

**IMPACTO DA HIPÓXIA SOBRE EXPRESSÃO,
ALTERAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS E
FUNÇÕES PRÓ-MIGRATORIAS DE
GALECTINA-3 EM MODELO DE PROGRESSÃO
DE MELANOMA MURINO**

LARA ZIMMERMANN

**Dissertação apresentada a Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de mestre
em Ciência**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Zimmermann, Lara

Impacto da hipóxia sobre expressão, alterações pós-traducionais e funções pró-migratorias de Galectina-3 em modelo de progressão de melanoma murino / Lara Zimmermann – São Paulo, 2009.

76p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Roger Chammas

Descritores: 1. MELANOMA. 2. MURINOS. 3. GALECTINA -3. 4. HIPÓXIA.

" Toda a nossa ciência,
comparada com a realidade, é
primitiva e infantil e, no
entanto, é a coisa mais preciosa
que temos."

Albert Einstein

"A vida sem ciência é uma
espécie de morte."

Sócrates

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Gustavo e
Maria Emilia e aos meus
irmãos Natalia e Luis
Gustavo pelo amor e apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente o meu orientador Prof. Dr. Roger Chammas pela oportunidade que recebi em seu laboratório, pelas discussões e conselhos que são fundamentais para o meu desenvolvimento e amadurecimento científico.

Agradeço aos companheiros de laboratório que em tantos momentos me ajudaram a resolver problemas, além de terem paciência comigo: Ana, Andréia, Camila, Gabriella, Guilherme, Helano, Luciana, Patrícia, Rafael, Raimundo, Rodrigo, Silvina, Tharcisio e Renata, minha companheira integral no mestrado. Aos amigos que já saíram, mas deixaram saudades: Mara, Luciana Andrade, Verônica, que me recebeu no início e muito me ajudou, e em especial a Claudia, que muito me ajuda fora do laboratório. Gostaria de agradecer a dedicação diária dos funcionários Maria José, Jair e Willame, e a todos os componentes do Lim 24.

Agradeço a Dra. Nathalie Cella, que me ajudou nos experimentos de eletroforese em duas dimensões e me propiciou produtivas conversas científicas e aos professores Dr. Walter Colli e a Dra. Maria Julia Manso Alves pela estrutura de laboratório fornecida. Ao Dr. Emerson Bernardes e a Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira pelos anticorpos. Ao Prof. Dr. José César Rosa pela colaboração e disposição em ajudar.

Agradeço ainda ao Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig e ao Dr. Luiz Sardinha que me deram a primeira oportunidade de trabalhar com ciência e propiciaram o início da minha educação científica. Agradeço também o Prof. Dr. Bryan Strauss, que primeiro me mostrou a pesquisa básica em oncologia.

Agradeço a Fapesp e a Capes pelo apoio financeiro.

Agradeço aqueles que fazem a minha vida mais feliz, minha família que aumenta sempre: meus avós Carlos (*in memoriam*), Jeny, Claudio e Zoé; aos meus tios Paulo, Lucia, Irani, Luiz Augusto, Fred, Luiza, Jane e Guilherme; aos meus primos Rafael, Flavia, Leonardo e Eleonora; a minha 'boadrasta' Lucia; aos meus irmão de coração Ana, Teca, Ciça e Edu; aos meus cunhados Caro, Rogério, Rogério e Carol; aos meus sobrinhos adotados Theo, Paola, Bernardo, Manuela, Luca, Joana, Eduardo Henrique e Ana Luiza e ao mais novo membro da família – 'a ervilha'.

Um agradecimento muito especial a quem sem ela com certeza eu não teria saúde para fazer esse trabalho, a minha tia Sonia.

RESUMO

Zimmermann L. **Impacto da hipóxia sobre expressão, alterações pós-traducionais e funções pró-migratorias de Galectina-3 em modelo de progressão de melanoma murino.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma é um tumor agressivo, com alta taxa de letalidade, tendo sua maior incidência em indivíduos caucasianos. Em melanoma, assim como em outros tumores sólidos, regiões de hipóxia têm sido associadas ao processo de metastatização e conseqüentemente a um mau prognóstico. Nesse trabalho avaliamos alterações na expressão e modificações pós-traducionais de galectina-3 em modelo que consiste em uma linhagem normal, melan-a, e células de melanoma derivadas desta linhagem (Tm1 e variantes modificadas geneticamente) em condições de hipóxia e hipóxia-miméticas. Nessas condições há um aumento da transcrição do gene, acompanhado de um acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular e redução da mesma no meio extracelular em melan-a. Em Tm1, a expressão gênica de galectina-3 é perdida por hipermetilação de seu promotor. A exposição de Tm1 a ambientes hipóxicos não foi suficiente para levar à re-expressão de galectina-3. Dados preliminares, avaliando-se o acúmulo de galectina-3 em células Tm1 transfectadas com o gene de galectina-3, sugerem que a presença do promotor homólogo do gene *Igals3* parece necessária para a resposta de acúmulo de galectina-3 em hipóxia. Resultados de focalização isoelétrica, seguida de separação por massa molecular aparente, mostraram enriquecimentos de formas isoelétricas ácidas, que foram eliminadas com o tratamento com fosfatase ácida. Observamos ainda que em condição de hipóxia há um aumento da resposta migratória das células à laminina-111. A capacidade migratória não foi inibida por lactose. Assim, em condições de hipóxia a galectina-3 tem sua compartimentalização celular alterada, sendo a fosforilação sua principal modificação pós-traducional.

SUMMARY

Zimmermann L. **[Effect of hypoxia on the expression, posttranslational modification and migratory functions of galectin-3 in a murine melanoma model]**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Melanoma is a very aggressive and highly lethal tumor, which predominantly occurs in the Caucasian population. In melanoma, like other tumors, hypoxia regions have been associated with metastasis and a poor prognosis. In this work we studied modifications at expression and posttranslational modifications of galectin-3 in a melanoma model, which consists in a non tumorigenic cell line, melan-a, and a melanoma cell line derived from this very same cell line (Tm1 and its genetically modified variants) under hypoxia and hypoxia mimetic conditions. Under these conditions, there is an increase in galectin-3 transcription, followed by an accumulation of galectin-3 deposited in the extracellular matrix and a reciprocal reduction in soluble galectin-3 present in the conditioned medium of melan-a. Tm1 expresses no galectin-3 due to hypermethylation of Igals3 promoter. The hypoxic environment was not able to induce de novo expression of galectin-3 in Tm1 cells. Preliminary data on the level of galectin-3 in Tm1 cells expressing heterologous galectin-3 suggest that the presence of the natural promoter is necessary to observe the increase of the galectin-3 under hypoxic conditions. 2D-SDS-PAGE shows an increase in acidic forms of galectin-3, which were sensitive to acidic phosphatase treatment. Under hypoxic conditions, there was a higher haptotactic response of melan-a cells to laminin-111. This migratory response was not inhibited by lactose. Thus, under hypoxic conditions, (1) galectin-3 has its cellular compartmentalization modified and (2) phosphorylation was its major posttranslational modification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de vias importantes no controle da proliferação e crescimento celular, que aparecem alteradas em melanoma.....	5
Figura 2	HIF-1 α é expresso de forma estável em melan-a em condições de normóxia.....	31
Figura 3	O ambiente hipóxico induz aumento da expressão do gene <i>Igals3a</i>	33
Figura 4	O ambiente hipóxico não altera o acúmulo de galectina-3 citoplasmático.....	34
Figura 5	O ambiente hipóxico inibe a secreção de galectina-3 solúvel para o meio extracelular.....	35
Figura 6	O ambiente hipóxico induz o acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular.....	36
Figura 7	Células Tm1 não expressão galectina-3 em ambiente hipóxico.....	37
Figura 8	Impacto da hipóxia e do tratamento com CoCl ₂ sobre acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular.....	39
Figura 9	Modificação pós-traducional de galectina-3 em condições de hipóxia.....	42
Figura 10	Fosforilação é uma importante modificação pós-traducional de galectina-3 em condições de hipóxia.....	44

Figura 11	Validação do anticorpo α N-PHOS e α PHOS para reconhecimento de porção fosforilada de galectina-3.....	46
Figura 12	Ambiente hipóxico como fator indutor de migração.....	48
Figura 13	Hipóxia por período prolongado gera perda do efeito indutor de migração.....	49
Figura 14	A migração celular é independente da ação de galectina-3 solúvel extracelular.....	50
Figura 15	Modificações na compartimentalização de galectina-3 em condições de hipóxia.....	52
Figura 16	Simulação no ProMoST de alterações no ponto isoelétrico de galectina-3 como consequência de alterações pós-traducionais.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados para <i>western blot</i>	25
Tabela 2	Primers utilizados para <i>real time PCR</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ARNT	Aryl hidrocarbon receptor nuclear translocator
B16(F10)	Linhagem de melanoma murino
BeW	Linhagem humana com origem placentaria
BT-549	Linhagem derivada de carcinoma de mama humano
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Glut-1	<i>Glucose transporter 1</i>
HBS	HIF-1 DNA binding site
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1 alpha
HIF-1β	Hypoxia inducible factor-1 beta
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HRE	<i>Hypoxia-responsive element</i>
Igals3a	Gene da proteína galectina-3
Ma	Melan-a – linhagem derivada de melanocitos murino imortalizada.
MAGE-11	<i>Melanoma antigen family A, 11</i>
ODD	<i>Oxygen-dependent degradation</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHD	<i>Prolyl-4-hydroxylase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PIP₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PIP₃	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
pVHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein</i>
Rb	Proteína Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Siah2	<i>Seven in absentia homolog 2</i>
Tm1	Linhagem derivada de melan-a por crescimento independente de ancoragem.

Tm1G3	Linhagem Tm1 transfectada com o gene de galectina-3 humano.
Tm1N3	Linhagem de Tm1 transfectada com o vetor vazio.
Tm5	Linhagem derivada de melan-a por crescimento independente de ancoragem.
TP53	Gene supressor de tumor que codifica a proteína p53.
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Melanoma.....	1
1.2	Hipóxia e Câncer.....	8
1.3	Galectina-3.....	14
2	OBJETIVO.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivo Específico.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Células.....	20
3.2	Condições.....	20
3.2.1	Hipóxia.....	20
3.2.2	Tratamento com Cloreto Cobaltoso.....	21
3.3	Análise Protéica.....	21
3.3.1	Meio condicionado.....	21
3.3.2	Extrato protéico.....	22
3.3.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
3.3.4	<i>Western blot</i>	24
3.4	Migração celular.....	25
3.5	RT-PCR <i>real time</i>	27
3.5.1	Extração de RNA.....	27
3.5.2	RT-PCR.....	27
3.5.3	<i>Real time</i>	28
3.6	Análise estatística.....	29
3.7	Densitometria.....	30

4	RESULTADOS.....	31
4.1	O ambiente hipóxico induz aumento da transcrição gênica de galectina-3, paralelo ao aumento de galectina-3 associada à matriz extracelular.....	31
4.2	O ambiente hipóxico não induz expressão <i>de novo</i> de galectina-3 silenciada por metilação do promotor.....	36
4.3	Diferentes repostas ao estímulo de hipóxia e ao tratamento com Cloreto Cobaltoso.....	37
4.4	Modificações pós-traducionais de galectina-3 em ambiente hipóxico.....	39
4.5	O ambiente hipóxico estimula a migração celular. Essa migração celular não é dependente de galectina-3 extracelular solúvel.....	46
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES.....	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8	OBRA CONSULTADA.....	78

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do projeto de pesquisa no Conselho de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem sua origem a partir de melanócitos, células residentes na camada basal da epiderme, na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e em leptomeninges (CHAMMAS 2004).

