris-buffered saline with tween	Solução Salina Tamponada por
		Tris com Tween
	T Cell Specific Factor – 4	Fator Especifico de Celulas 1 – 4
INF	Tumor Necrosis Factor	
TRAIL	INF-related apoptosis inducing	
T 00/	ligand	
Tu0%	Tumor 0%	Tumor 0%
102%	Tumor 2%	Tumor 2%
USP		Universidade de Sao Paulo
UVB	Ultraviolet B	
VGP	Vertical Growth Phase	⊢ase de Crescimento Vertical

WM Wistar Melanoma Collection

Wnt Wingless

Coleção de Melanoma do Wistar Sem asas

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A estrutura geral da pele	1
1.2	Epidemiologia do melanoma	3
1.3	Principais alterações genéticas em melanoma	5
1.4	O microambiente e o desenvolvimento do melanoma	8
1.5	A progressão do melanoma	11
1.6	Galectina-3	13
1.6.1	Estrutura	14
1.6.2	Galectina-3 citoplasmática	15
1.6.3	Galectina-3 nuclear	18
1.6.4	Galectina-3 extracelular	20
1.7	Galectina-3 na progressão tumoral	22
1.8	Galectina-3 em melanoma	23
1.9	RNA de interferência e vetores lentivirais	25
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	34
3 3.1	OBJETIVOS Objetivo Geral	34 34
3 3.1 3.2	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos	34 34 34
3 3.1 3.2 4	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS	34 34 34 35
3 3.1 3.2 4 4.1	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos	34 34 34 35 35
3 3.1 3.2 4 4.1 4.1.1	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos Cultura de células de melanoma	34 34 34 35 35 35
 3 3.1 3.2 4 4.1 4.1.1 4.1.2 	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos Cultura de células de melanoma Isolamento e cultura dos demais tipos celulares	34 34 34 35 35 35 35
 3 3.1 3.2 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos Cultura de células de melanoma Isolamento e cultura dos demais tipos celulares RNA de interferência	34 34 35 35 35 36 38
 3 3.1 3.2 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos Cultura de células de melanoma Isolamento e cultura dos demais tipos celulares RNA de interferência Análise das seqüências de shRNA	34 34 34 35 35 35 36 38 38
 3 3.1 3.2 4 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.2.1 4.2.2 	OBJETIVOS Objetivo Geral Objetivos Específicos MATERIAIS E MÉTODOS Cultura de células e ensaios biológicos Cultura de células de melanoma Isolamento e cultura dos demais tipos celulares RNA de interferência Análise das seqüências de shRNA Produção das partículas lentivirais	34 34 34 35 35 35 36 38 38 38 39

4.3	Ensaios Funcionais	41
4.3.1	Análise de Proliferação Celular (MTT)	41
4.3.2	Ensaio de Crescimento Independente de ancoragem	42
4.3.3	Ensaio de Migração Celular por Cicatrização	43
4.3.4	Ensaio de Invasão Tumoral	44
4.3.5	Análise de Tumorigenicidade em camundongos imunodeficientes	45
4.4	Análises Bioquímicas	46
4.4.1	Western Blotting	46
4.4.2	Imunofluorescência	48
4.5	Microscopia	49
4.6	Estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Expressão de Galectina-3 em linhagens de melanoma	51
5.2	Silenciamento de Galectina-3 em linhagens de melanoma primário	C
	e metastático	54
5.3	Análise das linhagens silenciadas para Galectina-3	56
5.3.1	Morfologia Celular	56
5.3.2	Proliferação Celular	58
5.3.3	Crescimento Independente de ancoragem	59
5.3.4	Migração Celular	60
5.3.5	Invasão Tumoral	64
5.3.6	Crescimento Tumoral em camundongos imunodeficientes	66
5.4	Elucidação de mecanismos regulados pela presença ou ausência	
	de Galectina-3	68
5.4.1	Proteínas ligadas à p53 e aos mecanismos de apoptose	68
5.4.2	Proteínas da via de p16/Rb	70
5.4.3	Proteínas da via de Wnt/β–catenina	72
6	DISCUSSÃO	83
6.1	A expressão de Galectina-3 em melanoma	83

6.2	O efeito da inibição da expressão de Galectina-3 no fenótipo	
	de células de melanoma	86
6.2.1	Morfologia Celular	89
6.2.2	Proliferação Celular	90
6.2.3	Crescimento Independente de ancoragem	91
6.2.4	Migração Celular	92
6.2.5	Invasão Tumoral	94
6.2.6	Crescimento Tumoral em camundongos imunodeficientes	95
6.3	Indícios de mecanismos possivelmente implicados no fenótipo	
	observado	97
6.3.1	Alterações de p53 e proteínas relacionadas à apoptose	98
6.3.2	Alterações da via de p16/Rb	104
6.3.3	Alterações da via de Wnt/β–catenina	108
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
8	CONCLUSÕES	115
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

ANEXO

Anexo 1 *"Transforming the melanocyte – More than just MAPK"*. Minirevisão publicada

1 INTRODUÇÃO

1.1 A ESTRUTURA GERAL DA PELE

A pele é o órgão mais externo do corpo humano, sendo geralmente representada em camadas (Figura 1A). A primeira delas, a epiderme, é formada por um epitélio escamoso, estratificado e em contínua renovação, composta principalmente por queratinócitos, melanócitos e células de Langherans. Os queratinócitos representam aproximadamente 80% das células da epiderme e se apresentam em progressiva diferenciação controlada por eventos extrínsecos (do microambiente) e intrínsecos (genéticos e sistêmicos). Esta diferenciação é ilustrada pela organização destas células em camadas nomeadas de acordo com a posição e propriedades estruturais das células (basal, espinhosa, granulosa e córnea) (CHU et al. 2003).

Os melanócitos são células produtoras de melanina que se limitam especialmente à camada basal da epiderme. Através de seus prolongamentos, estas células se comunicam com os gueratinócitos, e esta interação é essencial para a sua diferenciação e função (Figura 1B). Em condições fisiológicas normais, melanócitos e queratinócitos formam a "Unidade Epidérmica de Melanina". Estas células se alinham na zona da membrana basal na razão 1 melanócito para cada 5 à 8 queratinócitos. Cada aproximadamente melanócitos melanossomos transporta para 35

queratinócitos das camadas superiores da epiderme através de seus prolongamentos. Conseqüentemente ocorre a pigmentação da camada basal e das camadas mais superficiais da pele, principal responsável pela proteção aos danos de radiação, incluindo o desenvolvimento de tumores como o melanoma (CHU et al. 2003). O controle dos queratinócitos sobre proliferação, número de prolongamentos e expressão de moléculas de superfície do melanócito evidencia que esta organização serve como base estrutural para a regulação intercelular (LI e HERLYN 2000).

A Junção Dermo-epidérmica é uma zona de membrana basal que comunica a derme e a epiderme. Ela serve de suporte para a epiderme, determina a polaridade de estratificação, direciona a organização do citoesqueleto nas células basais, disponibiliza sinais de desenvolvimento e ainda serve como uma barreira semipermeável. Sua estrutura é formada quase que totalmente por fatores secretados pelos queratinócitos basais, com uma pequena contribuição dos fibroblastos presentes na derme (CHU et al. 2003).

A derme é um sistema integrado de tecido conectivo fibroso e filamentoso, que acomoda tecidos nervoso e vascular, apêndices epidérmicos, fibroblastos, macrófagos, mastócitos e outras células sanguíneas, incluindo linfócitos, em resposta a certos estímulos. Ela é organizada nas regiões papilar e reticular e a matriz do tecido dérmico é formada principalmente de colágeno e elastina (CHU et al. 2003). Dentre as células da derme destacam-se os fibroblastos, que são células mesenquimais responsáveis pela síntese e degradação das proteínas da

2

matriz do tecido conectivo fibroso e não fibroso e de fatores solúveis, além de estarem envolvidos com o controle da proliferação dos melanócitos (CORNIL et al. 1991).



Legenda: A) Detalhe das três camadas que compõem a pele: epiderme, derme e hipoderme. B) Localização dos melanócitos na camada basal da epiderme. A comunicação destes com os queratinócitos é representada pela transferência da melanina, pigmento que dá cor a pele.

Fonte: Adaptação de *Medline Plus, Medical Encyclopedia, Melanin* (2008). Figura 1 - Esquema ilustrativo da pele.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO MELANOMA

O desenvolvimento do melanoma cutâneo é resultante da transformação maligna de melanócitos e, como na maioria dos cânceres, a predisposição genética e exposição à certas condições ambientais são fatores de risco. O fator ambiental clássico relacionado ao risco de

melanoma é a exposição à luz solar (MOAN et al. 1999). História de queratose solar e câncer de pele não-melanoma também são fatores de risco importantes. Dentre os fatores de predisposição, além de história familial, destaca-se a côr da pele. Acredita-se que pessoas com pele mais clara sejam mais susceptíveis aos danos solares. A presença de um grande número de nevos atípicos ou comumente adquiridos representa outro fator importante (MARKS 2000).

A incidência de melanoma cutâneo tem apresentado crescimento constante durante várias décadas. Enquanto que em 1935, o risco de desenvolvimento de melanoma nos Estados Unidos era de 1 em cada 1500 habitantes, em 2007 ocorreu 1 caso de melanoma invasivo para cada 63 habitantes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), melanoma é a malignidade que está aumentando mais rapidamente em todo o mundo (RIGEL 2008). A estimativa para 2008 nos Estados Unidos é de aproximadamente 62.480 novos casos e 8.420 mortes relacionadas à este tumor. Estes dados excluem melanoma *in situ*, que, de acordo com estas estatísticas, será responsável por 54.020 casos (JEMAL et al. 2008). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima para 2008 o número de aproximadamente 3.000 novos casos em homens e 3.000 em mulheres. Embora, quando comparado a outros tipos de tumores, estes números sejam baixos, a letalidade é elevada (Ministério da Saúde 2007).

A detecção precoce, contudo, tem aumentado a sobrevida dos pacientes com este tipo de câncer. Nos países desenvolvidos, a sobrevida

4

média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média é de 56% (Ministério da Saúde 2007).



Fonte: Adaptação de *Ministério da Saúde/Instituto Nancional do Câncer-INCA 2007.* **Figura 2** – Números de casos estimados para cada tipos de câncer em 2008 na população brasileira.

1.3 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM MELANOMA

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor são fatores clássicos no desenvolvimento e progressão tumoral. Em outras palavras, estas alterações genéticas conferem vantagens de sobrevivência e proliferação às células e ainda permitem que estas ignorem mecanismos de diferenciação celular. O fenótipo maligno contribui, por exemplo, para a proliferação descontrolada na ausência de fatores de crescimento e de ancoragem à um substrato. Estas células são também capazes de quebrar a homeostase tecidual, escapar do controle de fatores estromais e finalmente formar tumores.

Fatores genéticos e epigenéticos contribuem juntos para a transformação maligna das células. Mutações somáticas e adquiridas, incluindo deleções, amplificações e translocações, já foram descritas em lesões melanocíticas malignas e pré-malignas.

O papel da via de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) foi bem estabelecido na literatura há mais de três décadas. DAVIES et al. (2002) demonstraram a presença de mutações no gene *BRAF* em dois terços dos melanomas. Mutações em *NRAS* ocorrem em aproximadamente 15% dos melanomas (POLLOCK et al. 2003), enquanto *KIT* (mais conhecido por *c-Kit*), um receptor tirosina quinase também capaz de ativar a mesma via, aparece mutado em cerca de 4% (CURTIN et al. 2005). Interessantemente, estas mutações raramente se sobrepõem. Nos poucos casos em que a via de MAPK não se encontra ativada em melanoma pelas mutações em *RAF* e *RAS*, mutações em *CCND1* (gene que codifica a proteína Ciclina D1) ou *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) podem ser encontradas (MUTHUSAMY et al. 2006). Em adição, o lócus *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), que abriga dois importantes genes supressores de tumor conhecidos por *p16* ou *INK4a* e *p14* ou *ARF*, é também perdido em aproximadamente 50% dos melanomas (CURTIN et al. 2006).

Embora comum em muitos outros tumores, o melanoma raramente apresenta mutações em *TP53* (também conhecido como *p53*). Neste caso, é possível que *ARF* seja pelo menos em parte responsável pela perda da

função da proteína p53. Quando expressa, ARF inibe a atividade da ubiquitina ligase HDM2 (em camundongos, conhecida por MDM2) que, consequentemente, não consegue direcionar p53 para a degradação via proteossoma. De fato, a superexpressão de HDM2 já foi relatada em melanomas (MUTHUSAMY et al. 2006; POLSKY et al. 2001). Finalmente, mutações em *BRAF* aparecem geralmente acompanhadas da perda de *PTEN* e uma pequena proporção de melanomas possui amplificações em *MYC* (também conhecido como *c-Myc*) (KRAEHN et al. 2001).

Assim, fica clara a implicação da via de MAPK no desenvolvimento e progressão do melanoma, embora outras vias possam exercer papéis auxiliares no desenvolvimento da doença. A figura 3 ilustra um resumo dos principais genes envolvidos na transformação de melanócitos em células de melanoma.



Legenda: Melanócitos normais adquirem mutações que provocam um aumento transiente na proliferação celular seguido da entrada em um estado de senescência (nevo). Não se sabe se todos os melanócitos entram em senescência ou se alguns adquirem novas anormalidades genéticas (mutações pontuais/deleções/amplificações) que permitem o escape da senescência induzida por oncogenes (OIS). Em ambos os exemplos, a aquisição de anomalias genéticas parece transformar células benignas em melanomas malignos. **Figura 3** - Principais alterações na transformação de melanócitos.

Mais detalhes sobre este tema podem se encontrados em "*Transforming the Melanocyte, more than just MAPK*" ("Transformando o melanócito, mais do que apenas MAPK") revisão escrita por Patrícia Possik, em colaboração com John Lee e Meenhard Herlyn (POSSIK et al. 2008) (Anexo I).

1.4 O MICROAMBIENTE E O DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA

O controle do comportamento celular e a manutenção estrutural do tecido dependem da homeostase tecidual. Esta, por sua vez, é controlada via fatores solúveis como hormônios, fatores de crescimento e citocinas (comunicação extracelular), via mensageiros secundários e redes de transdução de sinal (comunicação intracelular) e via adesão célula–célula e

célula-matriz (comunicação intercelular) (LI e HERLYN 2000). No caso do tecido cutâneo, a homeostase é mantida especialmente por interações entre melanócitos, queratinócitos e fibroblastos, e destes com a matriz extracelular. Assim, durante a transformação dos melanócitos em células de melanoma, as interações com o microambiente são desreguladas.

Alguns fatores secretados por queratinócitos atuam na regulação da proliferação dos melanócitos como, por exemplo, bFGF (também conhecido por FGF2) (*basic Fibroblast Growth Factor, Fibroblast Growth Factor 2*) e endotelinas. Fibroblastos, por sua vez, são responsáveis pela produção de bFGF, SCF (*Stem Cell Factor*) e HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) (IMOKAWA et al. 1992). O Fator de Crescimento bFGF demonstra ser o mais importante fator de crescimento em melanomas desde a descoberta como um fator de crescimento natural para os melanócitos. Em modelos de reconstituição dérmica, células de melanomas primários necessitam da ativação do gene *FGF2* para sua sobrevivência, proliferação e invasão dérmica (MEIER et al. 2000).

Em excesso, alguns destes fatores podem ter o efeito oposto. A superexpressão de *EDN3*, *KITLG* e *FGF2*, que codificam respectivamente, os fatores de crescimento ET-3 (endotelina 3), SCF e bFGF, pode contribuir para o debalanço com o microambiente. Foi demonstrado que a introdução de adenovírus carregando estes genes em pele humana transplantada no dorso de camundongos imunodeficientes, em combinação com à luz ultravioleta, pode levar à um fenótipo alterado dos melanócitos presentes na

9

epiderme e contribuir para a transformação maligna (BERKING et al. 2001; BERKING et al. 2004).

O controle dos queratinócitos sobre os melanócitos é interrompido com a perda da comunicação e adesão intercelular após a transformação de células normais em nevos ou melanomas. Melanócitos isolados em cultura, por exemplo, expressam moléculas de superfície que não são normalmente expressas, a não ser em células de melanoma (VALYI-NAGY et al. 1993). Entretanto, quando em contato com queratinócitos normais, estes melanócitos desenvolvem múltiplos prolongamentos que atingem os queratinócitos, as moléculas de superfície características de melanoma desaparecem em alguns dias e seu crescimento e número celular é novamente controlado (VALYI-NAGY et al. 1993). Foi também demonstrado que o contato entre melanócitos e queratinócitos controla a proliferação dos queratinócitos (DEVECI et al. 2001).

Dentre as moléculas de adesão célula-célula mais importantes na pele destacam-se as E-Caderinas, componentes importantes de junções aderentes, participando assim da adesão entre queratinócitos e melanócitos. A perda deste mecanismo de adesão pode levar a proliferação contínua e formação de nevos (SATYAMOORTHY et al. 2000).

Células névicas e células de melanoma não expressam E-caderina, mas sim N-Caderina, o que diminui a sua adesão aos queratinócitos (TANG et al. 1994). Além do mais, a expressão de N-Caderina leva a formação de junções aderentes destas células com fibroblastos e células endoteliais (HSU et al. 2000), o que pode ter implicações funcionais muito importantes para o desenvolvimento e progressão do melanoma.

Recentemente, HEDLEY et al. (2002) sugeriram que, em um modelo de reconstituição dérmica, a pigmentação dos melanócitos também pode ocorrer em resposta a ausência da membrana basal e remoção de fibroblastos, o que indica que os fibroblastos possuem um papel importante auxiliando os melanócitos à lidar com estresse. Fibroblastos presentes na derme também podem controlar negativamente o desenvolvimento de lesões benignas e este poder inibitório é revertido em estímulo de crescimento para células malignas (CORNIL et al. 1991).

Desta forma, o melanoma tem sido estudado não mais exclusivamente como uma alteração dos melanócitos, mas como resultado da perda da homeostase cutânea.

1.5 A PROGRESSÃO DO MELANOMA

Baseado em características histopatológicas e clínicas, foi proposto um modelo de desenvolvimento e progressão dos melanomas, composto por 5 etapas (CLARK et al. 1984), sendo elas:

- (0) Melanócitos precursores;
- Nevos comuns, adquiridos ou congênitos, com melanócitos estruturalmente normais e sem anormalidades citogenéticas ou alterações no período de vida;

- (2) Nevos displásicos, com atipía estrutural e arquitetural, possivelmente precursores de melanomas e assim com densidade correlacionada ao risco de desenvolvimento do tumor;
- (3) Fase de crescimento radial (RGP), com células de melanoma primário na epiderme e sem capacidade de metastatização;
- (4) Fase de crescimento vertical (VGP), com células de melanomas primários invadindo a derme e com capacidade de metastatização;
- (5) Melanoma metastático.

De acordo com este modelo (Figura 4), a progressão do melanoma seria linear, passando por vários estágios desde a formação do nevo até o desenvolvimento de lesões mais invasivas e metastáticas. Entretanto, dados mostram que nem sempre a presença do melanoma está associada a um nevo pré-existente. Enquanto MARKS et al. (1990) demonstraram que aproximadamente 20% dos melanomas evoluem a partir de nevos, outro estudo observou que pelo menos 51% dos melanomas apresentavam-se associados à algum tipo de nevo (SKENDER-KALNENAS et al. 1995)

Assim, embora a presença de nevos seja um fator de risco importante em melanoma, isto nem sempre significa que estas sejam lesões precursoras. Mesmo assim, a classificação proposta por Clark é muito utilizada por propôr cinco grupos de melanomas com diferenças estruturais comumente diagnosticadas em pacientes.



Legenda: Melanócitos, que em condições normais se distribuem na camada basal da epiderme, acumulariam alterações que levariam à formação de nevos. Células de melanoma de crescimento vertical surgiriam a partir destes nevos. O acúmulo de alterações genéticas adicionais e a influência de fatores do microambiente favoreceriam o desenvolvimento de células de crescimento vertical (VGP) que neste estágio já possuem a habilidade de formar metástases.

Fonte: Adaptação do website de Meenhard Herlyn

Figura 4 - Desenho esquemático do modelo de progressão do melanoma proposto por Clark.

1.6 GALECTINA-3

Galectinas são lectinas que apresentam afinidade de ligação a βgalactosídeos. Já foram identificados 14 membros da família das Galectinas, caracterizadas por possuírem uma seqüência de aminoácidos evolutivamente conservada.

Dentre estas destaca-se Galectina-3 (aqui muitas vezes referida por Gal-3), uma proteína de 35kDa, com atividades pleiotrópicas, cujo papel não se resume a ligação à carboidratos. Alguns mecanismos, ainda não totalmente elucidados, permitem que a proteína Gal-3 transite entre o núcleo e o citoplasma de uma grande variedade de células (HONJO et al. 2001; NAKAHARA et al. 2006; NAKAHARA e RAZ 2006). Embora esta localização
varie entre diferentes linhagens celulares e tipos de tumores, o papel biológico de Gal-3 é definido de acordo com sua localização subcelular.

1.6.1 Estrutura

A família das Galectinas é caracterizada principalmente pela presença de um domínio de ligação e reconhecimento de carboidratos denominado CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) (DUMIC et al. 2006). Além do domínio CRD, Gal-3 possui um domínio amino-terminal rico em glicina e prolina denominado Domínio Similar ao Colágeno (*collagen-like*) por possuir 33.5% de identidade com a cadeia II do Colágeno α1 da cartilagem bovina. A extremidade amino-terminal desta proteína também possui um sítio de fosforilação responsável especialmente pela localização subcelular de Gal-3 e por algumas de suas funções (Figura 5).

O domínio CRD é principalmente responsável pela atividade de lectina de Galectina-3, mas também está envolvido em outras funções, como nas interações homofílicas dependentes de carboidratos. Dentro deste domínio, encontra-se um motivo altamente conservado nas proteínas da família Bcl-2 (*B cell CLL/Limphoma 2*). Este motivo, denominado NWGR (composto pelos aminoácidos Asparagina, Triptofano, Glicina, Arginina), é responsável pela atividade anti-apoptótica de Gal-3.



Legenda: Gal-3 é basicamente formada por um domínio amino-terminal rico em prolina e glicina, denominado Domínio Similar ao Colágeno (amarelo). Os 12 aminoácidos na extremidade amino-terminal estão implicados na localização subcelular de Gal-3 (verde). Nesta região da proteína, encontra-se o sítio de fosforilação essencial para a translocação entre citoplasma e núcleo (serina 6). No domínio de ligação à carboidratos (azul) encontra-se o motivo NWGR (vermelho), geralmente encontrado em membros da família de Bcl-2. Figura 5 - Esquema simplificado da estrutura primária da proteína Galectina-3.

1.6.2 Galectina-3 citoplasmática

Uma das mais estudadas funções citoplasmáticas de Gal-3 é a resistência à apoptose. A participação de Galectina-3 na resistência à apoptose induzida por anti-Fas e staurosporina (YANG et al. 1996), cisplatina (AKAHANI et al. 1997), anoikis (apoptose induzida por perda de ancoragem) (KIM et al. 1999), cicloheximida/TNF (*Tumor Necrosis Factor*), irradiação UVB (Ultravioleta B) (MATARRESE et al. 2000), óxido nítrico (MOON et al. 2001) entre outros, já foram reportados.

Em resposta à diferentes estímulos, Galectina-3 transloca do citoplasma ou do núcleo para membrana mitocondrial (YU et al. 2002; VAN DEN BRULE et al. 2000) onde se envolve no controle da apoptose possivelmente através da interação com a proteína Bcl-2 (YANG et al. 1996). Esta translocação é dependente de sua interação com a proteína Sinexina (*Synexin*), cuja expressão é fundamental para a função anti-apoptótica de Galectina-3 (YU et al. 2002). Embora não seja membro da mesma família, Gal-3 apresenta propriedades estruturais semelhantes à Bcl-2 e outros

membros da mesma família, especialmente devido à presença do motivo NWGR (YANG et al. 1996; AKAHANI et al. 1997).

A interação direta com o receptor CD95 (Apo/Fas) indica a participação de Galectina-3 também em mecanismos da via extrínseca de apoptose. Sabe-se que o receptor CD95 pode acionar dois tipos de respostas apoptóticas, sendo as células denominadas de acordo com o tipo de resposta ativada (células tipo I e tipo II). Resumidamente, células tipo I, diante de estímulos apoptóticos, induzem a formação do complexo DISC (*death-inducing signaling complex*) e ativação de caspase 8. Já em células do tipo II, complexo DISC se forma ineficientemente. Os autores observaram que Gal-3 é expressa apenas em linfócitos classificados como do tipo I. Adicionalmente, foi demonstrado que Gal-3 interage com CD95 e que a expressão desta lectina em células tipo II converte estas ao fenótipo das células de tipo I (FUKUMORI et al. 2004).

Algumas inconsistências quanto à função anti-apoptótica de Gal-3 podem ser encontradas na literatura. A expressão de Gal-3 em células de carcinoma mamário, por exemplo, é capaz de promover apoptose induzida por TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), em parte pela inibição de AKT (também conhecida por PKB) (LEE et al. 2003). Por outro lado, em células de carcinoma de bexiga, a expressão de Gal-3 torna as células resistêntes ao estímulo apoptótico, desta vez induzindo a ativação de AKT (OKA et al. 2005). Tais diferenças podem em parte ser atribuídas ao uso de diferentes tipos celulares ou tipos tumorais. Estímulos apoptóticos podem também regular a transcrição do gene que codifica Gal-3 (*LGALS3*). A fosforilação de p53 pela quinase HIPK2 (*Homeodomain Interacting Protein Kinase 2*), por exemplo, ocorre em resposta a irradiação ultravioleta e leva à repressão da transcrição de Gal-3 e à ativação de apoptose dependente de p53 (CECCHINELLI et al. 2006). NF- κ B e c-Jun também estão envolvidos na indução da expressão de Galectina-3 em resposta a irradiação ultravioleta (DUMIC et al. 2000). Recentemente, demonstrou-se que a proteína *Nucling* inibe a translocação de complexo NF κ B para o núcleo e, conseqüentemente, a ativação da expressão de *LGALS3*. Esta proteína também interage diretamente com Galectina-3 no citoplasma (LIU et al. 2004).

Ainda no citoplasma, e complementar a sua função anti-apoptótica, Galectina-3 pode interagir com K-Ras. A expressão de ambas as proteínas aumenta a ativação da via de PI3K/AKT (ELAD-SFADIA et al. 2004), uma via especialmente envolvida em mecanismos de sobrevivência celular e que pode inclusive levar à ativação de fatores anti-apoptóticos. Interessantemente, em células de câncer de mama, Galectina-3 influencia a mudança de expressão de N-Ras para K-Ras (SHALOM-FEUERSTEIN et al. 2005).



Legenda: A presença de Galectina-3 pode influenciar a resposta à certos estímulos que levam à apoptose. Dentre os possíveis mecanismos implicados na função anti-apoptótica de Gal-3, destacam-se as interações com Bcl-2, CD95 e Sinexina. O controle da expressão de Gal-3 por p53 também deve contribuir para esta função de Gal-3.

Figura 6 - Implicações de Galectina-3 em vias que levam a morte celular por apoptose.

1.6.3 Galectina-3 nuclear

Uma das primeiras funções descritas para Gal-3 nuclear foi a de envolvimento no processamento do RNA mensageiro (RNA *splicing*). Dentro deste compartimento, Galectina-3 interage diretamente com a proteína *Gemin4*, fazendo parte do complexo envolvido na formação do espliceossoma (*spliceosome*) e indiretamente com o RNA mensageiro preliminar (pré-RNAm) (PARK et al. 2001).

Atualmente, outras funções nucleares vêm sendo reconhecidas, como por exemplo a regulação da expressão de *CCND1*, gene que codifica Ciclina D1, importante fator envolvido em proliferação celular. A indução de Ciclina D1 em células epiteliais de mama resulta da estabilização do complexo formado pelas proteínas nucleares e o DNA nos sítios de SP1 (*Specific Protein 1*) e CRE (*cAMP responsible element*) do promotor deste gene (LIN et al. 2002). Recentemente, uma lista de genes modulados pela expressão de Galectina-3 fosforilada (serina 6) foram revelados em um estudo de análise de expressão gênica em células epiteliais (MAZUREK et al. 2005). Dentre eles, destacam-se genes que codificam proteínas importantes no ciclo celular como Rb (Proteína associada ao retinoblastoma ou pRb), Ciclina D1 e Ciclina B2, assim como diferentes tipos de colágeno.

Alguns estudos sugerem a participação de Gal-3 na via Wnt/ β catenina. Segundo os autores, Gal-3 faz parte do complexo com β -catenina e Axina no citoplasma e pode ser fosforilada por GSK3- β (*Glycogen Synthase Kinase 3 \beta*) (SHIMURA et al. 2005). Adicionalmente, a presença de Gal-3 seria essencial para a retenção de β -catenina no núcleo de células de câncer de mama, o que sugeriu a participação de Gal-3 na translocação nuclear de β -catenina (SHIMURA et al. 2004). Também foi observada a interação da proteína Gal-3 com o fator de transcrição TCF4, envolvido na expressão de genes regulados por β -catenina, como por exemplo, *CCND1* (SHIMURA et al. 2004).



Legenda: Gal-3 interage com diversos componentes da via Wnt/ β -catenina, como Axina, GSK3 β e β -catenina. Gal-3 pode também interagir com TCF/LEF e induzir a expressão de genes regulados com a ativação desta via, como CCND1, gene que codifica Ciclina D1. **Figura 7** - Participação de Galectina-3 na Via Wnt/ β -catenina.

1.6.4 Galectina-3 extracelular

A proteína Galectina-3 pode também ser secretada e uma vez no meio extracelular, está livre pra se ligar a proteínas glicosiladas presentes na superfície de células ou na matriz extracelular (ECM). Já foi demonstrada a habilidade de Gal-3 de se ligar a Laminina, Fibronectina, Elastina, Colágeno IV, Tenascina-C e Tenascina-R (HUGHES 2001; DUMIC et al. 2006). A expressão de Gal-3 pode inclusive aumentar as propriedades adesivas de células tumorais a algumas destas proteínas, como Laminina, Vitronectina e Fibronectina (MATARRESE et al. 2000). Em adição, foi reportado que Gal-3

aumenta a adesão de células epiteliais ao Colágeno I, o que pode contribuir para o fenótipo invasivo destas células (FRIEDRICHS et al. 2007).

Algumas integrinas podem também servir de receptores para Gal-3. Em macrófagos, Gal-3 pode se ligar a α1β1 e a subunidade α de αMβ1. Gal-3 também pode se ligar a CD98, promovendo sua dimerização e conseqüente ativação de integrinas na superfície de monócitos, macrófagos e linfócitos T ativados (DONG e HUGHES 1997).

A ligação ao domínio extracelular de integrinas pode modular positivamente ou negativamente a sua ativação e a ligação à componentes da ECM. Enquanto Galectina-3 aumenta a adesão de neutrófilos à vários substratos, este efeito é bloqueado com anticorpos para algumas integrinas, como para α M β 1 (KUWABARA e LIU 1996). Por outro lado, o tratamento de células tumorais com Galectina-3 recombinante pode reduzir a adesão à matriz extracelular (OCHIENG et al. 1998).

É importante ressaltar que Galectina-3 extracelular pode também servir de substrato para metaloproteases MMP2 e MMP9 (*matrix metaloproteases* 2 e 9). A clivagem de Gal-3 por estas enzimas diminui a sua capacidade de homodimerização e aumenta sua capacidade de ligação à laminina contendo β -galactosídeos (OCHIENG et al. 1998).

Galectina-3 também pode participar de mecanismos de apoptose quando no meio extracelular. Diferente da função anti-apoptótica de Gal-3 quando no citoplasma, a forma extracelular desta proteína pode ter um papel pró-apoptótico ativado pela ligação à certos receptores celulares. Gal-3 extracelular é fator importante para a indução de apoptose em certos tipos celulares, como linfócitos T, células mononucleares de sangue periférico e células de leucemia. As proteínas CD7 e CD29 foram identificadas como receptores de Gal-3 na superfície destas células e acredita-se que este seja um importante mecanismo utilizado pelas células tumorais no escape do sistema imune (FUKUMORI et al. 2003). De acordo com esta afirmação, Gal-3 poderia estar implicada na indução de apoptose em linfócitos T infiltrantes (NAKAHARA et al. 2005).

1.7 GALECTINA-3 NA PROGRESSÃO TUMORAL

Muitos estudos demonstram que a alteração da expressão de Galectina-3 está envolvida com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de tumores. Os resultados já reportados na literatura, entretanto, são de difícil interpretação devido às inconsistências apresentadas para um mesmo tipo tumoral ou entre diferentes tipos de tumor.

Enquanto a expressão de Gal-3 aumenta durante a progressão do carcinoma de cólon (LOTZ et al. 1993), a mesma diminui em carcinoma de mama em relação ao tecido normal (CASTRONOVO et al. 1996; IDIKIO 1998). Interessantemente, o silenciamento de Gal-3 em células de carcinoma de mama em cultura resulta em um fenótipo menos maligno, com aquisição de inibição por contato, diminuição da proliferação independente de soro, anulação de crescimento dependente de ancoragem e menor tumorigenicidade *in vivo* (HONJO et al. 2001). Já a superexpressão de Gal-3

em linhagens tumorais de mama aumenta o potencial invasivo e metastático (MATARRESE et al. 2000).

Não somente os níveis de expressão, mas também a localização subcelular de Gal-3 tem se mostrado como um importante fator de progressão tumoral. Em próstata, enquanto que glândulas normais expressam Gal-3 no citoplasma e núcleo, a localização nuclear é perdida em lesões malignas e a distribuição citoplasmática de Gal-3 correlaciona com a progressão do tumor. Tais resultados sugerem que Gal-3 tenha funções anti-tumorais quando presente no núcleo, enquanto que no citoplasma esta favoreceria a progressão tumoral (VAN DEN BRULE et al. 2000).

Experimentos *in vitro* confirmaram os dados de van den Brule e demonstraram que Gal-3 citoplasmática está associada a maiores taxas de invasão e promoção de crescimento independente de ancoragem de células de câncer de próstata (CALIFICE et al. 2004). No mesmo trabalho foi demonstrado que Gal-3 citoplasmática é anti-apoptótica, enquanto que a nuclear é pró-apoptótica. Estes experimentos foram comprovados *in vivo*, e foi observado que a presença de Gal-3 citoplasmática contribui para a formação e tamanho do tumor, apoptose e angiogênese em camundongos atímicos.

1.8 GALECTINA-3 EM MELANOMA

Galectina-3 é expressa em diversos tecidos e órgãos. Na pele, esta lectina é expressa por queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans,

células de Schwann (DUMIC et al. 2006) e melanócitos (observações pessoais).

Em um estudo imunoistoquímico, VEREECKEN et al. (2005) observaram maior expressão de Galectina-3 em lesões primárias em comparação com lesões benignas. Em adição, melanomas mais invasivos e metástases apresentaram uma diminuição na expressão desta proteína. O estudo envolveu 89 lesões primárias, 11 metástases e 15 nevos benignos. O mesmo grupo analisou o soro de pacientes com melanoma metastático em estágio IV e observaram um aumento significativo da presença de Galectina-3 no soro destes pacientes em relação a pessoas sadias (VEREECKEN e HEENEN 2006; VEREECKEN et al. 2006; VEREECKEN et al. 2007a, b). Paralelamente, outro estudo demonstrou que a expressão de Galectina-3 em células de melanoma se correlaciona com apoptose de linfócitos T infiltrantes (ZUBIETA et al. 2006).

Mais recentemente, um trabalho utilizando *Tissue Microarray* analisou a expressão de Galectina-3 em 17 amostras de nevos benignos, 18 de nevos displásicos, 23 de melanoma primários e 31 de melanoma metastático (PRIETO et al. 2006). Os autores demonstraram que, no painel de amostras estudado, a expressão citoplasmática de Gal-3 aumenta de acordo com as fases de progressão tumoral (nevo benigno < nevo displásico < melanoma < metástase). Embora não tenha sido encontrada a mesma correlação para a localização nuclear, é importante destacar que não foi encontrada marcação nuclear em nevos (benignos ou displásicos). Adicionalmente, metástases subcutâneas raramente apresentaram marcação nuclear enquanto que as

disseminadas para os nódulos linfáticos e vísceras demonstraram expressão nuclear aumentada.

Ainda neste trabalho, os autores demonstraram que apenas as lesões em áreas de exposição à luz solar apresentaram marcação citoplasmática para Gal-3. Em adição, a marcação nuclear parece ser exclusiva de lesões em áreas de exposição crônica.

Assim, conhclui-se que os trabalhos que analisaram a expressão e localização de Gal-3 em melanoma apresentaram dados conflitantes. As inconsistências entre os trabalhos poderiam ser explicadas, por exemplo, pela utilização de anticorpos monoclonais diferentes e utilização de um painel de amostras distintas.

1.9 RNA DE INTERFERÊNCIA E VETORES LENTIVIRAIS

O silenciamento da expressão de um gene através de RNA de interferência (RNAi) pode ser obtido com o uso de pequenos RNAs de interferência sintetizados quimicamente (siRNA – *small interfering RNA*) ou através de clonagem do referente cDNA em vetores plasmidiais (shRNA – *short hairpin RNA*). siRNA sintéticos possuem meia-vida curta e, conseqüentemente, a inibição é restrita à curtos períodos. As principais vantagens da clonagem em vetores são: a maior estabilidade molecular do DNA; a possibilidade de amplificação em bactéria; o silenciamento permanente do gene alvo; a produção de um grande número de células

silenciadas e a manutenção do fenótipo alterado por longos períodos de tempo (PADDISON et al. 2002).

Atualmente, sistemas de RNAi utilizam lentivírus para uma melhor eficiência na entrega do shRNA de interesse na célula alvo. Lentivírus são originalmente derivados do HIV-1 (*Human Immunodeficiency Vírus -1*) que, entretanto, são incapazes de se replicar. Uma vez dentro da célula, o RNA viral sofre transcrição reversa e é transportado para o núcleo (LEWIS e EMERMAN 1994) onde é finalmente integrado ao genoma (BUCHSCHACHER e WONG-STAAL 2000).

Para a produção destes lentivírus, o plasmídeo de expressão codificando o shRNA de interesse é transfectado em conjunto com outros dois plasmídeos auxiliares que expressam *in trans* as proteínas estruturais e as necessárias para a etapa de transcrição. Com o auxílio da maquinaria celular, os lentivírus produzem partículas virais contendo o shRNA, que se acumulam no sobrenadante do meio de cultura. Este sobrenadante pode ser então utilizado para a transdução das células de interesse, ou seja, as células alvo para o silenciamento do gene.

No caso de shRNA, a seqüência inibidora do gene alvo é inserida no vetor nas orientações 5'-3' e 3'-5', que por sua vez são separadas por um espaçador referente à região formadora do grampo e uma região de terminação do transcrito. Uma vez na célula de interesse, a seqüência transcrita gera pequenos RNAs dupla fita em forma de grampo (shRNA) que, após clivagem pela enzima DICER, originam transcritos de aproximadamente 20 nucleotídeos com extremidades 3' protrusivas. Estas

seqüências são reconhecidas pela maquinaria celular de RNAi, que inclui um complexo com atividade nucleásica denominado RISC (*RNA-induced silencing Complex*), que atuará na degradação do RNA mensageiro (RNAm) correspondente ao gene alvo (PADDISON et al. 2002).