O melanoma é a neoplasia mais fatal dentre os diferentes tipos de câncer de pele, apesar de sua baixa incidência (cerca de 4% de todos os tipos de câncer, excluindo os cânceres de pele não-melanoma). Essa neoplasia é considerada o tipo de câncer de pele mais grave devido a sua alta possibilidade de metástase (TUCKER e GOLDSTEIN 2003; HALL et al. 2003), além de apresentar uma alta mortalidade, associada principalmente a diagnósticos tardios. Sua incidência tem aumentado nos 20 últimos anos, o aumento de sua taxa de incidência só é menor que o aumento verificado para cânceres de pulmão em mulheres. Melanomas são mais frequentes em indivíduos caucasianos do que em indivíduos da raça negra, e relacionam-se à maior exposição à luz solar. É provável que essas diferenças estejam associadas à sensibilidade da pele à exposição a UVA e UVB, sendo este último mais diretamente associado à transformação dos melanócitos (BONI et al. 2002; RAGER et al. 2005). Ainda, quando diagnosticados tardiamente, os melanomas tendem a ser refratários a tratamentos quimioterápicos. Esse

quadro tem estimulado a busca por novos marcadores da progressão tumoral que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos da progressão, o melhor entendimento dos mecanismos que levam ao aumento da agressividade deste tumor, bem como auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

CLARK et al. (1984) propuseram um modelo de classificação para as diferentes lesões presentes na progressão tumoral em melanoma, baseado em mudanças histológicas e anatômicas ocorridas durante a transformação dos melanócitos. De acordo com esse modelo podemos subdividir a progressão em cinco estágios:

(1) **nevus comuns**, são lesões melanocíticas que têm sua origem a partir da proliferação de melanócitos. Em geral essas células apresentam tempo finito de vida.

(2) **nevus atípicos ou displásicos**, são lesões que podem ter sua origem a partir de nevus comuns ou mais provavelmente surgirem como uma nova lesão, e se caracterizam por uma proliferação aberrante de melanócitos, promovendo lesões assimétricas, com bordas irregulares e progressivo aumento de tamanho e coloração.

(3) **melanoma de crescimento radial**, caracterizado pela presença de melanócitos transformados, com alta capacidade proliferativa na epiderme e com capacidade de invadir a derme; podem surgir como uma lesão nova ou a partir de uma lesão pré-existente.

(4) **melanoma de crescimento vertical**, caracteriza-se por apresentar capacidade proliferativa em camadas distintas de sua origem,

como a derme. Podem atingir vasos sanguíneos e linfáticos, através dos quais podem disseminar para outros órgãos, onde proliferam e se estabelecem como foco metastático, caracterizando assim um novo estágio, o **melanoma metastático** (5).

O surgimento de tumores está diretamente relacionado ao acúmulo de alterações moleculares sofridas por células normais. Uma vez alteradas, essas células são denominadas transformadas. HANAHAN e WEINBERG (2000) sugeriram seis capacidades adquiridas pelas células transformadas, que são importantes para o estabelecimento e sobrevivência do tumor: capacidade celular de evasão a apoptose, auto-suficiência em sinalização para crescimento celular, insensibilidade a sinalização para parada de ciclo celular, potencial replicativo ilimitado, estímulo a angiogênese e capacidade para invasão de outros tecidos (metástase). A aquisição dessas capacidades está condicionada à disfunção de moléculas ligadas ao controle do ciclo celular (proliferação, crescimento e morte celular), reparo de DNA e comunicação célula-célula e célula-matriz. Os melanócitos apresentam diferentes alterações moleculares que permitem sua transformação em células malignas e conseqüente sucesso no estabelecimento do melanoma.

Os melanócitos têm seu controle de proliferação determinado por interações com queratinócitos, na camada basal da epiderme. Uma forma de interação ocorre através da molécula de adesão celular E-caderina; a interação celular leva ao controle de proliferação via o recrutamento de β -catenina para os sítios das junções aderentes, diminuindo assim a disponibilidade de β -catenina no citoplasma (BARTH et al. 1997; JOHNSON

1999). As moléculas de β -catenina, quando livres no citoplasma, migram para o núcleo e se ligam a fatores de transcrição que irão estimular a proliferação celular. Ao longo da progressão tumoral de melanoma a expressão de E-caderina está diminuída, afetando assim o controle sobre o ciclo celular, permitindo uma desregulada sinalização de proliferação (JOHNSON 1999).

Em estágios iniciais do desenvolvimento de melanoma, outra importante via de controle de proliferação e crescimento celular que está alterada é a via RAS \rightarrow RAF (fig. 1). A molécula de RAS é central para sinalização iniciada pela interação de fatores de crescimento e seus receptores. A via RAS \rightarrow RAF tem como produto final a ativação de fatores de transcrição envolvidos na ativação da proliferação e crescimento celular. Foi observado já em nevos comuns uma ativação anormal dessa via, independente da ação de fatores de crescimento, por mutações somáticas em *B-RAF* (ALBINO et al. 1989).

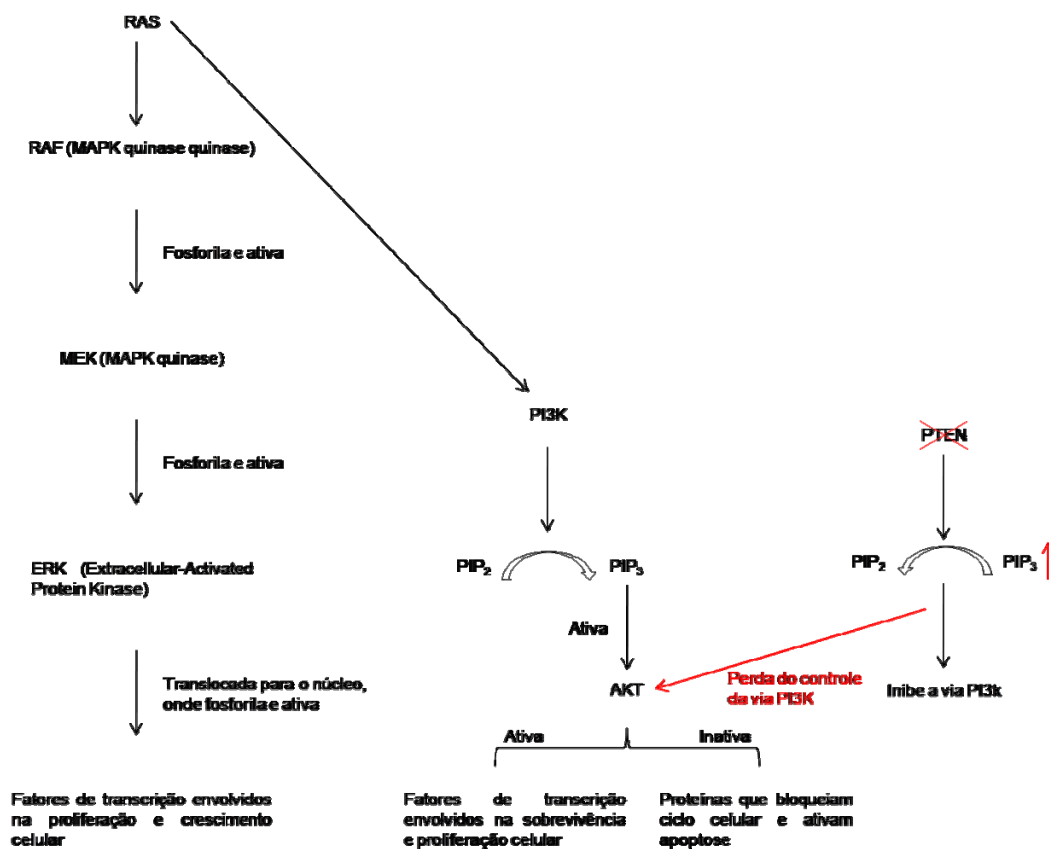


Figura 1 - Esquema de vias importantes no controle da proliferação e crescimento celular, que aparecem alteradas em melanoma.

A molécula RAS, quando ligada a GTP encontra-se ativa e por sua vez recruta e ativa RAF, que por sua vez ativa e fosforila a proteína MEK e que irá fosforilar e ativar a proteína ERK. Uma vez ativa, ERK é translocada para o núcleo, onde irá fosforilar e ativar fatores de transcrição responsáveis pela proliferação e crescimento celular. Em melanoma temos uma ativação anormal dessa via, independente de sinalização de fatores de crescimento. A proteína RAS pode interagir ainda com PI3K, ativando essa via. Uma vez ativa, PI3K converte o lipídio de membrana PIP₂ em PIP₃, que por sua vez irá ativar AKT. A proteína AKT ativada, inativa proteínas que tem ação bloqueadora do ciclo celular ou estimuladora de apoptose e AKT ativada pode ainda ativar fatores de transcrição que irão favorecer a sobrevivência e proliferação celular. O produto do gene supressor de tumor PTEN inibe a via de PI3K, defosforilando o produto desta quinase. Em melanoma o gene PTEN tem sua expressão perdida por metilação, levando à perda do controle da atividade de PI3K, proporcionando sinalização constante para manutenção de sobrevivência celular.

A molécula RAS pode também ter uma atividade independente de RAF, atuando na ativação da via PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (TSAO et al. 2004). A via PI3K ativa fatores envolvidos na sobrevivência e proliferação celular ao mesmo tempo que inativa proteínas responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular e indução da apoptose (CANDRELL 2001). A via de PI3K pode ser regulada pelo produto do gene supressor de tumor PTEN, que atua na defosforilação de fosfatidil-inositol-3-P e derivados. Em melanoma, uma alteração comumente encontrada é a perda de PTEN, levando a ativação constante da via PI3K (Figura 1) (RAMASWAMY et al. 1999; WU et al. 2003)

Ao longo da progressão tumoral de melanoma, também encontramos alterações nos genes supressores de tumor $p16^{\text{INK4A}}$ e $p19^{\text{ARF}}$, envolvidos na via de controle do ciclo celular.

A proteína retinoblastoma (Rb) tem a propriedade de se ligar à proteína regulatória E2F, inibindo sua ação. A proteína E2F atua ligando-se a promotores de diferentes genes que codificam proteínas necessárias para a entrada na fase S do ciclo celular. Quando E2F está associada a Rb não consegue interagir com o DNA, impedindo a célula de entrar em divisão. Para que a célula possa entrar na fase S é necessário que a Rb seja fosforilada, diminuindo a afinidade com E2F, liberando essa para interagir com o DNA. A fosforilação de Rb ocorre pela ação do complexo ciclina D / CDK4,6. A proteína $p16^{\text{INK4A}}$ inibe a formação desse complexo, bloqueando assim a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Portanto, a perda de função desse gene promove um aumento na concentração do complexo ciclina D / CDK4,6, promovendo o ciclo celular. Em melanoma a

perda de função do gene p16^{INK4A} está relacionado à deleção ou a hipermetilação do promotor (TALVE et al. 1997; VAN DER VELDEN et al. 2001).