A utilização de lentivírus para a transdução e expressão em cultura de células apresenta diversas vantagens em relação aos outros sistemas. A utilização de plasmídeos não é tão eficiente quanto os sistemas virais, principalmente em se tratando de culturas primárias. Como resultado, somado à maior dificuldade de integração da seqüência exógeno no genoma da célula hospedeira, a seleção de clones estáveis é mais laboriosa. Dentre as vantagens em relação à outros sistemas virais, destaca-se a capacidade dos lentivírus de infectar tanto células em divisão quanto células quiescentes, diferentemente dos sistemas retrovirais conhecidos (NALDINI et al. 1998). Em adição, este sistema permite a expressão em longo prazo do gene de interesse, o que não é obtido com os sistemas adenovirais (DULL et al. 1998).



Legenda: A seqüência inibitória inserida no genoma da célula alvo (azul mais escuro) codifica um shRNA, ao mesmo tempo que o RNAm alvo é normalmente produzido no núcleo. Uma vez no citoplasma, o shRNA é reconhecido pela enzima DICER, que através de sua função RNásica, processa o shRNA deixando apenas a seqüência dupla-fita com extremidades protuberantes. Este RNA dupla-fita é reconhecido pelo complexo RISC, que participa do reconhecimento e clivagem do RNAm. A degradação do O RNAm é então finalizada pela maquinaria celular, impedindo assim a tradução da proteína.

Figura 8 - Mecanismo de Silenciamento por RNA de interferência.

2 JUSTIFICATIVA

A incidência e mortalidade de melanoma têm aumentado em muitos países e os maiores problemas em se lidar com este tumor são a sua alta habilidade de formar metástases e resistência à terapias (MARKS 2000). Os estudos para a identificação de genes possivelmente implicados no desenvolvimento e na progressão do melanoma são de grande importância a fim de contribuir para o entendimento da doença e conseqüentemente para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas ou terapêuticas.

O laboratório de Genômica Funcional da Fundação Antônio Prudente é classicamente um laboratório de análise de expressão gênica de diferentes tipos tumorais. Dentre as principais ferramentas utilizadas pelo grupo, destaca-se a técnica de *cDNA Microarray* para análise da expressão gênica global de amostras de tumores ou linhagens celulares. Atualmente, projetos que abordam os aspectos funcionais e biologia destes tumores têm sido criados com o objetivo principal de explorar os inúmeros dados gerados por estas análises.

Recentemente, dois projetos de análise da expressão gênica em melanomas e nevos foram concluídos. Os trabalhos foram realizados pelas alunas Waleska Martins e Nair Muto e geraram listas de genes diferencialmente expressos entre melanoma primário e metastático (MARTINS 2007) e entre melanomas e nevos (MUTO 2007). Especialmente nas listas geradas nas análises de MARTINS (2007), observamos entre os genes diferencialmente expressos a presença de Galectina-3. De acordo com estes dados, Gal-3 é mais expressa em amostras de tumor primário quando comparado com metastático (Figura 9).



Legenda: A esquerda, ilustração da lâmina de *cDNA Microarray* utilizada. A direita, Box Plot ilustrando as diferenças de expressão gênica entre tumores primários (verde) e metastáticos (vermelho). Os valores representam o \log_2 das amostras tumorais sobre a amostra referência. Galectina-3 é mais expressa em melanomas primários versus metastático (p=0.016).

Figura 9 - Análise do perfil de expressão gênica pela técnica de *cDNA Microarray.*

Galectina-3 é uma proteína expressa por diversos tipos tumorais. Em melanoma, poucos trabalhos já foram realizados sobre Gal-3. Embora a expressão de Gal-3 e a correlação de acordo com a progressão do melanoma já tenham sido demonstradas, os trabalhos divergem em pontos importantes e assim são inconclusivos (VEREECKEN et al. 2005; PRIETO et al. 2006). Com o objetivo de validar os dados de expressão gênica de Gal-3 em melanoma, nosso grupo realizou um experimento de *Tissue Microarray* para Gal-3. Este estudo foi realizado pela aluna Waleska Martins em colaboração com o grupo de Patologia Clínica do Hospital A.C. Camargo, antes de sair na literatura o trabalho de PRIETO et al. (2006), já comentado anteriormente.

A lâmina de *Tissue Microarray* utilizada para a análise de expressão de Galectina-3 possui 111 amostras em duplicata, incluindo 72 tumores primários (extensivos superficiais maiores do que 1 mm), 29 metástases (13 cutâneas, 8 linfonodais, 8 pulmonares) e 10 nevos compostos (DE SÁ 2005).

A Figura 10 ilustra os dados obtidos pelos experimentos de *Tissue Microarray.* Galectina-3 apresentou expressão nuclear diminuída em lesões metastáticas em relação às lesões primárias, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significante (p=0,052). A freqüência de marcação nuclear em lesões primárias e metastáticas foram, respectivamente, 47,5% e 27,6%. A marcação nuclear foi mais expressiva em melanomas primários de menor espessura (1 à 2 mm) quando comparados aos do grupos de tumores mais invasivos.

Em tumores primários, foi observada a correlação entre a espessura do tumor e a expressão de Galectina-3 citoplasmática e essa imunoreatividade apresentou significativa associação com índice de Breslow (p=0,007). Galectina-3 apresentou marcação citoplásmica positiva em 13,6% dos melanomas menos invasivos (T2) e 62,5% nos melanomas mais invasivos (T4).



Legenda: A) Exemplo de marcação de Gal-3 em melanoma primário. B) Exemplo de marcação de Gal-3 em melanoma metastático. C) Gráfico ilustrando a correlação significativa entre o escore médio no citoplasma e o índice de Breslow. D) Gráfico ilustrando a porcentagem dos diferentes tipos de amostras de tumor primário que expressam Galectina-3 citoplasmática. Análise imunoistoquímica em *Tissue Microarray* mostrou que a expressão de Gal-3 aumenta de acordo com o índice de Breslow nos melanomas primários e diminui em metástases.

Figura 10 – Análise da expressão de Galectina-3 pela técnica de *Tissue Microarray*.

Baseado nestes dados e na potencial importância de Galectina-3 na progressão tumoral justifica-se o estudo da participação de Galectina-3 em melanoma a fim de esclarecer a contribuição desta proteína nesta malignidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Inibir a expressão de Galectina-3 em linhagens de melanoma primário e metastático e analisar as alterações fenotípicas em relação à tumorigenicidade e malignidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um sistema de inibição de Galectina-3 pela técnica de RNA de interferência mediado por lentivírus, em células de melanoma;
- Analisar os efeitos biológicos resultantes da inibição de Galectina-3 por métodos *in vitro* e *in vivo*;
- Examinar a correlação entre a localização subcelular de Galectina-3 e
 β-catenina em células de melanoma
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas mudanças fenotípicas induzidas pelos silenciamento de Galectina-3

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE CÉLULAS E ENSAIOS BIOLÓGICOS

O projeto foi devidamente apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C.Camargo em 26 de agosto de 2004, e aprovado para a realização do estudo (n°628/04).

Os ensaios *in vivo* foram realizados no Biotério do *The Wistar Institute* of *Pathology and Anatomy* (Filadélfia, EUA) após aprovação do *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) (Protocolo n°111983), responsável pelo programa que assegura a manutenção de cuidados, uso e tratamento aceitável dos animais nos Estados Unidos.

4.1.1 Cultura de células de melanoma

A maioria das linhagens utilizadas neste trabalho são linhagens de melanoma humano WM (*Wistar Melanoma Collection* - Coleção de Melanoma do Instituto Wistar) de diversas fases de progressão do melanoma. Algumas das linhagens WM foram cedidas pelo Laboratório da Dra. Enilza Espreafico, da FMRP-USP (WM35, WM902, WM278, WM1617). As outras linhagens WM utilizadas foram cedidas diretamente pelo laboratório de Meenhard Herlyn durante o estágio da aluna no exterior (WM793, 1205Lu, WM983A, WM983B). A linhagem melan-a (BENNET et

al.1987) (melanócito murino imortalizado) foi cedida pelo laboratório do Dr. Roger Chammas.

Dentre as linhagens mais utilizadas, algumas formam pares de origem comum. A linhagem 1205Lu foi isolada a partir de uma metástase em pulmão gerada pela injeção de células WM793 em camundongos. As linhagens WM983A e WM983B são originárias do mesmo paciente, tendo a primeira sido isolada de um melanoma de crescimento vertical e a segunda isolada de uma metástase linfonodal.

As linhagens WM foram cultivadas em meio Tu2% (Tumor 2%), composto por MCDB153 (Sigma) e L15 (Invitrogen) na proporção 3:1, suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS) (Cansera), insulina 5ug/ml (Sigma) e CaCl₂ 1,68mM (Sigma). As outras linhagens, quando utilizadas, foram cultivadas em meio RPMI (Invitrogen) suplementado com 10% de FBS.

Quadro 1 –	Células	melanocíticas	separadas	em	melanócitos	e n	nelanom	as
de diferentes	s fases d	le desenvolvim	nento.					

Melanócitos	Fase de Crescimento Radial	Fase de Crescimento Vertical	Metástase
FOM173	WM35	WM278	WM1617
melan-a		WM793	1205Lu
		WM983A	WM983B
		WM902	

4.1.2 Isolamento e cultura dos demais tipos celulares

Fibroblastos, queratinócitos e melanócitos foram isolados à partir de amostras de remoção de prepúcio de recém nascidos (circuncisão).

Para o isolamento de melanócitos, fragmentos de amostras de prepúcio (5X5mm) foram incubados em Dispase II (*Neutral Protease Grade II*) (Boehriger Mannhein) por 18 a 20 horas à -80^oC. Após este período, a epiderme e a derme foram separadas utilizando-se uma pinça e a epiderme foi transferida para uma placa de petri. À esta placa, foi adicionado Tripsina 0,0125% em Versene (Sigma-aldrich) e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, os fragmentos foram picados o máximo possível. Finalmente, a Tripsina foi neutralizada utilizando o inibidor de tripsina *SoyBean Trypsin Inhibitor* (Invitrogen) e a suspensão celular foi transferida para um tubo de 15ml. Após centrifugação à 1500 RPM por 5 minutos, as células foram ressuspendidas em 5 ml de meio 254CF (Cascade Biologicals) e cultivadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂, ou armazenadas à 4^oC em 254CF contendo 5% Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific).

Para a obtenção de queratinócitos, realizou-se o mesmo protocolo detalhado no parágrafo anterior, porém com algumas alterações. Utilizou-se Tripsina contendo 0,25% EDTA em Versene para a dissociação a epiderme e meio Epilife (Cascade Biologicals) para a cultura dos queratinócitos isolados.

Para o isolamento dos fibroblastos, a etapa de dissociação com Dispase II foi novamente utilizada. Entretanto, a epiderme foi descartada (ou utilizada para o isolamento de melanócitos ou queratinócitos) e a derme foi digerida com Colagenase tipo IV 1mg/ml (Sigma-Aldrich) por 12 À 18 horas à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos à 1500RPM e ressuspendida em meio DMEM (CellGro) contendo 10% de FBS. As células foram mantidas em estufa à 37° C e 5% de CO₂ ou armazenadas à -80⁰C em FBS contendo 10% DMSO.

4.2 RNA DE INTERFERÊNCIA

4.2.1 Análise das seqüências de shRNA

A inibição de Galectina-3 foi realizada pela técnica de RNAi (RNA de interferência). Vale destacar que, neste trabalho, quando refere-se a inibição ou silenciamento de Gal-3, isto significa a inibição da tradução da proteína Gal-3 devido a degradação do RNAm.

Para a inibição da expressão de Galectina-3, foi utilizado o sistema *Mission shRNA* (Sigma-Aldrich), que disponibiliza 5 plasmídeos contendo diferentes seqüências shRNA para serem testadas quanto a capacidade de inibição da expressão de um gene específico.

Anteriormente ao uso destes plasmídeos, as seqüências que estes codificam, foram analisadas quanto a presença de similaridades com outros genes, a fim de prevenir os chamados efeitos *off-target*. As cinco seqüências de shRNA para o silenciamento específico de *LGALS3* (gene que codifica Galectina-3) foram analisadas pelo programa *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blas tn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=Blas tSearch&SHOW DEFAULTS=on), sendo os parâmetros ajustados para buscas de seqüências curtas, como sugerido pelo programa. Os 5 vetores

provenientes do fabricante e contendo as seqüências estão listados abaixo. Em negrito, as seqüências específicas para *LGALS3*.

1)TRCN000029304:

CCGGGCTCACTTGTTGCAGTACAATCTCGAGATTGTACTGCAACAAGTGAGCTTTTT Identidade do clone: NM_002306.1-664s1c1 2)TRCN0000029305: CCGGGCCCACGCTTCAATGAGAACAACTCGAGTTGTTCTCATTGAAGCGTGGGTTTTT Identidade do clone: NM_002306.1-498s1c1 3)TRCN0000029306: CCGGGCAAACAGAATTGCTTTAGATCTCGAGATCTAAAGCAATTCTGTTTGCTTTTT Identidade do clone: NM_002306.1-442s1c1

4)TRCN0000029307:

CCGGGCAGTACAATCATCGGGTTAACTCGAGTTAACCCGATGATTGTACTGCTTTTT

Identidade do clone: NM_002306.1-675s1c1

5)TRCN0000029308:

CCGGGCAATACAAAGCTGGATAATACTCGAGTATTATCCAGCTTTGTATTGCTTTTT Identidade do clone: NM_002306.1-536s1c1

4.2.2 Produção das partículas lentivirais

Para a produção dos lentivírus contendo os shRNA de interesse, foi primeiramente feita a preparação plasmidial. Colônias bacterianas (*E. coli*) contendo o plasmídeo foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) (CellGro) com 0,1 mg/ml de ampicilina (CellGro) por 12 horas e o protocolo de extração de DNA foi realizado segundo recomendações do fabricante (Qiagen). Foram também preparados os plasmídeos auxiliares necessários

para empacotamento do lentivírus, pCMV-VSVg (*ENV*) e pCMV- Δ R8.2 (*GAG-POL*), e o vetor vazio controle, pLKO.1 (Sigma-Aldrich).

Para a produção das partículas virais, células HEK293T (ATCC n°CRL-11268) foram semeadas em placas de cultura de 100mm e cultivadas em DMEM 10% FBS com 25 mM HEPES (Fisher Scientific) até atingirem 60% de confluência. Um total de 8µg de DNA plasmidial (1µg de pCMV-VSVg, 3µg de pCMV- Δ R8.2 e 4µg de shRNAGal-3 – clones 1-5 ou pLKO.1 vazio) foi adicionado à um coquetel contendo 20µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em meio Optimen (Invitrogen). Este coquetel foi adicionado às células cultivadas com 5ml de meio DMEM 10% FBS com 25 mM HEPES por 4 horas à 37°C e 5% de CO₂. Após este intervalo, foram adicionados 5 ml de meio fresco e a incubação foi mantida por mais 12-18 horas nas mesmas condições. O sobrenadante contendo as partículas lentivirais foi então coletado e centrifugado a 2000 RPM por 10 minutos. Um novo meio foi adicionado e o mesmo procedimento foi realizado após 24 e 48 horas. Alíquotas de 2ml de sobrenadante, referentes aos dias 1, 2 e 3, foram estocadas à -80°C até o uso.

4.2.3 Transdução de células de melanoma

Para a transdução das células alvo, sete placas de cultura de 100mm foram semeadas com células de melanoma em aproximadamente 60% de confluência (5 placas para shRNAGal-3, clones 1 À 5; 1 placa para pLKO.1; 1 placa sem transfecção para o controle de seleção com puromicina). No dia seguinte, as células foram lavadas com tampão HBSS (Invitrogen) e 7 ml de

meio Tu2% foi adicionado. Uma alíquota do estoque de cada vetor lentiviral contendo as seqüências alvo para Gal-3 (sobrenadante coletado no passo anterior) foi descongelada e adicionada cuidadosamente sobre as células, juntamente com 8 µg/ml de *Polybrene* (hexadimethrine bromide) (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 12-18 horas. A transdução foi interrompida pela substituição do meio contendo os lentivírus por um novo meio Tu2% fresco.

Após 2 ou 3 dias, iniciou-se a seleção em meio Tu2% contendo 2µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich). Quando não foi mais possível observar células vivas na placa controle (não transduzida), a seleção foi interrompida com a substituição do meio por Tu2% sem antibiótico. Após a seleção, as células foram congeladas em FBS contendo 10% DMSO. Por precaução, as células foram freqüentemente re-selecionadas após períodos extensos em cultura.

4.3 ENSAIOS FUNCIONAIS

4.3.1 Análise de Proliferação Celular (MTT)

O ensaio de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] é baseado na habilidade de uma desidrogenase mitocondrial em clivar os anéis tetrazolium do corante MTT, resultando na formação de cristais azuis. Estes cristais formazan são impermeáveis à membrana plasmática e, desta forma, se acumulam no interior de células viáveis. A adição de DMSO solubiliza as células, resultando na liberação dos cristais e, conseqüentemente, na coloração azul. O número de células viáveis é diretamente proporcional aos níveis de cristais azuis formados, sendo que a coloração pode ser medida utilizando um espectrofotômetro para placas de 96 poços (MOSMANN 1983).

Para a realização do ensaio de incorporação de MTT, as células WM793 e 1205Lu, controle e shGal-3, foram semeadas em placas de 96 poços (1.500 células por poço) e uma estimativa do número de células foi medida durante o período de 5 à 6 dias. Para tal, 10% de MTT (5mg/ml) (Sigma-Aldrich) foram adicionados à cada poço. A placa foi incubada por 3 horas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. O meio contendo MTT foi removido e substituído por 100µl de DMSO. Após 10 minutos à 37°C, medições da coloração gerada foram analisadas em espectrofotômetro à 490nm (Biorad).

Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 4.0.

4.3.2 Ensaio de Crescimento Independente de ancoragem

O protocolo para o ensaio de crescimento independente de ancoragem foi adaptado do protocolo do laboratório da Dra. Mina Bissel, pesquisadora da Universidade da California, em Berkeley.

Em placas de 6 poços, foi semeado 1 ml de uma solução acelular contendo ágar (Difco-grau de eletroforese) 0,5% em meio Tu2%. Após contagem, 5.000 células foram misturadas em 1ml de uma solução de ágar 0,35% em Tu2% e semeadas sobre a camada acelular. Após solidificação da camada celular, foi adicionado 1ml de meio Tu2%. O meio foi trocado a

cada 2 dias por meio fresco. Após aproximadamente 30 dias, as placas foram coradas com uma solução de Violeta de Genciana (0,05% em PBS 1X) por duas horas à temperatura ambiente, e descoradas com uma solução de 5% ácido acético, 20% Metanol em PBS 1X em três lavagens de 10 minutos cada. O ensaio foi realizado em replicas de 5 experimentos individuais.

Para a quantificação de colônias no ensaio de *Soft Agar*, os poços foram demarcados em 16 regiões e as colônias foram contadas em uma área visível sobre a Objetiva 10X em microscópio óptico. Opcionalmente, o cálculo do número de colônias foi realizado pelo programa ImagePro 6.2. Nesta abordagem, assumiu-se um valor mínimo de 100µm para o diâmetro mínimo das colônias. A média dos valores obtidos nas réplicas foi então utilizada para determinar o número médio de colônias por linhagem celular e um gráfico foi gerado com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

4.3.3 Ensaio de Migração Celular por Cicatrização

Células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços em 90-95% de confluência (aproximadamente 250.000 células por poço). Através de uma incisão longitudinal com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foram removidas 2 ou 3 fileiras paralelas de células na placa de cultura. Os ensaios foram realizados em meio Tu2% e meio Tu0%.

As células foram incubadas em estufa à 37° C e 5% de CO₂ e medições foram realizadas nos momentos 0, 12, 24 e 48 horas. A migração foi quantificada em réplicas (4 à 6 réplicas por célula e condição).

Para a avaliação da migração, foram realizadas 4 medidas da distância entre as duas extremidades da cicatriz nos tempos 0 e 12 horas. As medições foram realizadas com o auxílio do programa ImagePro 6.2. Estas medidas foram utilizadas para o cálculo da média de migração por cicatriz pelo programa GraphPad Prism 4.0.

4.3.4 Ensaio de Invasão Tumoral

Anteriormente ao ensaio de Invasão Tumoral, as células de melanoma foram transduzidas com o vetor hx-GFP e as células verde-fluorescentes foram submetidas a Separação de Células por Fluorescência (FACS) (etapa realizada na *The Wistar Institute Flow Cytometry Facility*). A fluorescência de 100% das células foi confirmada em microscópio invertido de fluorescência.

Para a produção de esferóides, placas de 96 poços foram preparadas previamente com 100µl de Ágar (DIFCO) 1,5% em PBS 1X, previamente esterilizado em autoclave. As células de melanoma (5.000 células por poço) foram semeadas nestas condições de não-adesão e cultivadas em meio Tu2% à 37°C e 5% de CO₂. Após aproximadamente 72 horas, as células de um poço se agruparam formando os esferóides, que foram coletados.

Para a cultura tridimensional, preparou-se a mistura acelular composta por 1% de FBS em 1X EMEM (Lonza Walkersville), 200mM de L-Glutamina (Invitrogen), 7,5% de NaHCO₃ (Cambrex)) e 0,78-1,01mg/ml de Colágeno I bovino (Organogenesis). Para a formação da camada acelular, 300µl desta mistura foram adicionados às placas de 24 poços. Os esferóides foram então adicionados ao restante da mistura e semeados sobre a camada acelular. Foram adicionados 1,3ml de meio Tu2% e as células mantidas à 37° C e 5% de CO₂.

Foram registradas fotos no tempo zero, 24, 48 e 72 horas, as quais foram utilizadas para quantificar a invasão das células na matriz de Colágeno I.

Para a quantificação da invasão, a medida da distância do ponto 0 (*core*) até a extremidade da célula invadindo o Colágeno foi realizada em 20 pontos randomicamente escolhidos em cada esferóide. As medições foram realizadas pelo programa ImagePro 6.2. Um total de 4-5 esferóide foi analisado por tipo celular e a média foi colocada em um gráfico utilizando o programa GraphPad Prism 4.0.

4.3.5 Análise de Tumorigenicidade em Camundongos Imunodeficientes

Para a análise da tumorigenicidade das linhagens silenciadas para Galectina-3, foram utilizados camundongos NOD/SCID (*Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient*).

Camundongos NOD/SCID são resultantes do retrocruzamento de camundongos SCID com a linhagem NOD/LtSz. Os camungondos SCID são homozigotos para a mutação no gene *SCID*, que causa ineficiência no rearranjo do DNA, prevenindo assim o rearranjo de imunoglobulinas e genes de receptores de linfócitos T. O resultado é a deficiência de linfócitos B e T, mantendo, porém, uma imunidade residual devido à presença de células citotóxicas naturais, sistema complemento funcional e células mielóides. O retrocruzamento com a linhagem NOD rendeu a este modelo uma menor imunidade residual, uma vez que os camundongos NOD apresentam defeito no sistema complemento e na função de macrófagos (SHULTZ et al. 1995, LAPIDOT et al. 1997).

Os camundongos, de aproximadamente 6 semanas, receberam injeções subcutâneas de células de melanoma embebidas em matrigel na proporção 1:1 no dorso direito (shGal-3) e esquerdo (pLKO.1). Para as linhagens metastáticas, foram injetadas 1.000.000 células. Para as linhagens de tumor primário, foram utilizadas 2.000.000 células.

A medição do crescimento tumoral foi realizada duas vezes por semana, com o auxílio de um paquímetro. Foram realizadas duas medidas perpendiculares do diâmetro do tumor e uma medida da altura. Estes valores foram utilizados para o cálculo do volume tumoral.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.4.1 Western Blotting

Para a análise da expressão protéica, as células foram retiradas da placa de cultura e centrifugadas à 1500 RPM por 5 minutos. Todas as etapas subseqüentes foram realizadas à 4°C. O precipitado celular foi incubado em tampão de lise celular (50mM de TRIS pHc 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 1% Triton 2µg/ml, 2µg/ml aprotinina, 1mM PMSF, 1µg/ml Leucopeptina) por 15 minutos e centrifugado à 13000 RPM por 30 minutos.

A concentração de proteínas extraídas por amostra foi realizada com o *kit BioRad Protein Assay* (BioRad) utilizando uma curva de BSA (Albumina de soro bovino) com as concentrações 1; 2; 3; 4; 5;6;7;8;9 µg/µl.

Para a realização do *Western Blotting*, 30µg de amostra de cada proteína foi submetida à SDS-PAGE em gel 10% ou gel gradiente 4-10% em condições desnaturantes (Invitrogen). A separação das amostras foi acompanhada com a utilização do marcador de peso molecular *Rainbow Low Range* (Amershan Biosciences). Após a corrida, o aparato de transferência foi montado utilizando uma membrana de PVDF Hybond P (Amershan Biosciences) e submetido a uma corrente de 180-250mA em câmara fria por 1 hora. A transferência foi confirmada corando-se a membrana com o reagente de Ponceau (Sigma-Aldrich).

A membrana foi então lavada com TBS-T (0,1M TRIS-HCI; 0,4M NaCI; 0,05% Tween) e incubada em solução de bloqueio (TBS-T contendo 5% de leite desnatado) por 1 hora. As incubações com os anticorpos primários foram realizadas por 2 horas à temperatura ambiente ou por 12-16 horas a 4°C. As membranas foram então lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. A detecção foi realizada utilizando o *kit ECL Western* (Amershan Biosciences). A lista dos anticorpos primários utilizados neste trabalho se encontra no Quadro 2. Os anticorpos secundários (anticamundongo, anti-coelho e anti-rato conjugados com peroxidase) foram adquiridos da Amershan Biosciences.

<u>Anticorpo</u>	<u>Tipo</u>	Fabricante
Anti- Galectina-3	Monoclonal	Laboratório do Dr. Roger Chammas (FM-USP, São
M3138		Paulo, SP
Anti-AKT	Policlonal	Cell Signaling
Anti-FosfoAKT	Policlonal	Cell Signaling
Anti-CDK4	Policlonal	Cell Signaling
Anti-p16/INK4a	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-FosfoRb	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-Rb	Monoclonal	Cell Signaling
Anti-Ciclina D1	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-β-catenina	Monoclonal	BD Biosciences
Anti-BAD	Policlonal	Cell Signaling
Anti-BAX	Policlonal	Cell Signaling
Anti-Bcl-2	Policlonal	Cell Signaling
Anti-BIM	Policlonal	Cell Signaling
Anti-p53	Monoclonal	Calbiochem
Anti-HDM2	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-αTubulina	Monoclonal	Sigma-Aldrich
Anti-β-actina	Monoclonal	Sigma-Aldrich
Anti-c-jun	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GSK3β	Policlonal	Cell Signaling
Anti-pTEN	Policlonal	Cell Signaling

Quadro 2 - Lista de anticorpos primários utilizados e seus respectivos fabricantes.

4.4.2 Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, 20.000 células foram semeadas em lamínulas estéreis colocadas em placas de 24 poços e, após 12 horas, fixadas em Paraformaldeído 2% em PBS1X. As células foram então permeabilizadas em Triton X-100 0,2% e bloqueadas em 10%BSA em PBS1X. Cada lamínula foi incubada com os anticorpos primários Anti-Gal-3 M3138 (1:40) e β -catenina (1:20) em BSA1%/PBS1X por 12-16 horas a 4°C. IgG de rato e camundongo (1:500) (Sigma-Adrich) foram utilizados como controles dos anticorpos primários Gal-3 e β-catenina, respectivamente.

Após três lavagens, as lamínulas foram incubadas com 50µl da mistura dos dois anticorpos secundários (Anti-rato conjugado com Alexa 448 e anti-camundongo conjugado com Alexa 568) (1:500) (Invitrogen). As lamínulas foram lavadas novamente e transferidas para uma lâmina contendo 10µl de reagente de montagem (Vector).

4.5 MICROSCOPIA

As imagens de contraste de fase foram obtidas no Microscópio Invertido de Fluorescência Nikon TE2000. As imagens de fluorescência do experimento de esferóides foram capturadas no mesmo microscópio. Os ajustes das imagens capturadas foram realizadas utilizando o programa ImagePro 6.2, mantendo a fidelidade ao resultado.

As imagens adquiridas pelo ensaio de imunofluorescência foram capturadas no Microscópio Confocal LEICA TCS-SP2. As análises foram realizadas utilizando o pacote de análises fornecido pelo fabricante.

O programa ImagePro 6.2 possui diversas ferramentas que permitiram a análise e quantificação de resultados.
4.6 ESTATÍSTICA

Para comparação de variáveis contínuas, quando existiam apenas dois grupos de comparação, foi empregado o teste t de *Student* não-pareado ou Mann-Whitnney, de acordo com a distribuição dos valores das variáveis (normal ou não).

Na avaliação da proliferação celular pelo método de MTT e das curvas de crescimento tumoral, foi utilizado o teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis (dependendo da distribuição dos valores das variáveis), seguido do teste de Tukey ou Dunn's para comparações par à par entre os grupos considerados.

Foram considerados valores estatisticamente significantes aqueles com p<0,05. Os gráficos representativos dos resultados descritos e as análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

5.1 EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS DE MELANOMA

O Instituto Wistar possui um banco de linhagens de melanoma, cujas células foram isoladas pelo laboratório do Dr. Meenhard Herlyn. Uma das principais ferramentas do laboratório é a modulação de genes de interesse, como oncogenes e genes supressores de tumor em melanócitos e em células de melanoma. Assim, o laboratório criou um painel com dados relativos ao padrão da expressão gênica da maioria destas linhagens. A análise foi realizada por técnicos do laboratório, utilizando o sistema de *Oligoarrays* da Affymetrics (UI33A). Resumidamente, amostras de RNAm das linhagens celulares foram hibridizadas nos *Oligoarrays* e os níveis de RNAm representantes de um painel de genes humanos foi gerado. Estes dados são disponibilizados aos membros do laboratório para uma análise inicial de expressão de genes candidatos e para a escolha da célula alvo. Os números representam a intensidade média da fluorescência obtida pela hibridização na sonda representante deste gene, sendo o *background* previamente subtraído e os *Oligoarrays* normalizados.

Estes dados foram utilizados para analisar a expressão de Gal-3 entre estas linhagens. Observando os dados do gráfico nota-se que Gal-3 é expressa em todas as linhagens de melanoma listadas (Figura 11) e em melanócitos e fibroblastos (dados não mostrados). Entretanto, a expressão de Gal-3 mostrou grande variação entre as diferentes linhagens. Embora dados da literatura indiquem que a expressão de Gal-3 se correlaciona com a evolução do melanoma em amostras de tumor (VEERECKEN et al. 2005; PRIETO et al. 2006), esta análise não mostrou a mesma correlação entre linhagens celulares estabelecidas para cultura em laboratório.



Legenda: As células estão agrupadas conforme a fase de progressão de melanoma (RGP, VGP e metástase). Os valores são referentes a intensidade de fluoresência extraída da lâmina de *Oligoarray*. Os dados mostram que Galectina-3 é expressa em todas as células analisadas.

Figura 11 - Dados brutos da expressão de Gal-3 em linhagens de melanoma.

Foi então realizada análise da expressão protéica em diversas linhagens melanocíticas, representantes de fases de progressão tumoral. A linhagem melan-a representa um melanócito murino imortalizado. A linhagem FF representa fibroblastos humanos isolados a partir de prepúcio. Ambas melan-a e FF serviram como controle positivo de expressão de Gal-

3.

A análise demonstrou que Gal-3 está presente em todas as células analisadas (Figura 12). Entretanto, novamente não foi encontrada correlação entre as fases de progressão do tumor e a expressão de Galectina-3.



Legenda: Análise da expressão de Gal-3 por *Western Blotting* em linhagens de melanoma humano. Melanócitos murinos MelanA (Mn) e Fibroblastos (FF) serviram como controle positivo. **A)** Mw (metástase), WM35 (RGP), WM278 (VGP), WM902 (VGP), WM1617 (metástase). **B)** WM35 (RGP), WM793 (VGP), C8151 (metástase) e 1205Lu (metástase). A expressão da proteína Gal-3 foi detectada em todas as linhagens analisadas.

Figura 12 – Análise da expressão de Gal-3 em linhagens de melanoma.

5.2 SILENCIAMENTO DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS DE MELANOMA PRIMÁRIO E METASTÁTICO

Anteriormente ao uso de shRNA para Gal-3 nas linhagens celulares, as seqüências foram analisadas utilizando o programa BLASTn. Foi observado que todas as cinco seqüências apresentam similaridade apenas com o gene *LGALS3* (NM_002306.2) e com a forma variante comumente chamada de *GALIG* (NR_003225.1). A isoforma *GALIG* é codificada a partir de um processamento alternativo do gene e pode também ser chamada de *LGALS3 isoforma 2* (GUITTAUT et al. 2001). Todos os shRNA são direcionadas para seqüências dentro da região codificante das duas isoformas do gene *LSGAL3*.

Os estudos de Gal-3 foram iniciados utilizando as linhagens WM793 (VGP) e 1205Lu (metástase). Primeiramente, foi realizada a transdução da linhagem 1205Lu com os 5 vetores carregando as diferentes seqüências de shRNA para Gal-3. Dois vetores mostraram os maiores níveis de inibição sh1 e sh4 (dado não mostrado). Estes vetores e o vetor vazio foram então utilizados para a transdução da linhagem WM793 (Figura 13A).

Outro par de linhagens de melanoma (VGP e metastático) foi posteriormente utilizado para algumas validações dos dados obtidos com as linhagens WM793 e 1205Lu. As linhagens WM983A e WM983B também são originárias do mesmo paciente, sendo a primeira isolada de um melanoma de crescimento vertical e a última originária de uma metástase linfonodal. O silenciamento de Gal-3 obtido nestas linhagens, apenas com o sh4, estão demonstrados na figura 13B. A maioria dos experimentos descritos a seguir utilizou somente o vetor contendo a seqüência sh4.



Legenda: A) WM793 (VGP) e 1205Lu (metástase) transduzidas com os vetores shGal-3 sh1 e sh4. B) WM983A (VGP) e WM983B (metástase) transduzidas com o vetor sh4. As linhagens transduzidas com o vetor vazio (pLKO.1) foram utilizadas como controle positivo (C). A expressão de Gal-3 foi significantemente diminuída por RNAi.

Figura 13 - Inibição da expressão de Galectina-3 em células de melanoma.

5.3 ANÁLISE DAS LINHAGENS SILENCIADAS PARA GALECTINA-3

5.3.1 Morfologia Celular

A observação de 1205Lu shRNAGal-3 ao microscópio ótico por contraste de fase não indicou alterações morfológicas para as células 1205Lu shRNAGal-3 em relação as células controle (Figura 14A-D). As células WM793 shRNAGal-3 apresentam um formato mais chato e com menos espalhamento em relação ao controle. Outra diferença observada para estas células foi na distribuição na placa. As células WM793 normalmente se distribuem e crescem de forma desordenada, geralmente se agrupando em regiões da placa de cultura (Figura 14E,F). Interessantemente, as células WM793 shGal-3 perdem esta característica (Figura 14G,H).



Legenda: A,B) 1205Lu pLKO.1. **C,D)** 1205Lu shGal-3. **E,F)** WM793 pLKO.1. **G,H)** WM793 shGal-3. Aumentos de 4X (esquerda); 10X (direita). WM793 shGal-3 apresenta alteração na morfologia celular.

Figura 14 - Morfologia de células de melanoma silenciadas para Gal-3

5.3.2 Proliferação Celular

O ensaio de MTT mede o número de células viáveis aderidas na placa de cultura. Esta medição foi realizada nos tempos 0, 1, 3 e 5 dias. Todas as linhagens celulares demonstraram crescimento, sendo a diferença entre os dias zero e cinco significante (p<0,001). Para as células 1205Lu, não foi observada diferença entre as células controle e as células silenciadas para Gal-3 (p>0,05). Já as células WM793 controle cresceram mais rapidamente do que as células WM793 shRNA Gal-3 (p<0,001) (Figura 15). Esta diferença é representada por dois experimentos independentes e é estatisticamente significativa.



Legenda: Os gráficos mostram a incorporação de MTT pelas células selvagem e silenciadas para Gal-3 (y) durante 5 dias (x). **A)** WM793 pLKO.1, WM793 Gal-3 (p<0,001). **B)** 1205Lu pLKO.1, 1205Lu Gal-3 (p>0,05). Os resultados ilustram a média de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey, comparando-se os valores obtidos no dia 5. A comparação dos valores dos dias 0 e 5 mostrou um crescimento significante para todas as linhagens celulares (p<0,001). O silenciamento de Gal-3 influencia o crescimento de células de melanoma WM793.

Figura 15 - Análise da proliferação celular pelo método de MTT.

5.3.3 Crescimento Independente de Ancoragem

O ensaio de *Soft Agar* mostrou que não há diferença no crescimento independente de ancoragem para as células 1205Lu pLKO.1 e 1205Lu shGal-3 (Figura 16B). Entretanto, há uma diferença estatisticamente significante no número de colônias observada entre as células WM793 pLKO.1 e WM793 shGal-3 (p=0,0074) (Figura 16A).

É importante ressaltar que além da diferença numérica, observa-se uma grande diferença no tamanho das colônias. As colônias formadas pelas células WM793 pLKO.1 são notavelmente maiores do que as colônias formadas pelas células WM793 shGal-3 (Figura 16C-D).



Legenda: Os gráficos ilustram as diferenças entre o número de colônias formadas pelas diferentes linhagens. **A)** WM793 pLKO.1 e shGal-3 (p=0,0074). **B)** 1205Lu pLKO.1 e shGal-3 (p>0,05). Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *student*. Na parte inferior, colônias formadas pelas diferentes linhagens. **C)** WM793 pLKO.1. **D)** WM793 shGal-3. **E)** 1205Lu pLKO.1. **F)** 1205Lu shGal-3. Aumento de 20X. Células WM793 shGal-3 formam colônias menores, e em menor número, do que células controle.

Figura 16 - Ensaio de Crescimento independente de ancoragem de células WM793 e 1205Lu.

Os ensaios de crescimento independente de ancoragem também foram realizados com o outro par de linhagens de melanoma, WM983A e WM983B. Os resultados obtidos são similares aos obtidos para as linhagens WM793 e 1205Lu, porém não foi observada diferença no tamanho das colônias (Figura 17).



Legenda: Os gráficos ilustram as diferenças entre o número de colônias formadas pelas diferentes linhagens. **A)** WM983A pLKO.1 e shGal-3 (p=0,0145). **B)** WM983B pLKO.1 e shGal-3 (p>0,05). Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *student*. Células WM983A shGal-3 formam menos colônias do que células controle.

Figura 17 - Ensaio de Crescimento independente de ancoragem de células WM983A e WM983B.

5.3.4 Migração Celular

No ensaio de migração por cicatrização *in vitro*, células foram removidas de uma cultura em monocamada (com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática) e a capacidade das células de migrar e cobrir novamente a camada acelularizada foi analisada.

Para aumentar a possibilidade de observar diferenças entre os pares de células, o ensaio foi realizado em condições normais (em meio Tu2%) e em condições de deprivação de soro (em meio Tu0%).