A proteína p19^{ARF} tem como função controlar os níveis da proteína p53, codificada pelo gene supressor de tumor TP53. Esse gene está envolvido com vias de indução da parada da proliferação celular e com vias de indução da morte celular programada. Como o estímulo para essas ações está associado à detecção de defeitos na duplicação do DNA, esse gene está relacionado com a manutenção da estabilidade genômica da célula. Assim, a perda de função da proteína p19^{ARF} levaria a perda de controle sobre a proteína p53 e conseqüente acúmulos de lesões no DNA, levando a instabilidade gênica. Essa instabilidade favorece o processo de transformação, favorecendo assim a sobrevivência do tumor (POMERANTZ et al. 1998; SHARPLESS et al. 2004; HARRIS e LEVINE 2005).

Em trabalho originalmente realizado pelo nosso grupo (OBA-SHINJO et al. 2006), estabeleceu-se um modelo de progressão tumoral de melanoma murino, que simula a transição entre uma lesão pré-maligna ou de melanoma de crescimento radial e o melanoma de crescimento vertical ou metastático. Esse modelo consiste em uma linhagem de melanócitos não tumorigênicos obtida a partir de melanócitos de camundongo C57/Bl6, denominada Melan-a (Ma), e duas linhagens tumorigênicas, denominadas Tm1 e Tm5, obtidas a partir de crescimento independente de ancoragem de Ma. Assim, no modelo, Ma representa o melanoma de crescimento radial e Tm1 e Tm5 representam o melanoma de crescimento vertical.

1.2 HIPÓXIA E CÂNCER

Um tecido torna-se hipóxico quando o fornecimento de oxigênio não é adequado, comprometendo as funções biológicas do mesmo (BEDOGNI e POWELL 2009). Diferentes fatores podem levar a uma situação de hipóxia: problemas no fluxo sanguíneo como anormalidades nos vasos da microcirculação (comum em tumores); baixa pressão sanguínea; falta de vascularização no tecido; problemas no transporte do oxigênio como baixo nível de eritrócitos ou eritrócitos mal formados. Além dessas causas internas, podemos ter causas externas, nesse caso a pO_2 é muito baixa, não permitindo a captação do oxigênio pelo organismo.

SEMENZA e WANG (1992) foram os primeiros a descrever um fator, em mamíferos, que era expresso em resposta a alterações nos níveis de oxigênio (mais tarde foi demonstrado que esse fator responde a outros fatores que não unicamente os níveis de oxigênio). Esse fator, denominado fator induzido por hipóxia (HIF-1 – hypoxia inducible factor-1), foi descoberto estudando-se a interação de fatores transcricionais com a região promotora do gene de eritropoietina, um gene cuja transcrição é aumentada em situações de privação de oxigênio.

Experimentos com linhagens não produtoras de eritropoietina mostraram atividade de HIF-1, gerando as primeiras evidências que HIF estaria atuando também em outros genes (WANG e SEMENZA 1993). Mais tarde mostrou-se que HIF ativa diversos outros genes, muitos dos quais induzem a expressão de proteínas envolvidas na angiogênese, como VEGF

e na geração de energia como transportadores de glicose e enzimas da via glicolítica (HOCKEL e VAUPEL 2001a).

A proteína HIF é um heterodímero formado por duas subunidades. A subunidade α (HIF-1 α), possui aproximadamente 120kDa de massa molecular aparente, e a subunidade β (HIF-1 β), que possui aproximadamente 94kDa de massa molecular aparente. HIF-1 β é expresso de forma constitutiva no núcleo, enquanto HIF-1 α é regulado por uma cascata de degradação no citoplasma (WANG e SEMENZA 1995; WENGER 2002).

A subunidade HIF-1 α possui em sua estrutura um domínio passível de hidroxilação, conhecido como ODD (oxygen-dependent degradation). Na presença de oxigênio, a enzima prolil-4-hidroxilase (PHD) hidroxila as prolinas 402 e 564 presentes no domínio ODD. Uma vez hidroxilada, HIF-1 α é reconhecida pela proteína supressora de tumor pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein). A proteína pVHL então recruta a maquinaria de ubiquitinação, levando a degradação de HIF-1 α via proteassomo 26S. Assim, apesar de sua transcrição constitutiva, a subunidade HIF-1 α é continuamente degradada de forma dependente da presença de oxigênio (JAAKKOLA et al. 2001; WENGER 2002).

Em condições de hipóxia, a enzima PHD não possui substrato (oxigênio) para a hidroxilação de HIF-1 α , permitindo estabilização e acúmulo da mesma no citoplasma. Uma vez estável, a subunidade HIF-1 α é translocada para o núcleo onde dimeriza com HIF-1 β (MAHON et al. 2001). HIF liga-se à região consenso no DNA CGTC (HBS, HIF-1 DNA binding site),

presente na região HRE de muitos genes regulados pelo nível de oxigênio. As regiões HRE geralmente apresentam diferentes sítios, para a ligação de diferentes fatores, possibilitando a atuação de diversos fatores juntamente com HIF. Apesar desses fatores não serem elementos induzidos por hipóxia, podem auxiliar na amplificação do sinal, ou mesmo conferir especificidade à resposta de diferentes tipos celulares (WENGER 2002).

Experimentos com camundongos knockout para HIF-1 α mostraram que os animais são inviáveis, sendo que os embriões morreram durante a gestação com má formação cardiovascular (KOTCH et al. 1999). Por outro lado, camundongos com apenas um alelo para HIF1- α desenvolvem-se normalmente. Porém, estes animais apresentam uma resposta fisiológica deficiente quando em hipóxia crônica, como hipertensão pulmonar, hipertrofia no ventrículo direito e retardo no desenvolvimento de policitemia. Esses resultados indicam que HIF apresenta não só um importante papel na resposta celular à hipóxia bem como desenvolve um importante papel na resposta sistêmica à hipóxia (YU et al. 1999). Ainda de acordo com essa idéia, foi demonstrado em animais knockout para o gene ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), a importância de HIF na placentação (ADELMAN et al. 2000).

Apesar de HIF ter sido primeiramente descrito como um fator induzido por hipóxia, hoje sabemos da presença de HIF estável em condições de normóxia em diferentes tipos celulares (STROKA et al. 2001), sugerindo uma regulação de HIF por outros fatores. Em condições de normóxia, células de cérebro de camundongo expressam HIF, tendo esse uma

aparente ligação com o controle do ritmo circadiano (CHILOV et al. 2001). Além disso, muitos fatores de crescimento e citocinas foram associados à estabilização de HIF-1 α em normóxia, como insulina, EGF (epidermal growth factor) e interleucina 1 β (WENGER 2002).

Em tumores, a taxa de proliferação celular e conseqüentemente o crescimento da massa tumoral muitas vezes é maior que o ritmo de vascularização do tecido tumoral. Com isso, são geradas áreas no tumor que são deficientes em oxigênio (regiões de hipóxia). A presença de regiões hipóxicas em tumores é associada a um mau-prognóstico (YANG et al. 2007).

Nessas regiões hipóxicas, há um aumento no metabolismo anaeróbico das células, como meio de obtenção de energia. Esse aumento do metabolismo é acompanhado por adaptações celulares, sendo que parte delas são dependentes de HIF-1 tais como o aumento do transporte de oxigênio via eritropoietina, sinalização para angiogênese via VEGF, aumento na glicólise e tamponamento do meio interno (VAUPEL e HARRISON 2004).

Muitos dos tumores humanos analisados por imunistoquímica mostraram uma alta expressão de HIF-1 α (ZHONG et al. 1999; TALKS et al. 2000) Essa superexpressão de HIF-1 α em tumores é frequentemente associada a expressão de VEGF e conseqüente neo-vascularização. Já foi demonstrado *in situ* que em câncer de mama HIF-1 α possui importante papel no início da angiogênese (BOS et al. 2001).

O estresse fisiológico causado pela hipóxia no microambiente tumoral pode levar a duas respostas distintas das células transformadas Em um

caso, esse estresse seria responsável por impedir o crescimento e causar a morte celular. Por outro lado, a hipóxia poderia agir como um fator de seleção, possibilitando a progressão maligna por selecionar células progressivamente resistentes a radioterapia e a drogas (VAUPEL et al. 2001; HOCKEL e VAUPEL 2001b). Sabemos que a baixa tensão de O₂ reduz a eficiência da radioterapia, bem como de agentes citotóxicos dependentes de O₂, tais como: ciclofosfamida, carboplatin (Paraplatin[®]; Bristol-Myers Squibb; Princeton, NJ), carmustine (BiCNU[®]; Bristol-Myers Squibb), e melphalan (Alkeran[®]; Celgene Corporation; Warren, NJ) (TEICHER et al. 1990; LITTLEWOOD 2001). Em consequência, a expressão de HIF-1 α tem sido associada a uma baixa resposta a tratamentos e a mortalidade em estágios precoces de câncer cervical (BIRNER et al. 2000), carcinoma ovariano (casos com p53 mutante) (BIRNER et al. 2001) e câncer no esôfago (casos que expressam altos níveis de Bcl-2) (KOUKOURAKIS et al. 2001).

Em linhagens de melanoma ocular foi demonstrado que HIF1- α tem importante papel na aquisição de características de agressividade. Em condições de hipóxia, essas células apresentaram, *in vitro*, aumento da adesão celular em placa sensibilizada com colágeno IV, aumento da migração celular em ensaio de transwell e aumento da capacidade de invasão celular em matrigel. A expressão de HIF1- α nas células foi inibida por RNAi, resultando na redução da capacidade de adesão, migração e invasão celular (VICTOR et al. 2006).

A proteína Akt, ativada por PIP₃, estimula a proliferação e sobrevivência celular (Figura 1). Em melanoma é comum encontrar essa

proteína superexpressa, sendo essa considerada uma oncoproteína. A superexpressão de Akt em melanócitos não foi suficiente para gerar células transformadas quando cultivadas independente de ancoragem. No entanto quando cultivadas em ambiente hipóxico foram geradas células transformadas. Quando HIF1- α foi silenciado, mesmo as células superexpressando Akt e em hipóxia não foi gerado células transformadas. Esses resultados mostram que o potencial transformador de Akt é dependente de HIF1- α (BEDOGNI et al. 2005).

Operacionalmente, o estudo das adaptações celulares a condições de hipóxia tem sido feito de pelo menos duas maneiras: avaliação direta das respostas celulares em ambientes com tensão de oxigênio controlada (Câmara de hipóxia) ou utilizando-se substâncias que induzem respostas semelhantes à da hipóxia, que chamamos de agentes hipóxia-miméticos, como por exemplo o cloreto cobaltoso. O cloreto cobaltoso (CoCl_2) é um sal inorgânico que atua como quelante de íons. A enzima prolil-4-hidroxilase (PHD) liga-se a oxo-2-glutarato e a vitamina C e a Fe(II). O CoCl_2 em meio de cultura quela o ferro, inibindo a ação da PHD, por consequência HIF-1 α não é hidroxilado, permanecendo estável. Como resultado os genes-alvo de HIF são ativados. Por esse motivo, o composto CoCl_2 é muitas vezes utilizado como um agente para mimetizar hipóxia.