Fotos foram registradas em 4 à 6 regiões diferentes da placa nos tempos zero, 12, 24, 36 e 48 horas. Em 12 horas, já foi possível notar um fechamento parcial da cicatriz devido a migração celular (Figuras 18,19). Somente em aproximadamente 48 horas a cicatriz foi totalmente coberta por células, provavelmente devido à migração em conjunto com proliferação celular. As análises comparativas foram realizadas entre as fotos representativas do tempo zero e 12 horas. Em nenhuma das condições foi encontrada diferenças significativas no potencial de migração de células pLKO.1 controle e as células silenciadas para Gal-3 (Figura 20).



Legenda: Em vermelho, as distâncias que foram medidas entre as duas extremidades da cicatriz nos tempos 0 e 12 horas. O experimento foi realizado na presença (Tu2%) e ausência (Tu0%) de soro. Aumento 10X. Não foram observadas diferenças no potencial de migração das células WM793 silenciadas para Gal-3.

Figura 18 - Ensaio de Migração Celular com as células WM793 shGal-3 e WM793 pLKO.1.



Legenda: Em vermelho, as distâncias que foram medidas entre as duas extremidades da cicatriz nos tempos 0 e 12 horas. O experimento foi realizado na presença (Tu2%) e ausência (Tu0%) de soro. Aumento 10X. Não foram observadas diferenças no potencial de migração de células das células 1205Lu silenciadas para Gal-3.

Figura 19 - Ensaio de Migração Celular com as células 1205Lu shGal-3 e 1205Lu pLKO.1.



Legenda: A) WM793 pLKO.1 e WM793 shGal-3 em Tu0%. **B)** WM793 pLKO.1 e WM793 shGal-3 em Tu2%. **C)** 1205Lu pLKO.1 e 1205Lu shGal-3 em Tu0%. **D)** 1205Lu pLKO.1 e 1205Lu shGal-3 em Tu2%. Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *student*. Não foi observada uma diferença significativa entre as células controle e as silenciadas para Gal-3.

Figura 20 - Quantificação da migração de células silenciadas para Gal-3 e controle.

5.3.5 Invasão Tumoral

Esferóides compostos de células 1205Lu GFP e 1205Lu shGal-3, e células WM793 GFP e WM793 shGal-3, foram embebidas em Colágeno I e fotos foram registradas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 horas. A figura 21 mostra os esferóides embebidos em Colágeno I por 24 horas.

A quantificação da invasão em Colágeno I e a análise estatística mostrou que há uma diferença significativa no potencial de invasão entre as células controle e silenciadas para Gal-3, tanto em WM793 quanto para 1205Lu. Esta diferença é maior entre as células WM793 GFP e WM793 shGal-3 (Figura 22).



Legenda: Esferóides embebidos em Colágeno I. **A,B)** 1205u GFP. **C,D)** 1205Lu-shGal-3. **E,F)** WM793 GFP. **G,H)** WM793-shGal-3. Imagens adquiridas após 24 horas. Aumento 10X. O silenciamento de Gal-3 inibe a capacidade de invasão de células de melanoma WM793 e 1205Lu.

Figura 21 - Ensaio de invasão tumoral.



Legenda: Gráficos ilustrando a quantificação da invasão das células de melanoma em Colágeno I. Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *Student*. A perda da capacidade de invasão é estatisticamente significante.

Figura 22 - Diferença no potencial de invasão das células controles e as silenciadas para Gal-3.

5.3.6 Crescimento Tumoral em camundongos imunodeficientes

A capacidade tumorigênica de linhagens celulares pôde ser analisada pela capacidade destas células formarem tumores em camundongos. Assim, as células WM793 e 1205Lu, controle e shGal-3, foram injetadas em camundongos imunodeficientes (NOD/SCID) e o crescimento tumoral foi acompanhado.

A comparação dos valores de volume tumoral obtidos após aproximadamente 30 dias com os do dia 0 mostrou um crescimento tumoral significante para todas as linhagens celulares (p<0,001), com exceção das WM793 shGal-3 (p>0,05). As células WM793 shGal-3 demonstraram um crescimento extremamente reduzido quando comparado ao crescimento observado para as células controle WM793 pLKO.1 (p<0,01) (Figura 23A). Não foi observada diferença entre o crescimento de 1205Lu pLKO.1 e 1205Lu shGal-3 (p>0,05) (Figura 23B).



Legenda: Os gráficos (esquerda) ilustram o crescimento tumoral (mm³) medido durante aproximadamente 30 dias. **A)** WM793 pLKO.1 e shGal-3 (p<0,01). **B)** 1205Lu pLKO.1 e shGal-3 (p>0,05). As células pLKO.1 e shGal-3 foram injetadas, respectivamente, nos flancos esquerdo e direito dos camundongos (direita). Os resultados ilustram a média de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's, comparando os valores obtidos no último dia de medição para as células controle e shGal-3. A comparação destes valores com os do dia 0 mostrou um crescimento tumoral significante para todas as linhagens celulares (p<0,001), com exceção das WM793 shGal-3 (p>0,05). O silenciamento de Gal-3 em camundongos NOD/SCID diminui drasticamente o crescimento tumoral de WM793.

Figura 23 - Crescimento Tumoral das linhagens WM793 e 1205Lu silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID.

Para confirmar o resultado, o ensaio foi repetido com as linhagens WM983A e WM983B silenciadas para Gal-3. Novamente observou-se uma diferença significativa no crescimento tumoral apenas para a linhagem de melanoma de crescimento vertical, WM983A (p<0,05) (Figura 24).



Legenda: Os gráficos ilustram o crescimento tumoral (mm³) medido durante aproximadamente 35 dias. A) WM983A pLKO.1 e shGal-3 (p<0,05) ; B) WM983B pLKO.1 e shGal-3 (p>0,05). Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn's, comparando os valores obtidos no último dia de medição para as células controle e shGal-3. A comparação destes valores com os do dia 0 mostrou um crescimento tumoral significante para todas as linhagens celulares (p<0,001). O silenciamento de Gal-3 em camundongos NOD/SCID diminui o crescimento tumoral de WM983A.

Figura 24 - Crescimento Tumoral de linhagens WM983A e WM983B silenciadas para Gal-3 em camundongos NOD/SCID.

5.4 ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS REGULADOS PELA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE GALECTINA-3

5.4.1 Proteínas ligadas à p53 e ao mecanismo de apoptose

Para melhor entender o mecanismo envolvido no fenótipo observado para as células com depleção de Galectina-3, análises de expressão e fosforilação de proteínas importantes em certos processos celulares foram realizadas.

Sendo apoptose uma das funções melhores descritas para Galectina-3, foi investigado o perfil de algumas proteínas envolvidas neste tipo de morte celular programada. A figura 25 mostra que a ativação de AKT, medida pela fosforilação desta proteína na serina localizada na posição 473, é diminuída em células silenciadas para Gal-3 (Figura 25A). De acordo com este dado, a expressão de PTEN e p53 demonstra estar aumentada nas células shGal-3, tanto WM793 como 1205Lu (Figura 25A,B). Não foram observadas diferenças de expressão de HDM2 (Figura 25C). Expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAD, BAX), entretanto, encontram-se aumentadas apenas nas linhagens WM793 shGal-3 quando comparadas ao controle pLKO.1. As células 1205Lu shGal-3, porém, apresentam aumento de outra proteína pró-apoptótica, BIM (Figura 25D). Embora não haja diferença da expressão de Bcl-2 entre as células WM793 pLKO.1 e shGal-3, há um aumento da expressão desta proteína em células 1205Lu shGal-3 (Figura 25A).



Legenda: A expressão de determinadas proteínas foi analisada por *Western Blotting*. A expressão de β -actina foi utilizada como normalizadora. A inibição de Gal-3 altera a expressão de p53 e proteínas relacionadas à apoptose.

Figura 25 - Análise da expressão de proteínas relacionadas à p53 e ao mecanismo de apoptose em células silenciadas para Galectina-3.

5.4.2 Proteínas da via de p16/Rb

Outra via importante que poderia contribuir para o fenótipo observado nas células WM793 shGal-3 é a de p16/Rb. De fato, análise de expressão por *western blotting* revelou que a expressão de p16 é maior em células WM793 shGal-3 comparado ao controle (Figura 26A). Adicionalmente, diminuições na expressão de CDK4 e ciclina D1, assim como na fosforilação da proteína Rb foram observados nestas células (Figura 26B,C).



Legenda: A expressão de determinadas proteínas foi analisada por *Western Blotting.* A expressão de β -actina foi utilizada como normalizadora. A inibição de Gal-3 altera a expressão de proteínas importantes na via de p16/Rb.

Figura 26 - Análise da expressão de membros da via p16/Rb em células silenciadas para Galectina-3.

5.4.3 Proteínas da via Wnt/β–catenina

As análises da localização subcelular de Galectina-3 foram realizadas pela marcação destas células por imunofluorescência e análise por microscopia confocal.

Galectina-3 foi observada em diferentes compartimentos celulares dependendo do tipo celular. Melanócitos isolados à partir de prepúcio (FOM173) (Figura 27) e células de melanoma de crescimento radial (WM35) (Figura 28) apresentaram Gal-3 apenas no citoplasma. Células de melanoma de crescimento vertical (WM278, WM983A, WM793) (Figuras 29, 30) e metastáticas (WM1617, WM983B, 1205Lu) (Figuras 31, 32), por outro lado, apresentaram Gal-3 distribuída pelo citoplasma e núcleo.

β-catenina foi observada no citoplasma e núcleo de todas as células estudadas. É importante ressaltar que as células que não possuem Gal-3 nuclear como, por exemplo, FOM173 e WM35, mesmo assim apresentaram marcação nuclear de β-catenina (Figuras 27, 28). Este dado indica que, diferente do sugerido para células de câncer de mama (SHIMURA et al. 2004), β-catenina pode translocar para o núcleo de maneira independente de Gal-3.

Nas células silenciadas para Gal-3, é possível observar algumas células com marcação de β-catenina diminuída (Figuras 33, 34). Enquanto que nas células selvagem, a marcação forte de β-catenina no núcleo é praticamente unânime, algumas células silenciadas para Gal-3 apresentaram marcação mais intensa no núcleo em relação ao citoplasma.

Entretanto, não foi feita nenhuma quantificação de número de células marcadas ou intensidade para obter dados mais objetivos.

Mais uma vez, foi confirmado que a ausência de Galectina-3 não impede β-catenina de se localizar no núcleo, pelo menos nas células de melanoma utilizadas.



Legenda: Melanócitos foram marcados com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisados por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β -catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 100X. Melanócitos apresentam marcação citoplasmática para Gal-3 e nuclear e citoplasmática para β -catenina.

Figura 27 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β -catenina em melanócitos.



Legenda: Células WM35 foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β-catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. Células de melanoma de crescimento radial WM35 apresentam marcação para Gal-3 no citoplasma e para β-catenina no citoplasma e núcleo.

Figura 28 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de WM35.



Legenda: Células WM793 foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β-catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. Células de melanoma de crescimento vertical WM793 apresentam marcação para Gal-3 e β-catenina no citoplasma e núcleo.

Figura 29 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células WM793.



Legenda: As células (WM278 À esquerda e WM983A À direita) foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β-catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. Células de melanoma de crescimento vertical WM278 e WM983A apresentam marcação para Gal-3 e β-catenina no citoplasma e núcleo.

Figura 30 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células WM278 e WM983.



Legenda: Células 1205Lu foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β-catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. Células de melanoma metastático 1205Lu apresentam marcação para Gal-3 e β-catenina no citoplasma e núcleo. **Figura 31** - Localização Subcelular de Galectina-3 e β-catenina em células de 1205Lu.



Legenda: As células (WM1617 À esquerda e WM983B À direita) foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A, B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β -catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. Células de melanoma metastático WM1617 e WM983B apresentam marcação para Gal-3 e β -catenina no citoplasma e núcleo.

Figura 32 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β -catenina em células WM1617 e WM983B.



Legenda: Células WM793 shGal-3 foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β -catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. O silenciamento de Gal-3 diminui porem não impede a localização nuclear de β -catenina em células WM793.

Figura 33 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β -catenina em células de melanoma WM793 shGal-3.



Legenda: Células 1205Lu shGal-3 foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos e analisadas por microscopia confocal. **A,B)** Marcação de Galectina-3. **C,D)** Marcação de β -catenina. **E,F)** Sobreposição das duas imagens. Aumento 200X. O silenciamento de Gal-3 diminui porem não impede a localização nuclear de β -catenina em células 1205Lu.

Figura 34 - Localização Subcelular de Galectina-3 e β -catenina em células de melanoma 1205Lu shGal-3.

A análise da expressão de β -catenina, c-Jun e Ciclina D1 foi então analisada por *western blotting* e demonstrou que, em células WM793, há um aumento na expressão de β -catenina e uma diminuição na expressão de Cjun e Ciclina D1.



Legenda: A expressão de determinadas proteínas foi analisada por *Western Blotting.* A expressão de β -actina foi utilizada como normalizadora. A inibição de Gal-3 altera a expressão de β -catenina e proteínas alvo da via Wnt/ β -catenina.

Figura 35 - Análise da expressão de componentes da via Wnt/β -catenina em células silenciadas para Gal-3.

6 DISCUSSÃO

6.1 A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM MELANOMA

Os estudos de *cDNA Microarray* realizados previamente por nosso grupo mostraram que Galectina-3 é mais expressa em tumores primários quando comparado a metastáticos (MARTINS 2007) (Figura 9). Estes dados foram elegantemente validados por imunoistoquímica, utilizando uma plataforma de *Tissue Microarray* com amostras de melanoma cutâneos extensivos superficiais (DE SÁ 2005). De acordo com estes dados, a expressão citoplasmática de Galectina-3 correlaciona com o índice de Breslow, isto é, com o padrão invasivo da lesão. A mesma correlação não foi encontrada para a distribuição nuclear de Galectina-3 nas amostras de melanoma (MARTINS 2007) (Figura 10).

A fim de explorar a importância do padrão de expressão de Galectina-3 em melanoma, nosso objetivo foi iniciar um estudo funcional utilizando como modelo linhagens de células de melanoma de diferentes fases de progressão tumoral: melanoma de crescimento radial (RGP), melanoma de crescimento vertical (VGP), melanoma metastático.

Primeiramente, diversas linhagens foram analisadas quanto à expressão de Galectina-3. Em uma abordagem mais indireta, foi feito um levantamento dos níveis de expressão de Gal-3 no banco de dados de expressão em células de melanoma mantido pelo laboratório do Dr.

Meenhard Herlyn (Instituto Wistar). Entretanto, de acordo com estes dados, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNA mensageiro de Gal-3 em linhagens de melanoma de crescimento radial, de crescimento vertical e em linhagens metastáticas (Figura 11).

Embora este resultado não confirme os resultados do *cDNA Microarray* e do *Tissue Microarray*, a expressão protéica de Galectina-3 foi analisada por *western blotting*. Novamente, não foi observada uma correlação entre os níveis de expressão de Gal-3 e as fases de progressão do melanoma (Figura 12).

Linhagens celulares são geralmente estabelecidas à partir de tecidos procedentes de cirurgías de excisão ou biópsias. Assim, seria esperado que as análises de expressão de Gal-3 em linhagens de melanoma fossem similares às obtidas para amostras de melanoma. Entretanto, alguns estudos indicam que linhagens celulares nem sempre representam fielmente o tumor de onde são provenientes.

Inconsistências como, por exemplo, na freqüência de mutações, indicam que células em cultura por longos períodos de tempo podem perder parte das similaridades em relação aos tumores. Mutações em *p16/INK4a*, por exemplo, são encontradas em aproximadamente 36% de amostras de melanoma nunca submetidas à cultura. Por outro lado, p16 encontra-se mutado em cerca de 70% das linhagens de melanoma estabelecidas. Outros genes seguem o mesmo padrão, indicando que tal inconsistência pode ser explicada, em parte, pelo acúmulo de mutações em linhagens mantidas em cultura por períodos extensos (PIEPKORN 2000).

Células em cultura podem apresentrar diferenças em relação à célula quando no tecido original que pode não ser resultado de uma alteração genética. Melanócitos cultivados in vitro, por exemplo, perdem parte dos prolongamentos (observações pessoais) e expressam um padrão de moléculas de superfície característico de células de melanoma. Interessantemente, este padrão é revertido ao normal de melanócitos guando estes são cultivados em conjunto com gueratinócitos (VALYI-NAGY et al. 1993). Tal fato indica que diferenças observadas entre linhagens celulares e amostras tumorais podem também ser resultantes do fato dos sistemas in vitro, na sua maioria, não considerarem fatores estromais e do microambiente tumoral. Tais fatores são conhecidos por influenciar o fenótipo tumoral e vem cada vez mais sendo considerados nos estudos de melanoma e outros tumores.

Entretanto, os estudos com linhagens em cultura podem oferecer respostas importantes para o entendimento de uma característica ou mesmo de uma patologia e são ferramenta essencial de estudos funcionais que exploram a modulação de expressão gênica *in vitro*. Estes modelos, todavia, devem ser utilizados com cautela e fica clara a importância de complementar os estudos com experimentos que considerem os fatores do microambiente, como experimentos *in vivo* e análises de amostras de pacientes.

Os dados de MARTINS (2007) mostram a expressão diferencial significativa entre melanoams primários e metastáticos. Em adição, estes dados foram validados por imunoistoquímica em amostras de pacientes. A falta de consistência encontrada na expressão de Gal-3 em linhagens

85
tumorais nos levou a utilizar mais de uma linhagem de melanoma nos estudos subseqüentes a fim de evitar efeitos linhagem-específicos, isto é, que não representariam o melanoma no geral. Desta forma, além de serem escolhidas uma linhagem de crescimento vertical e uma metastática para os estudos funcionais, a maioria dos experimentos, incluindo o *in vivo*, foi repetida com outro par de linhagens.

Finalmente, vale à pena ressaltar que vários estudos apontam para a importância de Gal-3 em tumores não estar resumida à expressão gênica ou protéica, mas sim a localização subcelular de Gal-3 (VAN DEN BRULE et al. 2000; CALIFICE et al. 2004). Estes dados nos levaram a prosseguir com os estudos no intuito de elucidar a importância de Gal-3 em melanoma e contribuir para o entendimento das funções desta proteína nesta malignidade.

6.2 O EFEITO DA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 NO FENÓTIPO DE CÉLULAS DE MELANOMA

A fim de compreender a importância da relação dos níveis de expressão de Gal-3 com a progressão tumoral, um sistema de inibição de Gal-3 em células de melanoma foi desenvolvido utilizando a tecnologia de RNA de interferência (RNAi).

Para a entrega das seqüências de RNAi no interior das células, foram utilizados vetores lentivirais carregando seqüências shGal-3 (shRNA específico para Gal-3) ou as seqüências controle. A escolha de utilização de

lentivírus como vetor de entrega das seqüências shRNA na célula alvo se deu principalmente pela alta eficiência da transdução combinada a facilidade de inserção no genoma da célula alvo (PADDISON et al. 2002).

Assim, o estudo iniciou-se com cinco vetores, fornecidos pelo fabricante, carregando seqüências distintas de shGal-3. Primeiramente, as seqüências foram analisadas utilizando o programa BLASTn e observou-se que estas são específicas para a região codificante do gene Gal-3 (NM_002306.2) e de sua forma alternativa Galig (NR_003225.1). Desta forma, elimina-se a possibilidade da existência de efeitos *off-target*, isto é, efeitos resultantes de inibição de outros genes, em conjunto ou não com o gene alvo, que podem alterar as características da linhagem celular e assim, contribuir para a alteração fenotípica da célula.

Uma segunda preocupação na utilização de estratégias de shRNA, especialmente utilizando vetores lentivirais, é a capacidade de inserção não direcionada no genoma da célula alvo. Este tipo de inserção é, na verdade, tida como uma desvantagem da utilização de vetores lentivirais (PADDISON et al. 2002). A utilização de linhagens transduzidas com o vetor vazio como controle é de grande utilidade nestes sistemas, pois considera os efeitos que as linhagens podem sofrer quando modificadas com a inserção não direcionada de DNA exógeno em seu genoma. Desta forma, utilizou-se a linhagem celular transduzida com o vetor vazio (pLKO.1) como controle. Alguns experimentos foram, porém, repetidos com a linhagem selvagem. Como não foi observada nenhuma alteração entre as células selvagens e

pLKO.1, os experimentos foram padronizados com a utilização do controle com o vetor vazio (dados não mostrados).

As seqüências de shGal-3 foram testadas quanto à eficiência de inibição da proteína. Embora a análise da expressão de Gal-3 tenha sido realizada em diversas linhagens de melanoma, duas linhagens foram escolhidas para o prosseguimento do estudo: WM793 e 1205Lu. A escolha deste par se deu devido, principalmente, a origem comum das linhagens. A linhagem 1205Lu foi isolada a partir de uma metástase em pulmão gerada pela injeção de células WM793 em camundongos.

Ao final do estudo, alguns experimentos foram repetidos com outro par de linhagens: WM983A e WM983B. Estas duas linhagens são originárias do mesmo paciente, tendo a primeira sido isolada de um melanoma de crescimento vertical e a segunda isolada de uma metástase linfonodal.

Para todas as linhagens transduzidas com o vetor carregando a seqüência shGal-3 foi obtido um silenciamento eficiente de Gal-3. Como a inibição quase total foi obtida principalmente com o vetor contendo a seqüência sh4 (Figura 13), este vetor foi utilizado na maioria dos experimentos funcionais.

A escolha dos ensaios funcionais de cultura de células em monocamada, dos ensaios tridimensionais e do ensaio *in vivo* se deram considerando as principais características de malignidade que podem evidenciar diferenças entre células controle e silenciadas para Gal-3. Morfologia, proliferação, migração, invasão, capacidade de crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade em camundongos são características extremamente importantes em células tumorais.

6.2.1 Morfologia Celular

Como já demonstrado para linhagens de tumor de mama, o silenciamento de Gal-3 pode causar uma alteração notável na morfologia celular (HONJO et al. 2001). De acordo, observou-se uma clara diferença na morfologia das células WM793 shGal-3 em relação ao controle (Figura 14E-H). As células WM793 selvagens e transduzidas com o vetor vazio crescem na placa de uma maneira característica formando agrupamentos cercados de espaços vazios. Quando transduzidas com o vetor shGal-3, estas células perdem esta característica e passam a exibir um formato mais plano. Diferenças no tamanho das células, entretanto, não são evidentes. Interessantemente, não foi observada diferença entre as células 1205Lu controle e shGal-3 (Figura 14A-D).

Alguns trabalhos já demonstraram que a expressão de Galectina-3 contribui diretamente para a capacidade de adesão de células tumorais à componentes da matriz extracelular (OCHIENG et al. 2004). A capacidade de Gal-3 recrutar integrinas para a membrana plasmática, assim como a sua capacidade de interação com componentes da matriz extracelular (HUGHES 2001), pode contribuir para a alteração na morfologia das células WM793 shGal-3, principalmente no que se diz respeito ao espalhamento da célula sobre a placa. De fato, HONJO et al. (2001) demonstrou uma alteração no formato das células de câncer de mama similar ao observado neste trabalho.

Ensaios de adesão celular e a análise de expressão de integrinas podem oferecer respostas importantes de diferenças de adesão em células silenciadas para Gal-3.

6.2.2 Proliferação Celular

O ensaio de incorporação de MTT foi realizado para analisar a diferenças na proliferação celular *in vitro*. Entretanto, este tipo de ensaio não é especifico de proliferação celular, visto que o resultado é a indicação do número de células viáveis no momento da leitura da placa. Muitos trabalhos, todavia, utilizam a medição de incorporação de MTT em tempos diferentes a fim de inferir a proliferação celular.

Assim, o crescimento de células controle e shGal-3 foi avaliado durante 5 dias. Os resultados mostraram que o silenciamento de Gal-3 comprometeu o crescimento das células WM793, mas nenhum efeito foi observado para as células 1205Lu (Figura 15).

É importante ressaltar que, como MTT não é um ensaio específico de proliferação celular, não se sabe que fatores podem contribuir para esta diferença. Não se pode descartar a possibilidade da simples introdução de shGal-3 causar um estresse capaz de levar a morte celular. Como o ensaio de MTT não discrimina o que está influenciando o número de células viáveis, e levando em consideração a literatura indicando o papel anti-apoptótico de Gal-3 intracelular, não se pode afirmar inequivocamente que existe uma diferença de proliferação a partir deste tipo de ensaio. Outros experimentos, como por exemplo, de incorporação de Brdu (bromodioxiuridina), marcação

de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ou de Ki67, que são marcadores específicos de proliferação celular, seriam mais recomendados.

6.2.3 Crescimento independente de ancoragem

Diferenças de crescimento independente de ancoragem, analisadas pelo experimento de *Soft Agar,* ficaram evidentes apenas para as células WM793 (Figura 16A,B). As células WM793 shGal-3 formaram menos colônias, sendo estas de tamanho bem reduzido quando comparados ao controle (Figura 16C,D).

A habilidade de crescimento independente de ancoragem é uma característica restrita a células tumorais e um indicativo de malignidade muito utilizado na biologia de tumores. Este ensaio analisa a capacidade das células crescerem independentemente de estarem aderidas à um substrato.

O fato de não terem sido encontradas diferenças para as células 1205Lu shGal-3 indica que a inibição de Gal-3 nestas células não é suficiente para modificar este fenótipo. Vale destacar que o experimento foi repetido com as linhagens WM983A e WM983B e resultados similares foram obtidos (Figura 17).

Os dados apresentados neste trabalho, de fato, corroboram com dados já publicados. Já foi demonstrado que o silenciamento de Gal-3 diminui a habilidade de crescimento independente de ancoragem utilizando uma abordagem muito similar com células de tumor mamário (HONJO et al. 2001). Em adição, foi demonstrado que a distribuição citoplasmática de Gal-3 está associada com um aumento na formação de colônias, enquanto que Gal-3 nuclear diminui o número de colônias em Soft Agar. Neste trabalho, os autores ainda associaram a presença de Gal-3 citoplasmática à inibição de apoptose, e a distribuição nuclear à indução de apoptose (CALIFICE et al. 2004).

Baseado nestes resultados conclui-se que a ausência de Gal-3 dificulta o crescimento independente de ancoragem de células de melanoma de crescimento vertical. Entretanto, esta habilidade não é alterada em células de melanoma metastático.

6.2.4 Migração Celular

O único experimento que não mostrou diferença entre as células silenciadas para Gal-3 e as controle, tanto para WM793 quanto para 1205Lu, foi o ensaio de migração celular. A capacidade de migração destas células foi analisada utilizando o ensaio mais conhecido por "*scratch assay*", ou ensaio de cicatrização. Este ensaio mede a habilidade das células se moverem em direção a uma região vazia da placa de cultura. Esta região é criada artificialmente, removendo uma fileira de células da placa de cultura e gerando assim uma "cicatriz".

Não foram observadas diferenças significativas entre shGal-3 e controle para nenhuma das linhagens celulares (Figuras 18-20). O ensaio foi também realizado na ausência de soro, com o intuito de diminuir a velocidade de migração e assim aumentar a possibilidade de visualizar possíveis diferenças. Mais uma vez, não foram observadas diferenças significativas.

Uma das dificuldades encontradas durante a realização deste ensaio foi a movimentação desorganizada das células, tanto as WM793 quanto as 1205Lu. Esta característica dificultou a medição e foi necessário desconsiderar as células que migraram mais e chegaram ao meio da cicatriz rapidamente e assumir como parâmetro a camada de células que se moviam juntas. Assim, não se pode descartar a possibilidade de artefatos da técnica influenciarem a interpretação dos resultados. Outros ensaios de migração, porém, podem ser utilizados para analisar novamente este fenótipo, como por exemplo, ensaios de *Boyder-Chamber*, onde células são semeadas sobre uma membrana porosa e a capacidade de migração em direção ao meio mais rico em nutrientes é analisada.

É importante ressaltar que os trabalhos disponíveis na literatura que relatam a participação de Gal-3 na migração de células tumorais foram realizados sobre algum tipo de matriz como, por exemplo, *Matrigel* (LE MARER e HUGHES 1996; HITTELET et al. 2003). A propriedade de Gal-3 se ligar a diversos componentes da matriz pode ter contribuido para o aumento de motilidade celular observada nestes ensaios. No ensaio discrito neste trabalho, foi analisada a propriedade de Gal-3 contribuir para a migração de células de melanoma, independente da presença de compontentes da matriz. Entretanto, é possível que o enriquecimento da superfície da placa com compontentes de matriz altere o resultado aqui descrito.

6.2.5 Invasão Tumoral

O fenótipo invasivo de células tumorais é característico de estágios mais tardios da progressão do tumor, especialmente do melanoma. O ensaio de esferóides de células de melanoma embebidos em Colágeno I pode ser utilizado como um ensaio de invasão celular pois ele avalia a capacidade das células que compõem o esferóide de se moverem e invadirem colágeno ao seu redor.

Interessantemente, os experimentos demonstraram a perda da habilidade invasiva das células silenciadas para Gal-3, tanto WM793 quanto 1205Lu. Embora a diferença entre as células controle e silenciadas para Gal-3 seja significante para ambas as linhagens, a diferença é mais significativa para as células WM793 (Figuras 21,22).

Galectina-3 interage com diversos componentes da matriz extracelular e já foi reportado que Gal-3 aumenta a adesão à proteínas como Laminina, Fibronectina, Colágeno IV e Colágeno I (DUMIC et al. 2006; HUGHES 2001; FRIEDRICHS et al. 2007). Assim, a perda da habilidade de invasão das células em Colágeno I pode ser atribuída, pelo menos parcialmente, a perda da expressão de Gal-3 e conseqüentemente, diminuição da interação com componentes da matriz extracelular.

Em adição, células de melanoma mais invasivas expressam algumas proteases, em especial MMP2 e MMP9 (HOFMANN et al. 2000). Interessantemente, a forma solúvel de Gal-3, isto é, após secreção no meio extracelular, é clivada por estas metaloproteases, o que aumenta capacidade de ligação à Laminina (OCHIENG et al. 1998). Tal evento mais uma vez mostra como Gal-3 pode participar de eventos que promovem a invasão tumoral.

De fato, existem relatos na literatura que relacionam Gal-3 ao potencial invasivo e metastático de linhagens de carcinoma de mama (MATARRESE et al. 2000; SONG et al. 2002). Os dados apresentados aqui confirmam que o fenótipo também ocorre em células de melanoma.

Finalmente, os resultados do ensaio de invasão corroboram com os resultados de *Tissue Microarray* realizado por nosso grupo, que mostram que a expressão citoplasmática de Gal-3 aumenta com o padrão invasivo da lesão melanocítica (MARTINS 2007).

6.2.6 Crescimento Tumoral em camundongos imunodeficientes

Finalmente, foi realizado um experimento em camundongos para confirmar os dados obtidos *in vitro*. O ensaio *in vivo* é um dos mais importantes experimentos de um trabalho funcional, pois confirma a validade dos dados em um modelo mais próximo ao real. O crescimento de tumores em camundongos é, por exemplo, influenciado por fatores do microambiente e células estromais, ausente na maioria dos experimentos *in vitro*.

Foram utilizados camundongos NOD/SCID, caracterizados por possuírem um sistema imune extremamente comprometido. Estes camundongos não possuem linfócitos T e B, apresentam comprometimento de função de macrófagos e um nível menor de células citotóxicas naturais (SHULTZ et al. 1995, LAPIDOT et al. 1997). Neste caso, é importante salientar que alguns estudos sugerem a participação de Gal-3 na resposta imune tumoral. Camundongos deficientes para Gal-3, por exemplo, apresentam insuficiência nas respostas inflamatórias em modelos de inflamação peritonial e das vias aéreas. Gal-3 pode ainda induzir a ativação de várias células do sistema imune, além de atrair monócitos e macrófagos. Por outro lado, Gal-3 pode induzir apoptose de linfócitos infiltrantes (NAKAHARA et al. 2005; ZUBIETA et al. 2006). Desta forma, considerando as restrições do modelo, o ensaio *in vivo* pode contribuir para a avaliação da tumorigenicidade de células de melanoma silenciadas para Gal-3 independente de fatores do sistema imune.

Células de melanoma, pLKO.1 e shGal-3, foram injetadas subcutâneamente nos flancos esquerdo e direito, respectivamente, dos camundongos. Os resultados mostraram o efeito do silenciamento de Gal-3 nas células WM793; O tumor gerado por estas células praticamente não cresceu. Entretanto, os tumores gerados por injeções de células 1205Lu pLKO.1 e shGal-3 cresceram exponencialmente, sem diferenças significativas (Figura 23).

Para confirmar que os resultados obtidos não foram linhagemespecíficos, o experimento *in vivo* foi repetido com outro par de linhagens, WM983A e WM983B. Mais uma vez confirmou-se a influência do silenciamento de Gal-3 apenas para células de melanoma de crescimento vertical (Figura 24). O fato de os dados obtidos com um par de linhagens serem confirmado em outro par independente valida a importância de Gal-3, especialmente em linhagens de crescimento vertical.

Desta forma, podemos concluir que a ausência de Gal-3 altera o crescimento tumoral de células de melanoma de crescimento vertical na ausência de um sistema imune funcional. O crescimento de tumores derivados de linhagens metastáticas não é afetado pela ausência de Gal-3.

6.3 INDÍCIOS DE MECANISMOS POSSIVELMENTE IMPLICADOS NO FENÓTIPO OBSERVADO

Devido à diversidade funcional de Gal-3, são diversos os mecanismos que podem estar envolvidos no fenótipo menos maligno ocasionado pela inibição deste gene. No caso de células de melanoma de crescimento vertical e metastático, a busca por um mecanismo se torna ainda mais laborioso pelo fato de Gal-3 não estar restrita somente a um compartimento celular.

Neste trabalho, foram realizados estudos preliminares no intuito de elucidar alguns mecanismos potencialmente envolvidos na perda de malignidade de células de melanoma de crescimento vertical quando silenciadas para Galectina-3.

Primeiramente, vale a pena discutir algumas das características genômicas das células utilizadas neste trabalho. Todos os ensaios funcionais foram realizados no laboratório do Dr. Meenhard Herlyn. A maioria das linhagens celulares pertencentes ao laboratório foi anteriormente analisada quanto à presença de mutações gênicas, assim como ganhos ou perdas de regiões do genoma (dados não publicados). O quadro abaixo

ilustra, de forma resumida, as principais alterações presentes nas células utilizadas neste trabalho.

	BRAF	NRAS	МҮС	TP53	CDKN2A	CDK4	PTEN
WM793	V600E*	wt	wt	P72R	Hemi-del	K22Q	Hemi-del
1205Lu	V600E	wt	wt	P72R	Homo-del	K22Q	Hemi-del / W274X
WM983A	V600E	wt	wt	P72R	Hemi-del	wt	wt
WM983B	V600E	wt	wt	P278L	Hemi-del	wt	Wt

Quadro 3 - Descrição das mutações dos genes *BRAF*, *NRAS*, *MYC*, *TP53*, *CDK4* e *PTEN* em linhagens de melanoma.

*V600E: Substituição de Valina por Ácido Glutâmico na posição 600 da proteína B-Raf. wt: selvagem; P72R: Substituição de Prolina por Arginina na posição 72 da proteína p53. Homo-del: Homozigoto para a deleção; Hemi-del: Heterozigoto para a deleção; K22Q: Substituição de Lisina por Glutamina na posição 22 da proteína CDK4. W274X: Substituição de Valina por Ácido Glutâmico na posição 600 da proteína PTEN.

6.3.1 Alterações de p53 e proteínas relacionadas à apoptose

A proteína p53 é um fator de transcrição que, em condições normais, é constantemente degradado. Entretanto, diversos sinais de estresse celular, como a ativação de oncogenes, danos no DNA e hipóxia, são capazes de estabilizar p53 através da indução da expressão de ARF/p14. ARF (*Alternative Reading Frame*) se liga ao fator HDM2 (*Human Double Minute* 2), impedindo que este se ligue a p53 e direcione-o para a degradação dependente de ubiquitina. Com o aumento da expressão de ARF, a degradação de p53 mediada por HDM2 é bloqueada e a atividade transcricional de p53 é consequentemente aumentada. Uma vez no núcleo, p53 ativa a transcrição de genes envolvidos, por exemplo, na inibição do ciclo celular e indução da apoptose (CZAJKOWSKI et al. 2002).

A inibição do ciclo celular em resposta a ativação de p53 ocorre principalmente pela indução de p21. A ligação de p21 ao complexo CiclinaE/CDK2 impede a fosforilação de Rb (proteína associada ao Retinoblastoma) e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular. A forma hipofosforilada de Rb mantém-se complexada ao fator de transcrição E2F, impedindo este de induzir a expressão de genes importantes na progressão do ciclo celular (CZAJKOWSKI et al. 2002) (Figura 36).

A falha no reparo do DNA pode induzir a expressão de fatores próapoptóticos que vão participar de processos que culminam com a permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c. A ligação de citocromo com a molécula adaptadora APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) induz a formação do apoptossomo (composto por APAF-1, citocromo c, dATP, pró-caspase 9). A ativação auto-catalítica de caspase 9 leva então a ativação da cascata de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) que promove a morte celular por apoptose (HUSSEIN et al. 2003) (Figura 6).

A família das proteínas Bcl-2 é composta de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Os fatores pró-apoptóticos se dividem em dois grupos: o grupo das proteínas similares a BAX (*BAX-like*), que incluem BAX e BAK, e o grupo das proteínas BH3-*only*, que incluem as proteínas BAD, BIM, BID, PUMA e NOXA. As proteínas BH3-*only* são essenciais para a iniciação da resposta pró-apoptótica, enquanto que as proteínas BAX e BAK são

fundamentais mais tardiamente no processo de permeabilização da membrana mitocondrial (LABI et al. 2006).

Dentre as proteínas que protegem a célula dos mecanismos de morte celular destaca-se Bcl-2 principalmente por controlar a permeabilização da membrana mitocondrial. A interação de Bcl-2 e BAX, por exemplo, impede a função apoptótica deste último (YIN et al. 1994).

Desta forma, podemos assumir que a sobrevivência ou não da célula após ser submetida à um estresse capaz de ativar p53 vai depender, primeiramente, da capacidade de reparo do DNA. Caso o erro no DNA persista, o destino da célula depende do balanço entre as proteínas anti e pró-apoptóticas capazes de reagir ao estímulo e iniciar o processo de morte celular programada. A alteração deste balanço é comumente chamada de *"Apoptotic Switch"*.

Alguns destes fatores pró-apoptóticos são ativados diretamente por p53 através da indução da transcrição, como BAX, NOXA e PUMA (HUSSEIN et al. 2003; HENRY et al. 2002). BAD, por outro lado, é regulado negativamente pela via de PI3K/AKT, freqüentemente ativada em tumores devido a perda de *PTEN* ou pela perda de seu regulador transcricional, p53 (LABI et al. 2006).

Mutações em *TP53* são comuns em aproximadamente 50% dos tumores sólidos. Em melanoma estas mutações são raras, tanto em tumores primários quanto metastáticos (revisad em CHIN et al. 2006). Entretanto, mutações em *HDM2* e *ARF/p14* contribuem indiretamente para a inativação de p53 em células de melanoma (MUTHUSAMY et al. 2006). Em adição,

alguns estudos mostraram que a inibição da expressão de p53, acoplada a ativação da via de MAPK são suficientes para a transformação de células melanocíticas (PATTON et al. 2005; BARDEESY et al. 2001; YU et al. 2008).