1.3 GALECTINA-3

As lectinas são proteínas não enzimáticas e distintas de anticorpos que se ligam especificamente a estruturas de carboidratos. As galectinas são uma família de proteínas que pertence a grande família das lectinas animais, com afinidade primária por compostos que contêm β -galactosídeos, tendo uma estrutura conservada de aproximadamente 130 aminoácidos, conhecido como domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD - carbohydrate recognition domain). Atualmente são conhecidas 15 tipos de galectinas, que são divididas em 3 grupos:

- * Protótipos: galectinas que apresentam somente um CRD, podendo forma homodímeros;
- * Repetições em *tandem*: galectinas que possuem 2 CRD não idênticos ligados por um peptídeo;
- * Quimera: apresenta somente um membro, a galectina-3.

A galectina-3, transcrita pelo gene *LGALS3A*, possui uma massa molecular aparente de aproximadamente 30kDa, é caracterizada por apresentar um CRD na região COOH terminal e uma região N-terminal, ligados por uma seqüência similar a colágeno.

A seqüência similar a colágeno é rica em glicina, tirosina e prolina e é sítio possível de clivagem por metaloproteinases da matriz extracelular. A região N terminal, rica em prolina e glicina, contém sítio de fosforilação em serina (Ser⁶) que é importante para sinalização e compartimentalização celular da galectina-3. A região COOH terminal, além de possuir a região de

reconhecimento de carboidratos, possui o *motif* anti-apoptótico NWGR (asparagina, triptofano, glicina e arginina). Esse *motif* é similar ao *motif* presente na oncoproteína Bcl-2, que leva a formação de dímeros, sinalizando uma translocação para a mitocôndria, onde impediria a liberação de caspases, agindo como antiapoptótico. Esse *motif* está presente somente na galectina-3 humana, porém a galectina-3 murina também apresenta uma ação anti-apoptótica quando no citoplasma.

A galectina-3 é considerada uma proteína pleiotrófica uma vez que suas funções são determinadas conforme a sua localização celular. Quando presente no núcleo é associada ao splicing alternativo (DAGHER et al. 1995), regula a expressão gênica (LIU et al. 2002) e pode atuar como supressora de tumor (CALIFICE et al. 2004). Quando presente no citoplasma, no entanto, galectina-3 apresenta funções diferentes, até opostas, apresentando ação pró-tumoral por aumentar capacidade de invasão, sobrevivência e crescimento celular, promoção da angiogênese e ação anti-apoptótica (YOSHII et al. 2002; CALIFICE et al. 2004). Ainda no citoplasma auxilia na homeostase da mitocôndria em condições de estresse oxidativo (MATARRESEA et al. 2000; LIU et al. 2002). Os mecanismos de transporte de galectina-3 para o núcleo ainda não são totalmente esclarecidos, mas sabemos que pode ocorrer tanto por difusão quanto por transporte ativo (NAKAHARA et al. 2006).

Quando presente na matriz extracelular ou no meio extracelular galectina-3 pode apresentar função pró-apoptótica por interação com β 1-integrina (ZHUO et al. 2008). Apresenta também papel importante na

comunicação célula-célula e célula-matriz (INOHARA e RAZ 1995; OCHIENG et al. 1998), nesse caso pode favorecer a mobilidade celular (FUKUSHI et al. 2004), além de ser importante para adesão e espalhamento de celular em suspensão (BAPTISTE et al. 2007). A secreção de galectina-3 não ocorre pela via clássica, dependente do complexo de Golgi, pois não possui peptídeo sinal (SATO et al. 1993). A forma de secreção dessa proteína ainda não é bem esclarecida, mas sabemos que a porção N-terminal é um dos responsáveis por esse processo (MEHUL e HUGHES 1997; MENON e HUGHES 1999; GONG et al. 1999). A secreção pode ainda ocorrer com o auxílio de outras moléculas, sendo a proteína levada diretamente para a membrana celular ou via vesículas. Nesse sentido, SHALOM-FEUERSTEIN et al. (2008) demonstraram que nanoagregados de K-RAS ativado recrutam galectina-3 para próximo do folheto intracelular da membrana plasmática. E, ainda a reorganização do citoesqueleto associado a atividade de caspase-1 parece levar a secreção de galectinas (KELLER et al. 2008).

Em nosso laboratório, utilizando o modelo de progressão de melanoma murino demonstramos que o gene *Igals3a*, tem sua transcrição regulada por metilação da região promotora, promovendo o silenciamento da transcrição gênica durante a progressão de melanoma murino. Foi demonstrado ainda que o uso da droga 5'-aza-2'-deoxicitidina, inibidora de DNA metiltransferase, foi capaz de reverter o fenótipo da célula, induzindo a expressão de galectina 3 *de novo* (TEIXEIRA 2007).

Em glioma humano foi mostrado que galectina-3 está altamente expressa na região perinecrótica do tumor (região que circunda as regiões necróticas do tumor e apresentam baixa tensão de oxigênio), ao contrário do restante do tumor que expressa níveis baixos de galectina-3 (NEDER et al. 2004). Esse dado sugere que a expressão de galectina-3 poderia ser importante na adaptação celular ao novo ambiente. Em sistemas celulares diversos, a exposição a condições de hipóxia está relacionada à transcrição do gene de galectina-3 e ao acúmulo da proteína (GREIJER et al. 2005; HU et al. 2006).

Sabemos que em nosso modelo galectina-3 está silenciada por metilação do promotor. Sabemos ainda que em situações de deprivação de oxigênio galectina-3 pode passar a ser expressa. Esse estudo teve como objetivo estudar a influência da hipóxia sobre a transcrição e modificação pós-traducional de galectina-3, bem como alteração na migração celular em nosso modelo de melanoma murino.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da hipóxia sobre a expressão gênica e alterações pós-traducionais de galectina-3 em modelo de progressão de melanoma murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análise de alterações na transcrição gênica e no acúmulo protéico de galectina-3 em melan-a quando submetida à hipóxia e exposição a CoCl_2 .
 2. Análise de alterações pós-traducionais de galectina-3 em melan-a quando submetida à hipóxia e exposição a CoCl_2 .
 3. Comparar a expressão de galectina-3 em Tm1 submetida à hipóxia, tratada com CoCl_2 e tratada com a droga inibidora de metilação 5-Aza-2-dexocitidina.
 4. Comparar a expressão de galectina-3 em Tm1 e Tm1 transfectada com vetor contendo o gene de galectina-3 e Tm1 transfectada somente com o vetor vazio, quando submetidas à hipóxia e a exposição ao CoCl_2 .
-

5. Avaliar o impacto funcional da exposição das células a condições de hipóxia ou ao tratamento com CoCl_2 , avaliando a resposta de migração celular das células estudadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS

A linhagem Melan-a foi mantida em meio RPMI 1640 (Cultilab), pH 6,9, acrescido de soro fetal bovino (5% v/v) (Cultilab) e éster de forbol (PMA, forbol 12-miristato 13-acetato, 200nM) (Sigma), em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ a 37°C.

As linhagens Tm1 transfectada com o gene humano da galectina-3 (Tm1MG3) ou transfectada com o vetor vazio (Tm1MN3) foram mantidas em condições semelhantes, na presença do antibiótico G418 (1 mM) (Sigma).

3.2 CONDIÇÕES

3.2.1 Hipóxia

As células foram colocadas em câmara de hipóxia (Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg), e todo o ar foi substituído por uma composição de 95% nitrogênio e 5% gás carbônico. Após 10 minutos de troca de gases a câmara foi hermeticamente fechada e colocada em atmosfera úmida a 37°C por diferentes tempos.

Na câmara de hipóxia também foi colocado um oxímetro (Dräger – PAC 3000) para monitoramento da concentração de oxigênio. A pressão

parcial de oxigênio foi sempre $\leq 2\%$, portanto menor do que um décimo da pressão parcial do ar atmosférico.

3.2.2 Tratamento com cloreto cobaltoso

O cloreto cobaltoso age como quelante de metais, o que impede a ação das PHD/HPH (*prolyl hydroxylase domain containing/HIF prolyl hydroxylase*), estabilizando HIF, possibilitando a ação do mesmo, levando a um quadro celular mimético ao quadro celular em hipóxia.

Ao meio de cultura das células foi adicionado cloreto cobaltoso (Sigma) de forma a obter a concentração final de $100\mu\text{M}$. Em seguida, as células foram colocadas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 a 37°C , por diferentes tempos.

3.3 ANÁLISE PROTÉICA

3.3.1 Meio condicionado

Após o período de tratamento das células, o sobrenadante das células foi recuperado e armazenado em freezer -70°C .

Para concentrar as amostras foi utilizado o filtro Centricon (Millipore) "cut-off" de 3 kDa. As amostras foram aplicadas no filtro e centrifugadas por 1880 g, a 4°C por no mínimo 6 horas.

A concentração protéica no meio condicionado foi determinada utilizando o *kit* "Ensaio de Proteína BCA – Método de Lowry Modificado" da BioAgency (São Paulo).

3.3.2 Extrato protéico

Para obtenção dos extratos protéicos as células ainda aderidas à placa foram lavadas duas vezes com PBS-EDTA (1X) gelado (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ e 1 mM EDTA). Em seguida as células foram desaderidas utilizando tripsina (Gibco) e centrifugadas por 3 minutos, 400 g. O pellet de células foi ressuscitado em tampão de lise da fração citoplasmática (50mM Tris (pH7,5), 150mM NaCl, 5mM EDTA (pH8,0), 0,1% Triton X-100, 1mM Na₃VO₄, 2µg/mL aprotinina e 1mM PMSF). Foi adicionado sobre a placa o tampão para separação da matriz extra celular (10mM Tris-HCl (pH 7,4), 1% de Triton X-100, 1% de desoxicolato de sódio, 1mM de PMSF e 2µg/mL de aprotinina). Ambas as condições foram incubadas por 15 minutos a 4°C. Após esse período com a auxílio de um cell scraper a fração de matriz extra celular foi colocada em um tubo novo e, os lisados foram centrifugado por 15 minutos, 15700 g, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e as amostras armazenadas em freezer -20°C.

Nas amostras com tampão de lise de fração citoplasmática o pellet foi congelado em freezer -20°C, nas amostras com tampão para separação da matriz extra celular, o pellet foi ressuscitado em tampão de amostra para SDS-PAGE 6X redutor (375mM de Tris-HCl (pH 6,8), 12% SDS, 30% glicerol e 0,6M de DTT) e armazenado em freezer -20°C.

Para determinar a concentração de proteína nos extratos foi utilizado o Kit “Ensaio de Proteína BCA – Método de Lowry Modificado” da BioAgency.

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação das proteínas por ponto isoelétrico foi feita em fita IPG comercial Immobiline DryStrip pH 3-10 com 11cm, linear (GE Healthcare). Primeiramente as amostras foram adicionadas a um tampão de hidratação 1,225x (9,8M uréia, 2,45% CHAPS e azul de bromofenol), 2% de tampão IPG (tampão comercial de acordo com fita utilizada- GE Healthcare) e 18mM de DTT, em um volume final de 200 μ L. A amostra foi incubada overnight com a fita para que essa absorvesse toda a amostra. Para focalização Isoelétrica as fitas IPG foram colocadas no aparato Multiphor II System (Amersham Pharmacia Biotech) ou no aparato Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) e submetidas ao programa de voltagem e tempo de acordo com a recomendação do fabricante. O programa varia de acordo com o tamanho da fita de IPG e a faixa de pH que é abrangida. Após a focalização isoelétrica, as fitas de IPG foram armazenadas no freezer -80°C.

Para realizar a separação das proteínas por massa molecular aparente as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Esse gel é composto por duas partes. A parte inferior do gel, chamado gel de corrida contém Tris 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1%, acrilamida 12%, Persulfato de Amônio (APS) 0,03% e, N,N,N tetra metilendiamina (TEMED, Sigma); e a parte superior, chamado gel de empilhamento contém, Tris 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045%, e TEMED. Caso a separação por massa molecular aparente seja das amostras focalizadas de acordo com o ponto isoelétrico não é feito o gel de empilhamento. Nesse caso as fitas serão reduzidas e alquiladas em solução

Tris-HCl 50mM, uréia 6M, SDS 2%, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (v/v) e DTT 65mM sob agitação por 15 minutos e por 15 minutos adicionais nesta mesma solução substituindo-se o DTT por iodoacetamida 100mM. Após esse processo, as fitas de IPG são colocadas sobre o gel de corrida, fixada sua posição utilizando solução de 1% agarose diluída em tampão de corrida (250mM Tris, 0,19mM de glicina e 0,1% de SDS). O gel é submetido inicialmente a uma diferença de potencial constante de 50 V até que a amostra atinjam o gel de corrida. Em seguida a voltagem pode ou não ser elevada até 80 V. Para o gel de separação das amostras focalizadas, aplica-se uma corrente constante de 10 mA, overnight. A eletroforese ocorre completamente submersa em tampão de corrida.

Após a corrida o gel foi corado com Coomassie blue G ou as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF.

3.3.4 Western Blot

Para coloração com Coomassie blue G primeiramente o gel foi colocado em solução fixadora (50% etanol e 10% ácido acético) por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi colocado em solução de Coomassie G-250 (0,1% Coomassie G-250, 2% ácido fosfórico, 10% sulfato de amônia e 20% metanol) e incubado sob agitação a temperatura ambiente, overnight. No dia seguinte o gel foi colocado em solução 25% metanol sob agitação para descoloração. Após descoloração o gel foi seco e guardado.

O processo de transferência para membrana de PVDF ocorre sob voltagem constante de 100V, por uma hora, imerso em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM Glicina e 20% metanol). Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada com PBS 1x, 0,05% Tween 20, 5% leite em pó. Essa incubação tem como objetivo bloquear os sítios inespecíficos na membrana. Após esse bloqueio a membrana foi incubada com os anticorpos desejados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para *western blot*

Anticorpo primário	Concentração	Anticorpo secundário	Concentração
M3/38	1:20	α -rat peroxidase	1:1000
α -N-PHOS	1:500	α -chicken peroxidase	1:1000
α -PHOS	1:500	α -chicken peroxidase	1:1000
α - β actina	1:1000	α -mouse peroxidase	1:1000/ 1:2000

A revelação da membrana foi feita usando-se solução de tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB) (7,5 mL de uma solução de Tris-HCL 0,05% pH7,8, NaCl 150 mM. 10 μ L de H₂O₂ e 3,75 mg de DAB) ou utilizando o *kit* de revelação para ECL (Amersham).

3.4 MIGRAÇÃO CELULAR

Para realizar esse ensaio foram utilizadas placas de 24 poços com 12 insertos de *transwell*, com poro de 8,0 μ m (Corning).

Os insertos foram previamente sensibilizados com laminina-1 para criar um gradiente de concentração. Foi adicionado na parte inferior de cada inserto, somente meio, meio com 2,5; 5,0 ou 10 μ g/mL de laminina-1. A placa com os *transwell* foi incubada por 1 hora em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período os insertos foram retirados dessa solução e colocados sobre meio contendo 10 μ g/mL BSA para bloqueio de sítios inespecíficos. Caso a migração fosse em condições miméticas de hipóxia também foi acrescentado CoCl₂, concentração final de 100 μ M. Os insertos foram incubados nessas condições por no mínimo 1 hora em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Células em cultura foram desaderidas e ressuspensas de forma a conter 2.10⁵ ou 10⁶ células em cada 0,5mL. As células para ensaio em normóxia e hipóxia foram ressuspensas em meio RPMI pH 6,9. Células para ensaio em hipóxia mimética foram ressuspensas em meio RPMI (pH6, 9) com 100 μ M de CoCl₂.

Em cada inserto foi aplicado 0,5mL de suspensão celular e as placas foram colocadas na câmara de hipóxia (95% nitrogênio, 5% gás carbônico) e em seguida em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C ou somente em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. As placas foram incubadas nessas condições por 4 ou 24 horas.

Após o período de migração as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 1% por 15 minutos e em seguida coradas com azul de toluidina (1% azul de toluidina, 1% bórax) por 5 minutos. Após coloração, as células presente na parte superior do inserto foram removidas com um

cotonete e os insertos lavados com PBS (1x) e com PBS contendo BSA (1%) alternadamente.

As células foram contadas em microscópio de luz invertido, no aumento de 40x, em diferentes campos, de forma randomizada.

Para quantificação do corante, os insertos foram colocados em solução de SDS 1% e incubados por 1 hora a 37°C. De cada amostra foi retirado 100µL e colocado em placa de 96 poços. A placa foi colocada em leitor (Microplate Reader da BioRAD Model 550) e submetido a leitura usando filtro de 595nm.

3.5 RT-PCR REAL TIME

3.5.1 Extração de RNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), sendo uma otimização do método de extração de RNA desenvolvido por Chomczynski & Sacchi em 1987. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

3.5.2 RT-PCR

A síntese de cDNA foi feita a partir do RNA extraído como descrito no item anterior.

A 5 µg de RNA total foi adicionado 1µL de Oligo dT 500µg/mL (Invitrogen), 1µL de dNTPs 10mM (Invitrogen) e água Depc

(dietilpirocarbonato) somando um volume final de 12 μ L. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e em seguida resfriada rapidamente em gelo. A reação, após breve centrifugação, foi adicionada 4 μ L de tampão 5x *first-strant* (Invitrogen), 2 μ L de DTT 0,1M (Invitrogen). A reação foi incubada por 2 minutos a 42°C e em seguida foi adicionado 1 μ L (200 unidades) de Superscript II (Invitrogen), permanecendo a reação por mais 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada aquecendo-a a 70°C por 15 minutos.

As amostras foram estocadas a -20°C.

3.5.3 Real time

Para análise de expressão gênica em tempo real foi utilizado a metodologia do SYBR[®] Green. A fluorescência foi captada pelo termociclador Rotor-Gene RG-3000 (Corbett). Para um volume final de 20 μ L por reação foram utilizados: 2,0 μ L de tampão de PCR 10x (Invitrogen), 0,6 μ L de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 0,4 μ L de dNTPs 10mM (Invitrogen), 0,2 μ L de cada *primer* 20mM, 0,16 μ L ou 1U/ μ L de Taq PLATINUM (Invitrogen), 1 μ L de DMSO (Sigma), 0,2 μ L de SYBR[®] Green (Invitrogen) e 1 μ L de cDNA.

Os *primers* para Galectina-3 e β -actina, já avaliados em nosso laboratório, encontram-se na tabela a seguir (Tabela 2):

Tabela 2 - Primers utilizados para *real time PCR*

Primer	Seqüência	Seqüência
Galectina-3 murina	CCTGGAGCTTATCCTGGTCA	GTCACCACTGATCCCCAGTT
B-actina murina	TGTTACCAACTGGGACGACA	CTGGGTCATCCTTTCACGGT

As condições da amplificação foram:

- desnaturação do DNA por 5 minutos a 95°C
- 40 ciclos com:
 - desnaturação do cDNA por 30 segundos a 95°C
 - anelamento do cDNA por 30 segundos a 60°C
 - extensão do cDNA por 30 segundos 72°C

A análise dos dados foram feitas utilizando o software Roto Gene 6 e a razão foi calculada conforme publicado por PFAFFL (2001):

$$\text{Razão} = (E_{(\text{gene alvo})}^{\Delta\text{CT}(\text{gene alvo})})/E_{(\text{gene referencia})}^{\Delta\text{CT}(\text{gene referencia})}$$

Sendo $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{controle}} - \text{CT}_{\text{amostra}}$

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 4, utilizando ANOVA de uma via.

3.7 DENSITOMETRIA

A densitometria dos resultados de *wester blot* foram realizadas no programa *ImageJ*. As bandas de interesse foram selecionadas, e o programa gerou um gráfico com a variação da intensidade de pixel de cada banda. A curva foi então integrada, permitindo a cálculo da razão entre a banda de interesse (galectina-3) e a banda referência (β -actina ou bandas do gel de Coomassie). A razão entre a condição controle (normóxia) e a condição de interesse (hipóxia ou tratamento com CoCl_2) foi utilizado como indicador na mudança do acúmulo de proteína.

4 RESULTADOS

4.1 O AMBIENTE HIPÓXICO INDUZ AUMENTO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE GALECTINA-3, PARALELO AO AUMENTO DE GALECTINA-3 ASSOCIADA À MATRIZ EXTRACELULAR

O fator HIF-1 α é um conhecido fator responsivo a hipóxia. Sabemos que esse fator pode ser estabilizado por outras vias em condições de normóxia. Melan-a exposta a normóxia ou a hipóxia expressa HIF-1 α de forma estável (Figura 2).

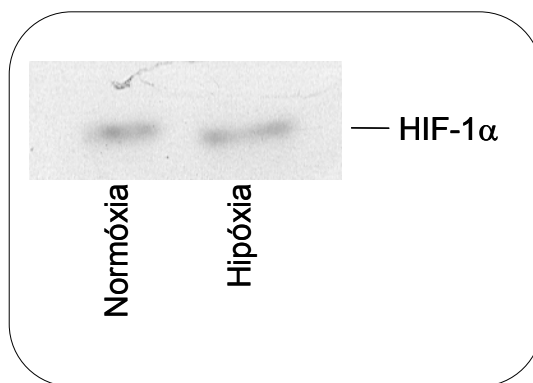


Figura 2 - HIF-1 α é expresso de forma estável em melan-a em condições de normóxia.

Eletroforese de proteínas da fração citoplasmática de melan-a submetidas a condições de normóxia ou hipóxia por 24 horas. O fator de transcrição, HIF-1 α aparece de forma estável nas duas condições.

Para avaliar o efeito do ambiente hipóxico na transcrição gênica de galectina-3 foi realizado *real time PCR* em células melan-a submetidas à

normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 por 4 ou 24 horas. Cada condição foi avaliada em triplicata, sendo para cada amostra calculada a razão de Pfaffl (PFAFFL 2001) entre o gene alvo (galectina-3) e o gene referência (β -actina). A razão final para cada condição foi a média das razões calculadas entre as triplicatas.

A análise transcricional do gene *Igals3a* mostrou um rápido e significativo aumento da transcrição gênica nas células tratadas com CoCl_2 por 4 horas (razão de Pfaffl 1,30, desvio 0,21, $p < 0,001$). O mesmo efeito não foi observado nas células submetidas ao ambiente hipóxico pelo mesmo período, esse não apresentou diferença em relação às células em normóxia (razão de Pfaffl 1,03, desvio 0,18, $p > 0,05$). Por outro lado, a exposição ao ambiente hipóxico (razão de Pfaffl 2,02 desvio 0,6) ou o tratamento com CoCl_2 (razão de Pfaffl 2,11 desvio 0,41) por 24 horas mostrou um significativo aumento da transcrição gênica ($p < 0,001$), sendo que esse aumento foi similar nas duas condições ($p > 0,05$) (Figura 3).