Além de mutações que levam a inativação de p53, alguns polimorfismos que conferem a proteína um ganho de função em relação à forma selvagem já foram identificados. O primeiro SNP (*single nucleotide polymorphism*) descrito para *TP53* (HARRIS et al. 1986) resulta na substituição do aminoácido prolina por arginina no códon 72 da proteína (P72R). A forma variante P72R apresenta um maior potencial pró-apoptótico em relação à forma selvagem, ou seja, resulta em um ganho de função da proteína p53 (DUMONT et al. 2003; BERGAMASCHI et al. 2006).

Neste trabalho, foi observado que silenciamento de Gal-3 em células de melanoma, tanto metastáticas quanto de crescimento vertical, leva ao aumento de p53 e de PTEN e à diminuição na fosforilação de AKT (Figura 25A,B). Como resultado, observa-se o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas. Enquanto BIM é aumentada em ambas as linhagens, BAD, BAX são reguladas positivamente apenas na linhagem WM793 shGal-3 (Figura 25D). Interessantemente, embora a expressão de Bcl-2 seja estável nas células WM793 shGal-3, há um aumento desta proteína anti-apoptótica nas células 1205Lu shGal-3 (Figura 25A).

De fato, alguns estudos indicam a correlação entre a ativação de AKT e a expressão de Gal-3, contribuindo assim para o fenótipo resistente à estímulos apoptóticos de células tumorais (OKA et al. 2005; MAZUREK et al. 2007). Em contrapartida, LEE et al. (2003) demonstraram que Gal-3 em

células de tumor de mama promove apoptose, em parte pela inibição de AKT.

A presença de uma região de ligação à p53 no promotor de Gal-3 já foi identificado e tal evento leva a inibição da expressão de Gal-3 (RAIMOND et al. 1995; GAUDIN et al. 1997). A fosforilação de p53 pela quinase HIPK2 também pode inibir a transcrição de Gal-3, culminando com a ativação da via de apoptose dependente de p53 (CECCHINELLI et al. 2006) (Figura 6). Contudo, a regulação da expressão de p53 por Gal-3 nunca foi descrita.

As linhagens WM793 e 1205Lu possuem o polimorfismo P72R no gene p53, que resulta em um ganho de função pró-apoptótica desta proteína (DUMONT et al. 2003; BERGAMASCHI et al. 2006). Tal fato pode ter contribuído para as diferenças observadas em alguns experimentos, como o *in vivo*, entre o par de células WM793 e 1205Lu e o par WM983A e WM983B, e chama a atenção para a variabilidade genética entre as linhagens disponíveis para cultura de células.

Assim, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a inibição de Gal-3 em células de melanoma resulta na ativação de mecanismos supressores de tumor, envolvendo a expressão de p53 e inativação da via PI3K/AKT. A ativação de p53 leva ao aumento de proteínas pró-apoptóticas, principalmente nas células de melanoma de crescimento vertical WM793. A inabilidade das células 1205Lu em ativar os mesmos genes ativados nas células WM793 (BAD e BAX) mas manter a expressão aumentada de BIM, em conjunto com o aumento de Bcl-2 é consistente com

os resultados funcionais, que mostram que esta linhagem metastática não é influenciada da mesma maneira que células WM793.

Alguns experimentos preliminares foram realizados para analisar se a inibição de Gal-3 induzia um aumento real na apoptose das células em cultura. Para tal, as células controle e inibidas para Gal-3 foram tratadas com o agente quimioterápico Cisplatina e a quantidade de células em apoptose foi medida pela marcação de Anexina V e medição do potencial de embrana mitocondrial (dados não mostrados). Os resultados indicaram um aumento na taxa de apoptose das células WM793 silenciadas para Galectina-3. Entretanto, estes dados são preliminares e precisam ainda ser repetidos e confirmados.



Legenda: Fatores ambientais que induzam estresse celular podem levar a ativação de genes supressores de tumor, como p16, p21 e p53, que controlam a progressão do ciclo celular através do controle da fosforilação de Rb. **Figura 36** – Regulação do Ciclo Celular.

6.3.2 Alterações da via de p16/Rb

O gene *p16* é um gene supressor de tumor que regula o controle do ciclo celular principalmente na progressão das fases G0/G1 para a fase de replicação do DNA (S). A função desta proteína é principalmente inibir a ativação das ciclinas dependente de quinases CDK4 e CDK6, responsáveis pela fosforilação da proteína Rb. Uma vez fosforilada, Rb não interage mais com o fator de transcrição E2F, que vai então regular a expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular. Assim, a ausência de p16 pode

levar a hiperfosforilação de Rb e, conseqüentemente, a proliferação celular descontrolada (PIEPKORN 2000) (Figura 36).

Células tumorais desenvolvem mecanismos para inibir a expressão de *p16*, seja por deleções ou por metilação do seu promotor. Células de melanoma raramente expressam a proteína p16. Mutações, especialmente deleções, são mais freqüentes em melanoma familiar, embora haja relatos de deleções deste lócus gênico (*CDKN2A*) em tumores esporádicos (CURTIN et al. 2006). Linhagens celulares apresentam uma freqüência maior de deleções deste gene, chegando a 70% (PIEPKORN 2000).

A repressão da transcrição de *p16* por metilação ocorre em aproximadamente 90% dos cânceres. Em melanoma, 10% das células que possuem pelo menos um dos alelos intactos apresentam metilação do promotor de *p16* (GONZALES-ZULUETA et al. 1995).

Embora em que momento a inativação de p16 ocorre durante o desenvolvimento e progressão do melanoma não seja conhecido, diversos estudos mostram a perda da expressão de p16 com a progressão do tumor (REED et al. 1995; GROVER et al. 1998; SPARROW et al. 1998; KELLER-MELCHIOR et al. 1998). Interessantemente, nevos, lesões benignas que podem dar origem ao melanoma, apresentam expressão elevada de p16 acompanhada de fenótipo de senescência celular (MICHALOGLOU et al. 2005).

Mutações em *CDK4* também já foram relatadas em melanoma. As mutações nos códons 22 ou 24 do gene de *CDK4* resultam na inabilidade de ligação à p16. Entretanto, não existem relatos de mutações em *CDK6* e

mutações no gene *RB1*, que codifica a proteína Rb, são muito raras (BARTKOVA et al. 1996).

Em condições normais, células WM793 e 1205Lu não expressam p16. Entretanto, o silenciamento de Gal-3 induz a expressão de p16 apenas na linhagem WM793 (Figura 26A). De acordo, a expressão de CDK4 e Ciclina D1 é diminuída nas células WM793 shGal-3, e observa-se ainda uma diminuição na fosforilação da proteína Rb (Figura 26B,C). Embora o mesmo não seja observado para as células 1205Lu, dados de CGH (*Comparative Genome Hybridization*), realizados no laboratório do Dr. Meenhard Herlyn, indicam que os dois alelos deste gene estão deletados nas células 1205Lu, enquanto que WM793 seria heterozigota para esta deleção (Quadro 3).

A linhagem 1205Lu, por não possuir o gene p16, dificulta a interpretação completa da importância da expressão de p16 controlada por Gal-3 em melanoma, demonstrando que o par de linhagens 1205Lu/WM793 não é o melhor modelo para estudar esta característica. Entretanto, vale destacar que as linhagens WM983A e WM983B são heterozigotas para a deleção de p16 e, mesmo assim, o silenciamento de Gal-3 na linhagem WM983A diminui a malignidade desta célula. Tal fato indica que não somente um mecanismo estaria envolvido na malignidade, mas uma combinação de alterações é necessária para causar mudanças fenotípicas observáveis.

Como descrito no quadro 3, as células WM793 e 1205Lu apresentam uma mutação no códon 22 de *CDK4*, que impediria a inibição por p16. Entretanto, não foram observadas mutações no gene *CDK6* e outras quinases dependentes de ciclina que poderiam contribuir para a fosforilação de Rb.

Com estes resultados, pode-se especular que a inibição de Gal-3 em células de melanoma regula positivamente a expressão de p16 e conseqüentemente, outros genes implicados na progressão do ciclo celular. Tal alteração pode levar a ativação de mecanismos supressores de tumor que contribuem para o bloqueio da progressão do ciclo celular.

Células que não possuem nenhum dos alelos do gene p16, como por exemplo, 1205Lu, não estão sujeitas a este mecanismo, restrito as células que possuem o gene p16 funcional. De fato, vale lembrar que as células WM983A e WM983B são heterozigotas para a deleção de p16 e não possuem mutações no gene *CDK4*. Esta e outras diferenças no genoma de linhagens tumorais podem explicar as variações encontradas nos resultado de alguns ensaios e reforçar a importância da utilização de mais de uma linhagem tumoral em estudos funcionais.

Experimentos preliminares sugerem o bloqueio da progressão do ciclo celular em células WM793 shGal-3 (dados não mostrados). Estes experimentos foram realizados pela marcação do DNA com iodeto de propídeo seguido por citometria de fluxo e mostraram principalmente um aumento de células na fase G0/G1 e diminuição na fase S. Entretanto, o experimento foi realizado apenas uma vez e, desta forma, estes dados ainda precisam ser confirmados.

6.3.3 Alterações da via de Wnt/β-catenina

Estudos recentes apontam para a participação de Gal-3 na via Wnt/ β catenina (Figura 7). Foi demonstrado que Gal-3 interage com β -catenina e que esta interação é inibida pela presença de carboidratos, sugerindo que a mudança conformacional de Gal-3 pela ligação a carboidratos influencie a formação do complexo Gal-3/ β -catenina. Devido à ausência de β -catenina nuclear em células silenciadas para Gal-3, os autores ainda sugeriram que Gal-3 seria responsável pela translocação de β -catenina para este compartimento celular (SHIMURA et al. 2004). Entretanto ambas as proteínas não possuem sinais de localização nuclear.

O mapeamento da região de interação entre Gal-3 e β -catenina demonstrou que a extremidade carboxi-terminal de Gal-3 interage com a amino-terminal de β -catenina, na mesma região de interação com α -catenina. Baseado nestes dados, os autores sugeriram que haveria uma competição entre Gal-3 e α -catenina, que poderia levar ao deslocamento de β -catenina da membrana plasmática (SHIMURA et al. 2004).

Em um estudo subseqüente, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que Gal-3 interage com Axina e que pode ser fosforilada por GSK3- β. Os estudos foram realizados em linhagens de câncer de cólon e mama e indicam uma possível participação de Gal-3 na via Wnt (SHIMURA et al. 2005).

Em adição, foi demonstrado que Gal-3 interage com TCF-4, ativando a transcrição de genes como *CCND1* e *MYC* (SHIMURA et al. 2005). A contribuição de Gal-3 para o aumento da expressão de Ciclina D1 pode também ser direta, pela indução da atividade do promotor do gene (LIN et al. 2002).

Mais recentemente, foi observado que o tratamento de células de câncer coloretal com siRNA para Gal-3 desestabiliza β-catenina, causando como conseqüência uma diminuição na atividade TCF-dependente e na expressão de Ciclina D1. Um efeito maior na ativação da via Wnt/β-catenina foi obtido pela inibição concomitante de Wnt2a, indicando uma possível sinergia entre estas duas proteínas na ativação da via (SHI et al. 2007).

Um estudo imunoistoquímico em carcinoma de tiróide demonstrou que a expressão citoplasmática e nuclear de Gal-3 se correlaciona com a alta expressão de β -catenina e Ciclina D1 neste tipo de lesão tumoral. A mesma correlação não foi encontrada em lesões com localização de β -catenina na membrana plasmática, sugerindo a relação entre a presença de Gal-3 e a ativação da via Wnt (WEINBERGER et al. 2007).

Baseado nestes achados, e no fato de a relação entre Gal-3 e a via Wnt não ter sido estudada em melanoma, a expressão de β -catenina foi analisada em células de melanoma de diversas fases de progressão tumoral e em células silenciadas para Gal-3. O principal objetivo destes ensaios foi observar se a presença de Gal-3 seria essencial para a localização nuclear de β -catenina.

Foi observado que, em células de melanoma de crescimento radial (WM35) e em melanócitos (FOM173), β-catenina encontra-se distribuída pelo citoplasma e núcleo. Entretanto, a distribuição de Gal-3 nestas células se restringe ao citoplasma (Figuras 27, 28). Nas células WM793, 1205Lu,

WM983A, WM983B, WM278, WM1617, representantes de melanoma de crescimento vertical e metástases, Gal-3 e β-catenina colocalizam no citoplasma e no núcleo (Figuras 29-32).

Como células de melanoma de crescimento radial mantêm a localização nuclear de β -catenina mesmo sem a presença de Gal-3, pode-se inferir que a presença de Gal-3 não é essencial para a translocação de β -catenina para o núcleo. O resultado foi confirmado ao analisar as células silenciadas para Gal-3 (WM793 shGal-3 e 1205Lu shGal-3). Nestas células, a expressão nuclear de β -catenina diminuiu na maioria das células. Algumas células, entretanto, mantiveram a expressão nuclear forte de β -catenina (Figuras 33, 34). A diminuição da expressão nuclear de Gal-3, embora parcial, indica que, a presença de Gal-3 não é essencial, mas pode contribuir para a retenção nuclear de β -catenina em células de melanoma.

A expressão de β -catenina, Ciclina D1, c-jun foi então analisada por *western blotting*. A expressão de β -catenina aumenta levemente, juntamente com uma pequena diminuição da expressão de Ciclina D1 e c-jun em células WM793 (Figura 35).

O aumento de β -catenina total nas células WM793 não necessariamente indica a ativação da Via Wnt. Quando β -catenina se encontra livre no citoplasma, e na ausência de sinais via Wnt, ela é complexada às proteínas APC, Axina e β -TrCP, fosforilada por GSK3- β e degradada. Quando a via *Wnt* está ativada, a fosforilação de β -catenina é inibida, promovendo sua estabilidade no citoplasma. Assim, ela pode migrar para o núcleo e participar de regulação de transcrição via TCF. Dentre os

alvos desta via, na tumorigênese destacam-se c-myc, ciclina-D1 e PPARδ, matrilisina, c-jun e fra1 (WEERARATNA 2005) (Figura 7).

Estudos anteriores demonstraram que Gal-3 é capaz de se ligar a β -catenina, competindo assim com α -catenina (SHIMURA et al. 2005). Desta forma, a perda de expressão de Gal-3 permitiria uma maior estabilidade de β -catenina da membrana plasmática. De fato, os experimentos de imunofluorescência mostraram que a perda de Gal-3 leva a uma diminuição de β -catenina nuclear. Estes dados são consistentes com a diminuição de c-jun e Ciclina D1, alvos chave da via Wnt/ β -catenina nas células WM793.

Em conclusão, os resultados apresentados neste trabalho indicam que alterações na via Wnt/β–catenina causadas pelo silenciamento de Galectina-3 contribuem para a alteração do fenótipo maligno das células de melanoma de crescimento vertical. Estudos que busquem entender mais profundamente o papel das alterações nesta podem contribuir enormemente para o entendimento da função (ou das funções) celulares de Galectina-3 em melanoma.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que Gal-3 contribui para o fenótipo maligno de células de melanoma de crescimento vertical. Células metastáticas, porém, são pouco influenciadas pelo silenciamento de Gal-3.

Na ausência de Gal-3, células de melanoma de crescimento vertical alteram sua morfologia, crescem mais devagar em cultura, diminuem sua habilidade de crescimento independente de ancoragem, tornam-se menos invasivas e menos tumorigênicas em camundongos imunodeficientes.

Estas células são marcadas por um aumento na expressão de proteínas como p16, p53, BAD e BAX, implicadas em importantes mecanismos supressores de tumor. Em adição, o silenciamento de Gal-3 parece influenciar a localização e expressão de β -catenina, e conseqüentemente, alterar a expressão de proteínas alvo da via Wnt/ β -catenina.

Os mecanismos responsáveis por estas mudanças no fenótipo de células de melanoma de crescimento vertical e não de células metastáticas fica ainda em aberto. A ausência de p16 pode certamente contribuir para o mecanismo responsável pela ausência de fenótipo nas células 1205Lu. Da mesma maneira, a ausência do aumento da expressão de proteínas próapoptóticas como BAD e BAX combinado com um aumento de Bcl-2 nas células 1205Lu deve contribuir para as diferenças observadas entre WM793 e 1205Lu. Entretanto, algumas alterações bioquímicas também ocorrem em células 1205Lu, como o aumento de p53, PTEN, a diminuição da ativação de AKT e a diminuição na localização nuclear de β–catenina.

Em melanoma, células metastáticas são originárias de células de melanoma de crescimento vertical que adquirem novas alterações genéticas e epigenéticas tornando-as mais agressivas, capazes de invadir vasos, se alojar em outros órgãos e formar novos focos tumorais. Nesta situação, a inibição de apenas um gene, ou em alguns casos mesmo de uma via inteira, pode não ser suficiente para bloquear a tumorigenicidade celular. Tal explicação valida os dados apresentados neste trabalho, onde um fenótipo menos tumorigênico foi encontrado apenas em células de crescimento vertical submetidas ao silenciamento de Gal-3. Células metastáticas apresentaram poucas modificações, tanto funcionais quanto bioquímicas, após o silenciamento de Gal-3.

Adicionalmente, linhagens celulares em cultura por muitos anos possuem outros mecanismos de escape, possivelmente por um acúmulo ainda maior de alterações genéticas e epigenéticas, que lhes confiram tantas características favorecendo o comportamento tumoral que maiores mudanças sejam necessárias para observar um efeito biológico. Outra possibilidade, não menos importante, é que essas mudanças sejam refletidas apenas quando fatores do microambiente sejam considerados. Entretanto, estudos adicionais que visem elucidar mecanismos responsáveis pelo fenótipo destas células podem proporcionar respostas importantes.

A modulação da expressão de alguns genes que mostraram alteração de expressão nas células silenciadas para Gal-3 pode contribuir com

respostas chaves sobre qual via seria importante que, quando alterada, devolva o fenótipo maligno às células WM793. O silenciamento de p16 nas células WM793 shGal-3, por exemplo, pode trazer respostas importantes sobre a contribuição da via de p16/Rb e a progressão do ciclo celular. Da mesma forma, a inibição de p53 ou β -catenina nas células WM793 shGal-3 e 1205Lu shGal-3 pode fornecer informações fundamentais sobre a contribuição da apoptose e da via Wnt/ β -catenina, respectivamente, no fenótipo maligno de células de melanoma.

8 CONCLUSÕES

- O silenciamento de Galectina-3 influencia o crescimento celular in vitro de células de melanoma de crescimento vertical;
- Células WM793 apresentam morfologia alterada após silenciamento da expressão de Galectina-3;
- O silenciamento de Galectina-3 afeta as propriedades de crescimento independente de ancoragem de células de melanoma de crescimento vertical;
- A ausência de Galectina-3 diminui a habilidade de invasão em matriz de Colágeno I principalmente das células WM793, mas também das células 1205Lu.
- A tumorigenicidade de células de melanoma de crescimento vertical silenciadas para Galectina-3 é drasticamente diminuída em camundongos NOD/SCID;
- A inibição da expressão de Galectina-3 resulta no aumento da expressão da proteína p16, e diminuição da expressão de CDK4 e Ciclina D1 e da fosforilação da proteína Rb apenas nas células de crescimento vertical.
- A inibição de Galectina-3 ocasiona uma diminuição da fosforilação de AKT e um aumento da expressão da proteína p53 nas células de WM793 e 1205Lu;

- Os fatores pró-apoptóticos BAD e BAX são regulados positivamente em células WM793 silenciadas para Gal-3. Entretanto, a proteína BIM é aumentada tanto em WM793 quanto em 1205Lu silenciadas para Gal-3;
- A proteína anti-apoptótica Bcl-2 é aumentada apenas nas células 1205Lu silenciadas para Gal-3;
- A localização subcelular de Galectina-3 em células de melanoma varia de acordo com as fases de progressão do tumor: melanócitos e células de melanoma de crescimento radial não possuem Galectina-3 nuclear; Células de melanoma de crescimento vertical e células metastáticas apresentam Galectina-3 distribuída pelo citoplasma e núcleo.
- β-catenina se distribui pelo citoplasma e núcleo de todas as células de melanoma.
- O silenciamento de Galectina-3 nas linhagens de melanoma diminui parcialmente a presença de β-catenina nuclear.
- As células de crescimento radial e melanócitos apresentam Gal-3 apenas no citoplasma mas mantém a localização nuclear de β–catenina, indicando que localização de β-catenina não é totalmente dependente da distribuição de Gal-3.
- Células WM793 sienciadas para Gal-3 apresentam um aumento de βcatenina total e diminuição da expressão de Ciclina D1 e c-jun, indicando alteração da via Wnt/β-catenina.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A.Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res** 1997; 57:5272-6.

Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. **Mol Cell Biol** 2001; 21:2144-53.

Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. **Cancer Res** 1996; 56:5475-83.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. Int J_Cancer. 1987; 39(3):414-8.

Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. **Nat Genet** 2006; 38:1133-41.

Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, Elenitsas R, Herlyn M. Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. **Am J Pathol** 2001; 158:943-53.

Berking C, Takemoto R, Satyamoorthy K, et al. Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. **Cancer Res** 2004; 64:807-11.

Bissel M. **Soft Agar Assay for Colony Formation**. Disponíbvel em: http://www.lbl.gov/lifesciences/BissellLab/labprotocols/softagar.htm>.2007. [2007 abril 07].

Buchschacher GL Jr, Wong-Staal F.Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. **Blood** 2000; 95:2499-504.

Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brûle F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene** 2004; 23:7527-36.

Castronovo V, Van Den Brûle FA, Jackers P, et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. **J Pathol** 1996; 179:43-8.

Cecchinelli B, Lavra L, Rinaldo C, et al. Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interacting protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. **Mol Cell Biol** 2006; 26:4746-57.

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes Dev** 2006; 20:2149-82.

Chu DH, Haake AR, Holbrook K, Loomis CA. The structure and development of skin. In: Freedberg IM, Elsen AZ, Woff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editores. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw Hill; 2003. p.58-88.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 15:1147-65. Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel RS. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:6028-32.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:4340-6.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med** 2005; 353:2135-47.

Czajkowski R, Drewa T, Woźniak A, Krzyzyńska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. Int J Dermatol 2002; 41:550-6.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

de Sá BCS. Criação de tissue array de melanomas cutâneos extensivos superficiais para estudo imunoistoquímico de fatores ligados à proliferação e apoptose celular. São Paulo; 2005. [Dissertação-Mestrado - Fundação Antonio Prudente].

Deveci M, Gilmont RR, Terashi H, Ahmed AH, Smith DJ, Marcelo C. Melanocyte-conditioned medium stimulates while melanocyte/keratinocyte contact inhibits keratinocyte proliferation. **J Burn Care Rehabil** 2001; 22:9-14.

Dong S, Hughes RC. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). **Glycoconj J** 1997; 14:267-74.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **J Virol** 1998; 72:8463-71.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim Biophys Acta** 2006; 1760:616-35.

Dumic J, Lauc G, Flögel M. Expression of galectin-3 in cells exposed to stress-roles of jun and NF-kappaB. **Cell Physiol Biochem** 2000; 10:149-58. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet** 2003; 33:357-65.

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **J Biol Chem** 2004; 279:34922-30.

Friedrichs J, Torkko JM, Helenius J, et al. Contributions of galectin-3 and -9 to epithelial cell adhesion analyzed by single cell force spectroscopy. **J Biol Chem** 2007; 282:29375-83.

Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, et al. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Res** 2004; 64:3376-9.

Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res** 2003; 63:8302-11.

Gaudin JC, Arar C, Monsigny M, Legrand A. Modulation of the expression of the rabbit galectin-3 gene by p53 and c-Ha-ras proteins and PMA. **Glycobiology** 1997; 7:1089-98.

Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Res** 1995; 55:4531-5.

Grover R, Chana JS, Wilson GD, Richman PI, Sanders R. An analysis of p16 protein expression in sporadic malignant melanoma. **Melanoma Res** 1998; 8:267-72.

Guittaut M, Charpentier S, Normand T, Dubois M, Raimond J, Legrand A. Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. **J Biol Chem** 2001; 276:2652-7.

Harris N, Brill E, Shohat O, et al. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. **Mol Cell Biol** 1986; 6:4650-6.

Hedley SJ, Layton C, Heaton M, et al. Fibroblasts play a regulatory role in the control of pigmentation in reconstructed human skin from skin types I and II. **Pigment Cell Res** 2002; 15:49-56.

Henry H, Thomas A, Shen Y, White E. Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. **Oncogene** 2002; 21:748-60.

Herlyn M. Modelo de Progressão de Melanoma. Disponível em: http://www.wistar.org/herlyn/, 2000. [2004 abril 28].

Hittelet A, Legendre H, Nagy N, et al. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **Int J Cancer** 2003; 103:370-9.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. **J Invest Dermatol** 2000; 115:337-44.
Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. **Clin Cancer Res** 2001; 7:661-8.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **Am J Pathol** 2000; 156:1515-25.

Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. **Biochimie** 2001; 83:667-76.

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **J Pathol** 2003; 199:275-88.

Idikio H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. **Int J Oncol** 1998; 12:1287-90.

Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. **J Biol Chem** 1992; 267:24675-80.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58:71-96.

Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. **J Invest Dermatol** 1998; 110:932-8.

Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res** 1999; 59:4148 54.

Kraehn GM, Utikal J, Udart M, et al. Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. **Br J Cancer** 2001; 84:72-9.

Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J Immunol** 1996; 156:3939-44.

Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. **Cell Death Differ** 2006; 13:1325-38.

Lapidot T, Fajerman Y, Kollet O. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. **J Mol Med** 1997; 75:664-73.

Le Marer N, Hughes RC. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. **J Cell Physiol** 1996; 168:51-8.

Lee YJ, Song YK, Song JJ, et al. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of AKT. **Exp Cell Res** 2003; 288:21-34.

Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. **J Virol** 1994; 68:510-6.

Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Mol Med Today** 2000; 6:163-9.

Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene** 2002; 21:8001-10.

Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. **Biochem J** 2004; 380:31-41.

Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:3466-70.

Marks R, Dorevitch AP, Mason G. Do all melanomas come from "moles"? A study of the histological association between melanocytic naevi and melanoma. **Australas J Dermatol** 1990; 31:77-80.

Marks R. Epidemiology of melanoma. Clin Exp Dermatol 2000; 25:459-63.

Martins WK. Análise do perfil de expressão gênica em melanomas humanos. São Paulo; 2007. [Tese-Doutorado - Fundação Antonio Prudente - Hospital A. C. Camargo].

Matarrese P, Fusco O, Tinari N, et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **Int J Cancer** 2000; 85:545-54.

Mazurek N, Sun YJ, Liu KF, et al. Phosphorylated galectin-3 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling by regulating phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 in human breast carcinoma cells. **J Biol Chem** 2007; 282:21337-48.

Mazurek N, Sun YJ, Price JE, et al. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of genes. **Cancer Res** 2005; 65:10767-75.

Meier F, Nesbit M, Hsu MY, et al. Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. **Am J Pathol** 2000; 156:193-200.

Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature** 2005; 436:720-4.

Ministério da Saúde. Estimativa /2008 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Moan J, Dahlback A, Setlow RB. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. **Photochem Photobiol** 1999; 70:243-7.

Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. **Am J Pathol** 2001; 159:1055-60.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 1983; 65:55 63.

Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:447-54.

Muto NH. Análise do perfil de expressão gênica de lesões melanocíticas. São Paulo; 2007. [Tese-Doutorado - Fundação Antonio Prudente].

Nakahara S, Hogan V, Inohara H, Raz A. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. **J Biol Chem** 2006; 281:39649-59.

Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis** 2005; 10:267-75.

Nakahara S, Raz A. On the role of galectins in signal transduction. **Methods Enzymol** 2006; 417:273-89.

Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. **Curr Opin Biotechnol** 1998; 9:457-63.

Ochieng J, Green B, Evans S, James O, Warfield P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. **Biochim Biophys Acta** 1998; 1379:97-106.

Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, et al. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating AKT in human bladder carcinoma cells. **Cancer Res** 2005; 65:7546-53.

Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:1443-8.

Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, Patterson RJ. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:3595-602.

Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Curr Biol** 2005; 15:249-54.

Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:705-22.

Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet** 2003; 33:19-20.

Polsky D, Bastian BC, Hazan C, et al. HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. **Cancer Res** 2001; 61:7642-6.

Possik PA, Lee JT, Herlyn M. Transforming the melanocyte. More than just MAPK. **Bioforum Europe** 2008, 7-8:28-30.

Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, et al. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:6709-15.

Raimond J, Rouleux F, Monsigny M, Legrand A. The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activitydown-regulated by p53. **FEBS Lett** 1995; 363:165-9.

Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclindependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. **Cancer Res** 1995; 55:2713-8.

Rigel DS. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the developm.ent of skin cncer. **J Am Acad Dermatol** 2008; 58:S129-32.

Satyamoorthy K, Oka M, Herlyn M. An antisense strategy for inhibition of human melanoma growth targets the growth factor pleiotrophin. **Pigment Cell Res** 2000; 13 Suppl 8:87-93.

Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. **Cancer Res** 2005; 65:7292-300.

Shi Y, He B, Kuchenbecker KM, et al. Inhibition of Wnt-2 and galectin-3 synergistically destabilizes beta-catenin and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. **Int J Cancer** 2007; 121:1175-81.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. **Cancer Res** 2005; 65:3535-7.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer Res** 2004; 64:6363-7.

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. **J Immunol**1995; 154:180-91.

Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? **J Am Acad Dermatol** 1995; 33:1000-7.

Song YK, Billiar TR, Lee YJ. Role of galectin-3 in breast cancer metastasis: involvement of nitric oxide. **Am J Pathol** 2002; 160:1069-75.

Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. **Am J Dermatopathol** 1998; 20:255-61.

Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrest BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. **J Cell Sci** 1994; 107:983-92.

Valyi-Nagy IT, Hirka G, Jensen PJ, Shih IM, Juhasz I, Herlyn M. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. **Lab Invest** 1993; 69:152-9.

van den Brûle FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. **Int J Cancer** 2000; 89:361-7.

Vereecken P, Debray C, Petein M, et al. Expression of galectin-3 in primary and metastatic melanoma: immunohistochemical studies on human lesions and nude mice xenograft tumors.**Arch Dermatol Res** 2005; 296:353-8.

Vereecken P, Heenen M. Serum galectin-3 in advanced melanoma patients: a hypothesis on a possible role in melanoma progression and inflammation. **J Int Med Res** 2006; 34:119-20.

Vereecken P, Zouaoui Boudjeltia K, Debray C, et al. High serum galectin-3 in advanced melanoma: preliminary results. **Clin Exp Dermatol** 2006; 31:105-9.

Vereecken P, Ghanem G, Morandini R, Suciu S, Van Baren N, Heenen M. Defining the prognostic value for galectin-3 in cutaneous melanoma. **J Int Med Res** 2007a; 35:731-2.

Vereecken P, Heenen M, Babar S, Van Baren N. Is serum galectin-3 a potential predictor of the response to active specific immunotherapy in melanoma patients? **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2007b; 21:278-80.

Weeraratna AT. A Wnt-er Wonderland – The complexity of Wnt signaling in melanoma. **Cancer and Metastasis Review** 2005; 24:237-50.

Weinberger PM, Adam BL, Gourin CG, et al. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2007; 133:503-10.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:6737-42.

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature** 1994; 369:321-3.

Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J Biol Chem** 2002; 277:15819-27.

Yu R, MacDaid R, Lee JT, Possik PA, et al. Dysregulated p53 pathway cooperates with mutant BRAF in transformation of human melanocytes. **Cancer Res** 2008 *in press*.

Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. **Am J Pathol** 2006; 168:1666-75.

ANEXO

Transforming the Melanocyte

More than Just MAPK

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is a prominent factor in melanomagenesis, with approximately four out of five tumours exhibiting mutations within the pathway. However, mutational activation of Ras or Raf initiates a preventative checkpoint known as oncogene-induced senescence (OIS); the mechanisms that underlie escape from OIS are poorly understood. In this cursory review, we discuss the putative roles of MAPK signalling in melanocytic transformation and relevant data that describe escape from OIS.



From left: Meenhard Herlyn DVM, Patricia A Possik, MSc, and John T Lee, PhD

The Molecular Signature of Melanoma

The advent of gene expression profiling over the past decade has led to immense advances in the understanding of the genetic events that contribute to development of disease. A role for MAPK signalling has been well-established in the literature for nearly three decades, but a seminal paper was the first to describe a major role for this pathway in melanoma in 2002; there, Davies et al. demonstrated that B-Raf is activated via a point mutation in nearly 2/3 of all melanomas [1]. Furthermore, N-Ras is also mutated in approximately 15% of melanomas [2], while c-Kit, a receptor tyrosine kinase upstream of the MAPK pathway, is mutated in ~ 4% of melanocytic tumours [3]. Interestingly, the aforementioned mutations very rarely overlap, although the importance of this observation is still under scrutiny.

In those rare cases where Ras or B-Raf are not activated in melanoma, amplificiations of cyclin D1 or CDK4 can often be found. Moreover, the CDKN2A locus, which encodes the INK4a/ARF tumour suppressors, is also lost in ~ 50% of melanomas [4]. Although common in many other tumours, melanomas rarely harbour p53 mutations; instead, ARF is a strong candidate that may be responsible for inhibition of p53 function through modulation of HDM2 activity. In support of this latter hypothesis, overexpression of HDM2 has been reported in melanoma [5]. Lastly, B-Raf mutations are often accompanied by PTEN loss and a small percentage of melanomas harbour amplications of c-myc [6]. Together, the data strongly implicate MAPK signalling in the development and progression of melanoma, but also demonstrate that other pathways may play auxiliary roles in development of disease.

Barriers to Tumourigenesis

Senescence was first described as a permanent cellular state in which cells are growth arrested in response to telomere erosion [7]. More recently, senescence has been observed in response to oncogenic insult, a phenomenon known as OIS.

According to the model of melanoma progression [8], nevi are pre-malignant lesions that possess the potential to develop into melanoma. These lesions are usually stable clusters of melanocytes with low proliferative capacity. Intriguingly, B-Raf and N-Ras mutations have been observed in nevi [2], suggesting that this proliferative arrest could be a result of an OIS mechanism initiated by these oncogenic gene products; accordingly, nevi also display markers of OIS, such as p16 expression and SA-BGal activity [9,10].

Although the candidate mechanisms involved in the induction of OIS are the p16/ARF gene products, one described mechanism is the DNA double strand break repair response (DDRR); blockade of ATM, Chk2, HDM2, or p53 function allows cells to bypass senescence imposed by different oncogenic stimuli [11,12]. Recent studies demonstrate that melanoma lesions and cell lines, as well as dysplasic nevi, are highly-positive for nuclear foci that depict replication stress





Fig. 1: Progression of melanocytic transformation. Normal melanocytes acquire oncogenic mutations that initiate a transient proliferative burst followed by entrance into a senescent state (nevi); it is currently unknown whether all oncogene-affected melanocytes enter senescence or a small percentage acquire additional genetic abnormalities (i.e., mutations, deletions/amplifications) that enable bypass of oncogene-induced senescence. In either event, the acquisition of those genetic anomalies appears to transform benign nevi into malignant melanoma.

and DNA double-strand breaks (DSBs) [13, 14]. These studies suggest that B-Raf or N-Ras activation initiates S-phase entry, causing stress at the DNA replication fork which culminates in DNA DSBs, activation of a cell response mechanism, cell cycle arrest, and OIS.

Bypassing OIS

OIS has been extensively studied and focus has been given to the role of INK4a, ARF, and p53 in this process. Restoration of p16 expression in INK4a/ARF-/- murine melanocytes was demonstrated to rescue the senescent phenotype, while reexpression of ARF actually induced cell death [15]. Contrasting these findings, establishment of ARF expression in a transgenic mouse model appeared essential to induce senescence; furthermore, when combined with activation of N-Ras and INK4a, loss of ARF transformed murine melanocytes, in a manner independent of p53 [16]. While seemingly diverse, the collective data strongly implicate the CDKN2a locus for its roles in preventing tumourigenesis through the induction of OIS.

Much evidence of the cooperation of MAPK activation and senescence bypass in melanocytic transformation has come from studies using a murine model of constitutive activation of H-Ras, where individual loss of INK4a, ARF, or p53 leads to melanomagenesis [17-19]. Other work has shown that short term expression of B-Raf V600E in human melanocytes leads to a proliferation burst, but long term expression results in cell cycle arrest associated with p16 upregulation and SA-BGal activity [9, 10]. No evidence of p53 or p21 activity in this process was observed. Ironically, cell cycle arrest was observed even in p16-deficient fibroblasts, suggesting that other genes may be involved in the initiation of OIS. Contrasting these results, Patton et al. have shown that zebrafish solely expressing B-Raf V600E form non-malignant nevi, but when combined with p53 deficiency, these lesions develop into invasive melanomas [20]. p16 inactivation, however, is not sufficient for melanocyte immortalisation in vitro, possibly implicating other immortalizing factors, such as hTERT [21]. In fact, hTERT contributes to the malignant transformation of human melanocytes when combined with activated N-Ras or PI3K and disruption of both the Rb and p53 pathways [22]. B-Raf activation, however, did not result in a similar phenotype.

Most recently, a genome-wide RNAi approach identified 17 genes that block the proliferative arrest imposed by B-Raf activation [23]. IGFBP7, an insulin-like growth factor binding protein, is upregulated after B-Raf activation in melanocytes and induces senescence in an autocrine/paracrine manner. The mechanism involving this secreted factor seems to be independent of both p16 and p53, an observation that is interesting, particularly considering that p53 was another gene identified that synergises with V600E to bypass OIS in the same study.

Conclusion

While the data do not always correlate well, it appears that potentiation of oncogenic activity combined with an escape from tumour suppressor mechanisms is necessary to transform melanocytes into melanoma cells. The evidence discussed here underscores the mechanisms employed by cells to repress tumour formation. The participation of well-known tumour suppressor genes p16, ARF, and p53 are prominent in this response, particularly in the realm of OIS – to what extent each of these genes contributes to evasion of transformation is still not entirely clear. The most recent data open the possibility of other mechanisms, such as DDRR and secreted factors (i.e., IGFBP7), might play a role in melanocytic transformation.

References

- [1] Davies, H., et al., Nature 417, 949-954 (2002)
- [2] Pollock, P.M., et al., Nat. Genet. 33, 19-20 (2003)
- [3] Curtin et al., N Engl. J.Med. 353, 2135-2147 (2005)
- [4] Curtin et al., J Clin Oncol 24, 4340-4346 (2006)
- [5] Polsky, D., et al., Cancer Res. 61, 7642-6 (2001)
- [6] Kraehn, G.M., et al., Br J Cancer 84, 72-79 (2001)
- [7] Hayflick, L., Exp. Cell Res 37, 614-36 (1965)
- [8] Clark, W.J. Jr., et al., J Natl Cancer Inst 81, 1893-904 (1989)
- [9] Michaloglou, C., *et al.*, Nature 436, 720-4 (2005)
- [10] Gray-Schopfer, V.C., et al., Br. J Cancer 95, 496-505 (2006)

Further references are available from the author

www.eMagazineBIOforum.com

CONTACT

Meenhard Herlyn DVM, PhD The Wistar Institute Philadelphia, PA, USA Tel.: +1 215 898 3950 Fax: +1 215 898 0980 herlynm@wistar.org