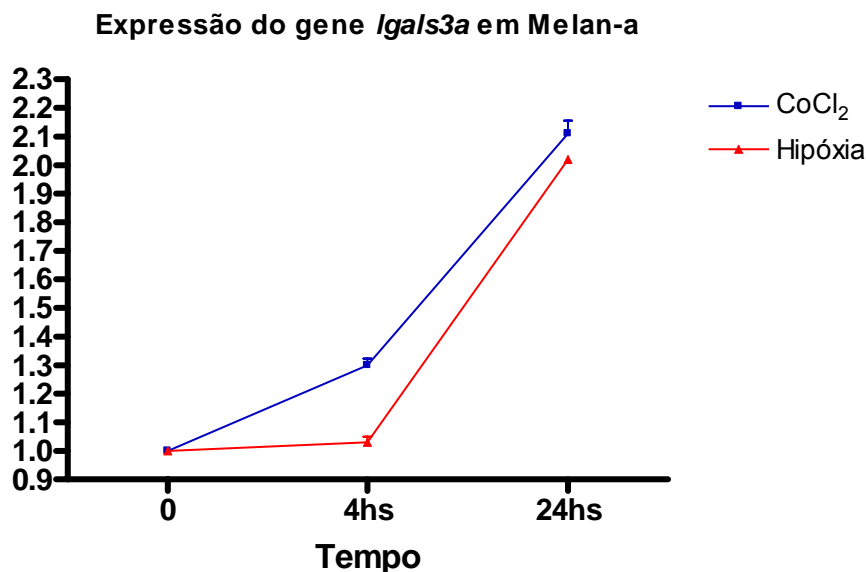


Figura 3 - O ambiente hipóxico induz aumento da expressão do gene *Igals3a*.

Expressão do gene de galectina-3 na linhagem melan-a submetida às condições de normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl₂ por 4 horas ou 24 horas. A expressão foi avaliada por *real time PCR*; como medida foi utilizada a razão entre o gene alvo (galectina-3) e o gene referência (β -actina). O tratamento com CoCl₂ apresenta um efeito indutor da transcrição gênica com 4 horas de exposição, porém o mesmo efeito não é observado em hipóxia. A exposição por 24 horas ao tratamento com CoCl₂ ou a hipóxia, no entanto, demonstrou similar efeito indutor na transcrição gênica.

Para verificar se o ambiente hipóxico poderia alterar o acúmulo de galectina-3 foi realizado eletroforese protéica seguida de *western blot* para as frações solúveis (correspondendo às proteínas citoplasmáticas), frações insolúveis (correspondendo à matriz extracelular) e para o meio condicionado dessas células. Não foi observado alteração no acúmulo de proteínas solúveis em ambiente hipóxico ou submetidas a tratamento com CoCl₂ por 4 ou 24 horas comparado a normóxia (Figura 4).

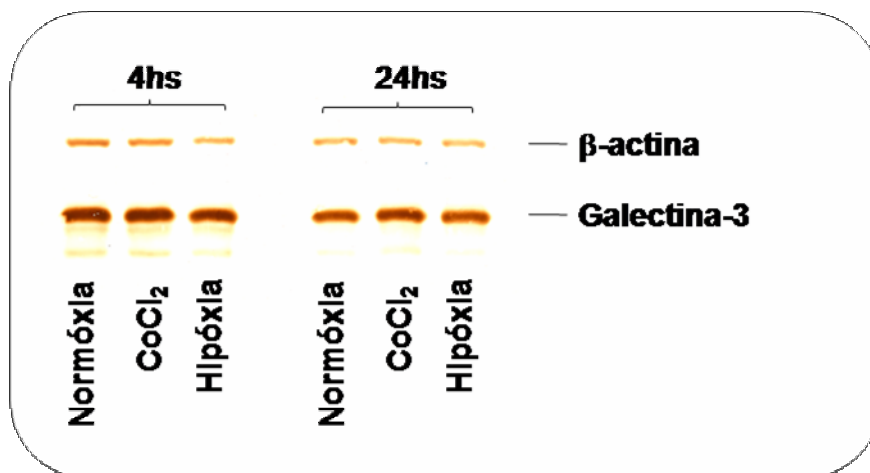


Figura 4 - O ambiente hipóxico não altera o acúmulo de galectina-3 citoplasmática.

Eletroforese de proteínas da fração citoplasmática de melan-a submetidas a condições de normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl₂ por 4 horas ou 24 horas. As concentrações citoplasmáticas de galectina-3 permanecem inalteradas frente às diferentes condições. O controle de massa foi feito com a proteína β-actina.

Para análise do meio condicionado, o mesmo foi concentrado por ultradiafiltração. A análise por densitometria mostrou menor acúmulo de galectina-3 no meio condicionado de células submetidas a hipóxia quando comparada a células submetidas ao tratamento com CoCl₂ ou a normóxia por 4 horas (Figura 5). O mesmo ensaio, realizado com amostras submetidas às diferentes condições por 24 horas, não mostrou galectina-3 em nenhum das condições (dados não mostrados).

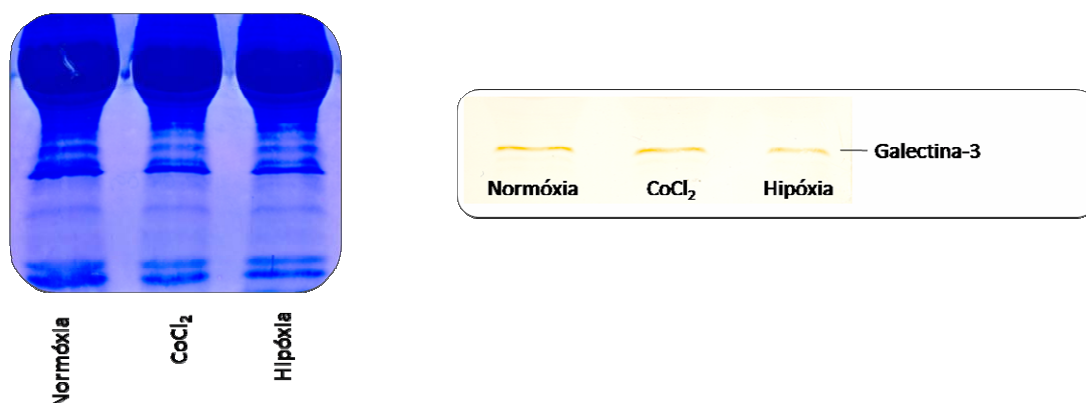


Figura 5 - O ambiente hipóxico inibe a secreção de galectina-3 solúvel para o meio extracelular.

Eletroforese do meio condicionado concentrado de melan-a submetida às condições de normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl₂ por 4 horas. Análise por densitometria mostrou diminuição da secreção de galectina-3 solúvel para o meio extracelular em condições de hipóxia. Como controle de massa foi utilizado gel de SDS-PAGE corado com Coomassie blue.

A análise protéica da matriz extracelular mostrou acúmulo de galectina-3 quando as células são submetidas ao tratamento com CoCl₂ ou submetidas à hipóxia por período de 24 horas. O mesmo efeito não foi observado nas células submetidas às diferentes condições por período de 4 horas (Figura 6). O acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular é dependente de um estímulo prolongado, tanto para o tratamento com CoCl₂ quanto para a exposição ao ambiente hipóxico.

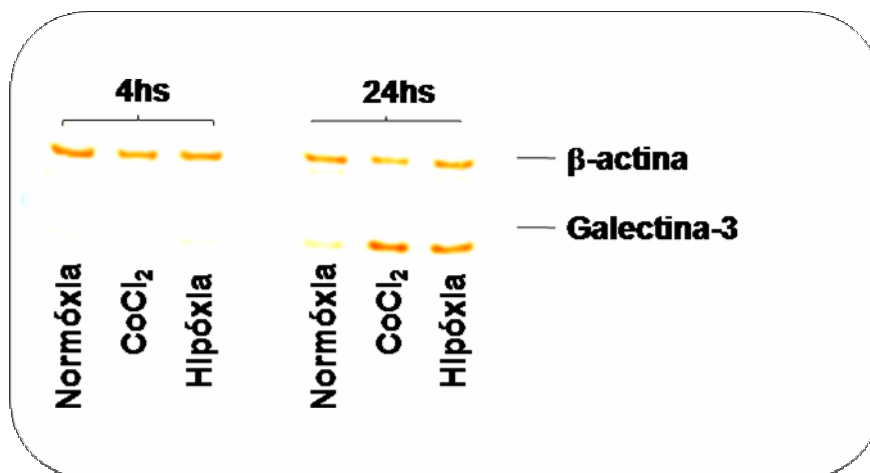


Figura 6 - O ambiente hipóxico induz o acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular.

Eletroforese de proteínas insolúveis (matriz extracelular) de melan-a submetida às condições de normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 por 4 horas ou 24 horas. Não observamos a presença de galectina-3 nas diferentes condições após 4 horas de tratamento. O tratamento com CoCl_2 e o ambiente hipóxico por 24 horas foram capazes de induzir um acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular. Para controle de massa foi utilizado a proteína β -actina.

4.2 O AMBIENTE HIPÓXICO NÃO INDUZ EXPRESSÃO *DE NOVO* DE GALECTINA-3 SILENCIADA POR METILAÇÃO DO PROMOTOR

Dados anteriores do laboratório (TEIXEIRA et al. 2007) mostraram que Tm1 tratada com o agente inibidor de metilação 5-Aza-2-deoxicitidina por 72 horas recuperava parcialmente a expressão de galectina-3. Levantamos a hipótese se o ambiente hipóxico poderia alterar o padrão de metilação do promotor de galectina-3 que levaria a uma expressão *de novo* da proteína. Células Tm1 tratadas com CoCl_2 ou expostas ao ambiente hipóxico por 72 horas não apresentaram expressão *de novo* de galectina-3

(Figura 7). O acúmulo de galectina-3 gerado pelo tratamento com 5-Aza-2-deoxicitidina, tanto em ambiente de normóxia quanto em ambiente de hipóxia não diferem. Dados obtidos por densitometria indicaram que a razão entre a condição de normóxia e a condição de hipóxia foi de 1,16.



Figura 7 - Células Tm1 não expressam *de novo* galectina-3 em ambiente hipóxico.

Células Tm1 submetidas a tratamento com CoCl₂ ou a ambiente hipóxico por 72 horas não apresentaram expressão *de novo* de galectina-3. A expressão de galectina-3 só foi recuperada com o uso de 5-Aza-2-deoxicitidina, um agente inibidor de metilação. A exposição concomitante ao ambiente hipóxico e a 5-Aza-2-deoxicitidina não levou ao acúmulo de galectina-3 (dados obtidos por densitometria).

Eletroforese de proteínas da fração solúvel de Tm1. O gene de β-actina foi usado como controle de massa.

4.3 DIFERENTES REPOSTAS AO ESTÍMULO DE HIPÓXIA E AO TRATAMENTO COM CLORETO COBALTOSO

Células melan-a, Tm1, Tm1N3 e Tm1G3 foram expostas a normóxia, hipóxia ou a tratamento com CoCl_2 por 72 horas (Figura 8). O acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular foi similar nas diferentes condições em melan-a. Na linhagem Tm1G3 houve similar acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular em condições de normóxia e hipóxia. O mesmo efeito não foi observado no tratamento com CoCl_2 . Observamos diferentes respostas frente a hipóxia e ao tratamento com CoCl_2 .

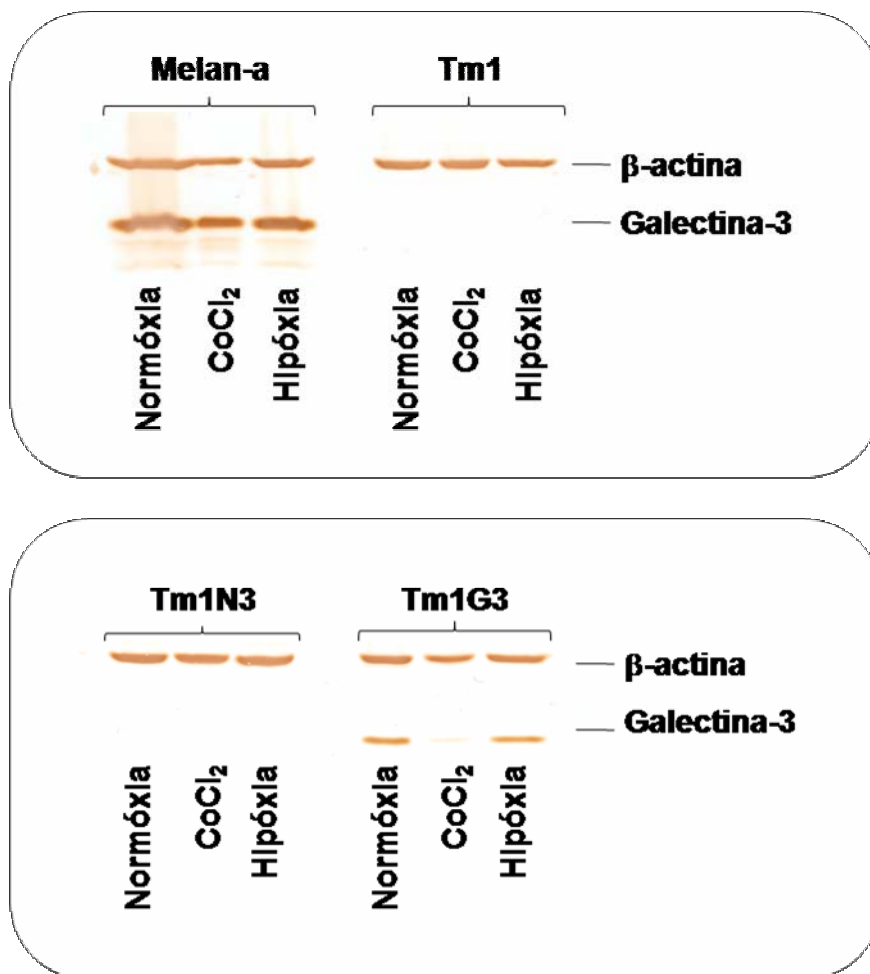


Figura 8 - Impacto da hipóxia e do tratamento com CoCl_2 sobre acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular.

Eletroforese de proteínas insolúveis (matriz extracelular) de melan-a, Tm1, Tm1N3 e Tm1G3 expostas a normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 por 72 horas. Células melan-a não apresentaram diferença no acúmulo de galectina-3 frente às diferentes condições. A linhagem Tm1G3 apresentou acúmulo de galectina-3 somente em normóxia e em hipóxia; sob o tratamento com CoCl_2 o acúmulo foi muito reduzido.

4.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DE GALECTINA-3 EM AMBIENTE HIPÓXICO

Para verificar possíveis modificações pós-traducionais em galectina-3, amostras de proteínas solúveis de melan-a submetidas a normóxia, hipóxia ou tratadas com CoCl_2 foram submetidas a separação eletroforética em duas dimensões. A primeira dimensão separou as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico, em um *range* de pH3,0 a pH 11,0. A segunda dimensão separou as proteínas de acordo com a massa molecular aparente.

A separação eletroforética em duas dimensões das amostras submetidas às diferentes condições por 4 horas mostrou duas formas eletroforéticas de galectina-3 em normóxia, com intensidades ou volumes similares. Diferentemente, o tratamento com CoCl_2 mostrou apenas uma forma eletroforética de galectina-3, próxima a forma mais ácida de galectina-3 encontrada em normóxia. A amostra protéica das células em hipóxia, assim como as amostras da normóxia, apresentou duas formas eletroforéticas de galectina-3, no entanto, a forma mais ácida apresentou alta intensidade, enquanto a forma mais básica apresentou intensidade muito baixa (Figura 9).

Já a separação eletroforética das amostras submetidas às diferentes condições por 24 horas apresentou tanto na amostra de normóxia como na amostra tratada com CoCl_2 apenas uma forma eletroforética de galectina-3. A amostra submetida à hipóxia apresentou duas formas eletroforéticas claras de galectina-3. Diferentemente da amostra de 4 horas de hipóxia, as duas formas eletroforéticas presentes na amostra de 24 horas estão muito próximas e ambas igualmente abundantes. Essas formas aparentemente

têm características eletroforéticas semelhantes à forma mais ácida da amostra exposta a hipóxia por 4 horas (Figura 9).

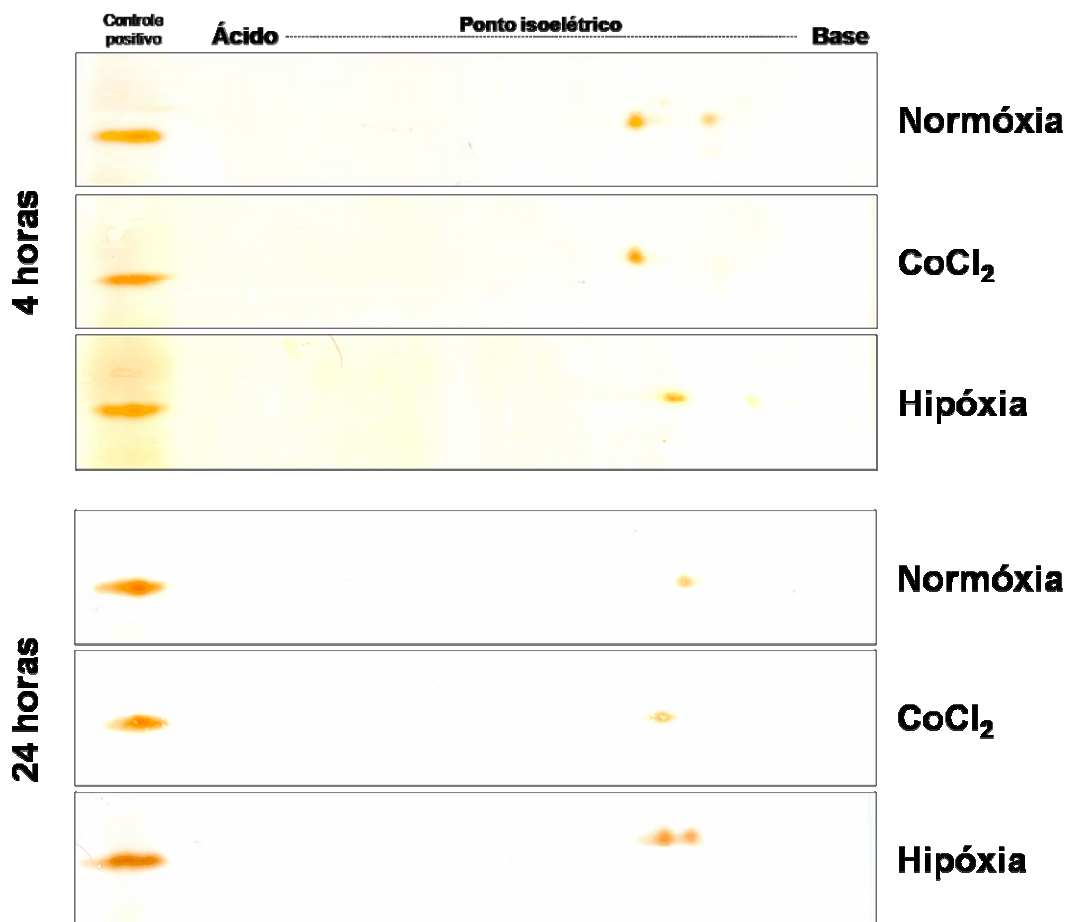


Figura 9 - Modificação pós-traducional de galectina-3 em condições de hipóxia.

Eletroforese em gel bidimensional das proteínas citoplasmáticas de melan-a exposta às condições de normóxia, hipóxia ou tratadas com CoCl_2 por 4 horas ou 24 horas. Separação de acordo com o ponto isoeétrico das proteínas (intervalo de pH 3,0 a pH 10,0) na primeira dimensão e separação por massa molecular aparente na segunda dimensão. As amostras foram marcadas para galectina-3. Amostra de normoxia e hipóxia por 4 horas apresentaram duas formas eletroforéticas de galectina-3, enquanto o tratamento com CoCl_2 apresentou apenas uma, próxima à forma mais ácida quando comparada com normóxia. Amostras de normóxia e tratamento com CoCl_2 por 24 horas apresentaram somente uma forma de galectina-3. Em condições de hipóxia por 24 horas, galectina-3 apresentou duas formas com pontos isoeétricos próximos, com localização próxima a forma mais ácida na amostra de hipóxia 4 horas. Como controle positivo da reação de western blot foi utilizado extrato de proteínas citoplasmáticas de melan-a em condições de normóxia submetidas somente a eletroforese de separação por massa molecular aparente.

A fosforilação é uma possível modificação pós-traducional em galectina-3. Amostras de melan-a submetidas a normóxia ou hipóxia por 4 horas foram tratadas com fosfatase ácida e submetidas a separação eletroforética em duas dimensões. A primeira dimensão separou as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico em um intervalo de pH 3,0 a pH 10,0. A segunda dimensão separou as proteínas de acordo com a massa molecular (Figura 10).

De acordo com o que foi observado na eletroforese anterior, em condições de normóxia, galectina-3 apresentou mais de uma forma eletroforética. O tratamento com fosfatase ácida não alterou esse padrão, mostrando que as modificações pós-traducionais ocorridas não são do tipo fosforilação. Ainda de acordo com a eletroforese anterior, em condições de hipóxia, há uma prevalência de formas mais ácidas. A avaliação densitométrica das formas eletroforéticas, mostra que em hipóxia a relação entre as formas mais acídicas e a forma de pI mais elevado é em torno de 13; enquanto em condições de normóxia, a relação é < 5 . O tratamento com fosfatase ácida eliminou as formas eletroforéticas mais ácidas, permanecendo apenas a forma mais básica, somente no extrato de células expostas à hipóxia. Assim, em condições de hipóxia por 4 horas há uma prevalência de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação.



Figura 10 - Fosforilação é uma importante modificação pós-traducional de galectina-3 em condições de hipóxia.

Eletroforese em gel bidimensional das proteínas solúveis de melan-a exposta às condições de normóxia ou hipóxia por 4 horas. Separação de acordo com o ponto isoeletrico das proteínas (intervalo de pH 3,0 a pH 10,0) na primeira dimensão. Separação pela massa molecular aparente na segunda dimensão. As amostras foram marcadas para galectina -3. Em condições de normóxia observamos modificações pós-traducionais que não correspondem à fosforilação, uma vez que o tratamento com fosfatase ácida não modificou o padrão de distribuição da galectina-3 de acordo com o ponto isoeletrico. Em condições de hipóxia observamos um enriquecimento de formas eletroforéticas mais ácidas, sendo essas sim modificações pós-traducionais tipo fosforilação, uma vez que o tratamento com fosfatase ácida eliminou essas formas de galectina-3.

Utilizamos então anticorpos desenvolvidos pela imunização de galinhas com o peptídeo da extremidade aminoterminal de galectina-3 em que o sexto resíduo, correspondente a um resíduo de serina encontrava-se fosforilado (colaboração com Emerson Bernardes e Maria Cristina Roque-Barreira) . Assim, anticorpos com especificidade para formas de galectina-3 fosforilada ou não (α N-PHOS) e para galectina-3 fosforilada somente (α PHOS) foram utilizados para avaliar se em condições que mimetizam hipóxia induziriam a fosforilação de galectina-3. A validação desses anticorpos foi feito por separação eletroforética com amostras de melan-a expostas a condições de normóxia ou a tratamento com CoCl_2 por 4 horas e tratadas ou

não com fosfatase ácida (Figura 11). Marcação com α N-PHOS gerou reconhecimento de duas bandas, apresentando massa molecular aparente de 30 kDa e 35 kDa. O tratamento com fosfatase ácida levou à perda do reconhecimento pelo anticorpo da banda de maior massa molecular aparente, sugerindo que o sítio de reconhecimento da proteína independe do seu estado de fosforilação. Marcação com α PHOS gerou o reconhecimento de uma banda de peso molecular aparente de 35kDa. O tratamento com fosfatase ácida levou a perda do reconhecimento da proteína pelo anticorpo, sugerindo que o anticorpo reconhece somente a proteína que tenha o seu sítio de reconhecimento fosforilado. Como controle de especificidade foi realizada marcação com o anticorpo monoclonal para galectina-3 M3/38. Análise por densitometria da expressão de galectina-3 não fosforilada reconhecida pelo anticorpo α N-PHOS (banda de 30kDa) mostrou um aumento aparente no acúmulo da proteína de 91% nas células tratadas com CoCl_2 .

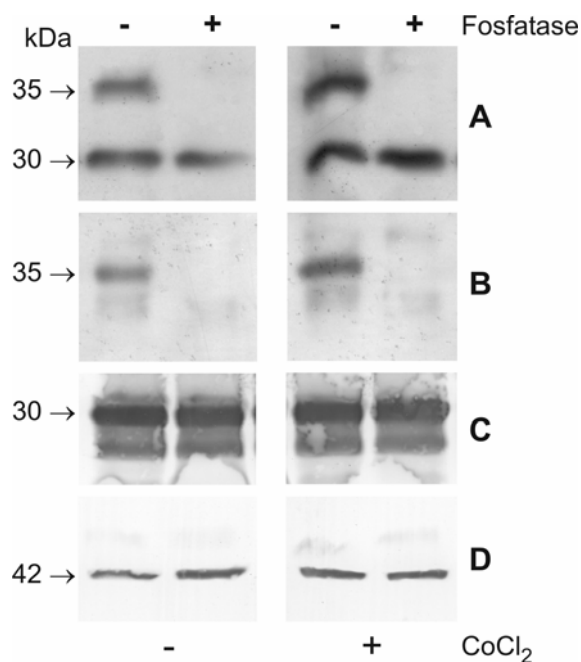


Figura 11 - Validação do anticorpo α N-PHOS e α PHOS para reconhecimento de porção fosforilada de galectina-3.

Eletroforese de extrato protéico de Melan-a em condições de normóxia e tratamento com CoCl_2 por 4 horas. **A:** Marcação com α N-PHOS gerou reconhecimento de duas bandas, apresentando massa molecular aparente de 30kDa e 35kDa. O tratamento com fosfatase ácida levou à perda da banda de maior massa molecular aparente, sugerindo que a proteína reconhecida pelo anticorpo pode ou não estar fosforilada. Análise por densitometria mostrou um aparente acúmulo da galectina-3 não fosforilada de 91% nas células tratadas com CoCl_2 . **B:** Marcação com α PHOS gerou o reconhecimento de uma banda de peso molecular aparente de 35kDa. O tratamento com fosfatase ácida levou a perda da banda, sugerindo que o anticorpo reconhece somente a proteína fosforilada. **C:** Marcação com anticorpo monoclonal para galectina-3 M3/38. **D:** Marcação com β -actina.

4.5 O AMBIENTE HIPÓXICO ESTIMULA A MIGRAÇÃO CELULAR. ESSA MIGRAÇÃO CELULAR NÃO É DEPENDENTE DE GALECTINA-3 EXTRACELULAR SOLÚVEL

Ensaio de migração celular por *transwell* foi realizado com a linhagem melan-a exposta a normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 por 4 horas

(Figura 12) ou 24 horas (Figura 13). Todas as condições foram feitas em triplicatas (amostras de um experimento). Os gráficos representam a média para cada condição.

A exposição às diferentes condições por 4 horas mostrou um significativo aumento da migração nas células tratadas com CoCl_2 quando comparada com as células que migraram sob condições de normóxia ($p < 0,001$). O número de células que migraram sob condições de hipóxia também apresentou um aumento significativo quando comparado ao número de células que migraram sob condições de normóxia ($p < 0,001$). No entanto, o aumento de migração sob o tratamento com CoCl_2 foi significativamente maior que o aumento gerado pelo ambiente hipóxico ($p < 0,001$). Esses efeitos foram observados na presença de laminina-1. O mesmo ensaio realizado sem laminina-1 não apresentou diferença significativa na migração em nenhuma das condições.

O ensaio de migração por *transwell* realizado por 24 horas nas mesmas condições mostrou não haver diferença significativa na migração em condições de normóxia ou no tratamento com CoCl_2 ($p > 0,05$) na presença de laminina-1. Por outro lado, em condições de hipóxia, houve uma menor migração quando comparado à migração em normóxia ou tratamento com CoCl_2 ($p < 0,001$). O mesmo ensaio sem laminina-1 mostrou não haver diferença na migração de células em normóxia ou em tratamento com CoCl_2 . Porém, as células em condições de hipóxia apresentaram um aumento significativo na migração ($p < 0,05$).

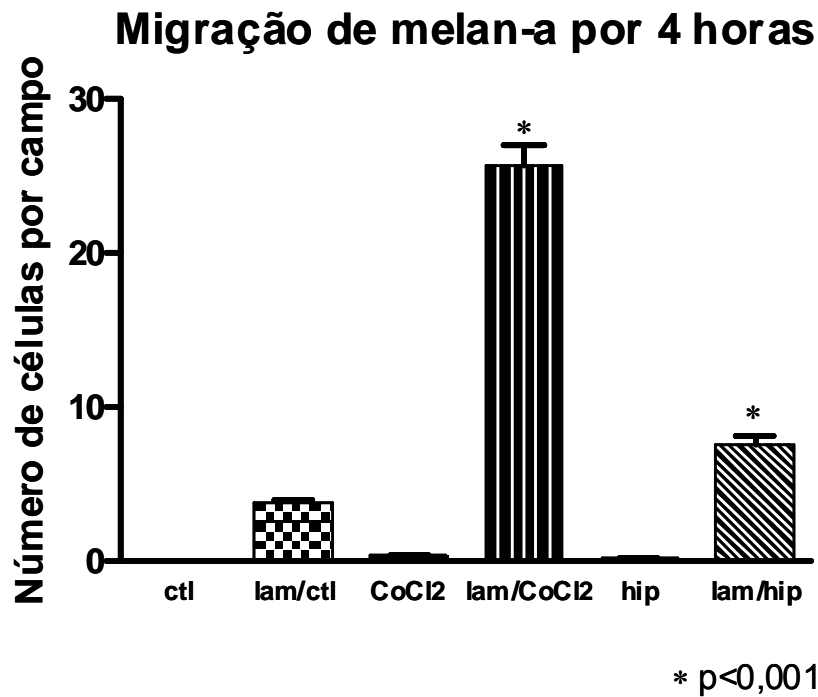


Figura 12 - Ambiente hipóxico como fator indutor de migração.

Ensaio de 4 horas de migração por *transwell* com 10^6 células por inserto, sensibilizados ou não com laminina-1. As células foram colocadas em condições de normóxia (Ctl), tratamento com CoCl_2 ou hipóxia (hip). Foram contadas as células que migraram e realizada análise paramétrica, one way anova, da contagem de campos randomizados em cada inserto. A análise mostrou uma maior migração sob tratamento com CoCl_2 , seguida de hipóxia e pouca migração em normóxia ($p < 0,001$), na presença de laminina-1. A ausência de laminina-1 não permitiu notar diferenças na migração das células nas diferentes condições (mostrar no gráfico e indicar a significância com asteriscos).

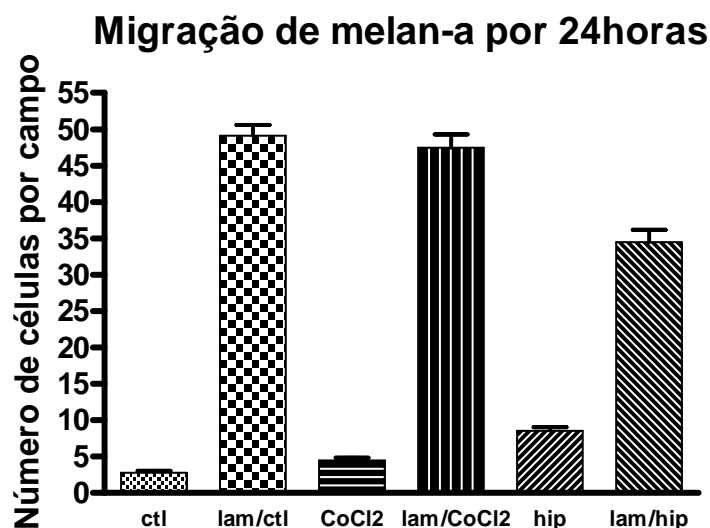


Figura 13 - Hipóxia por período prolongado gera perda do efeito indutor de migração.

Ensaio de 24 horas de migração por *transwell* com 10^6 células por inserto, sensibilizados ou não com laminina-1. As células foram submetidas a condições de normóxia (Ctl), tratamento com CoCl_2 ou hipóxia (hip). Foram contadas as células que migraram e realizado análise paramétrica, one way anova, da contagem de campos randomizados em cada inserto. A análise mostrou não haver diferença na migração entre células em normóxia e células tratadas com CoCl_2 ($p > 0,05$). Em condições de hipóxia houve uma menor migração ($p < 0,001$) na presença de laminina-1. A migração celular na ausência de laminina-1, no entanto, mostrou-se maior em hipóxia ($p < 0,05$), não havendo diferença na migração em normóxia e sob tratamento com CoCl_2 .

Para investigar um possível papel de galectina-3 solúvel extracelular na sinalização para migração celular em condições de normóxia e tratamento com CoCl_2 , por 4 horas foi realizado ensaio de migração em *transwell* na presença de lactose (2 ensaios independentes) (Figura 14). A lactose é um dissacarídeo capaz de interagir com a porção C terminal da galectina-3, inibindo sua ligação com receptores de superfície. A sacarose, também um dissacarídeo que não tem afinidade pela porção C terminal de galectina-3, foi utilizada como controle negativo do ensaio. O ensaio mostrou

não haver efeito inibitório de lactose na migração celular nas diferentes condições analisadas ($p > 0,05$), isso implica que a sinalização para migração celular é independente da ação de galectina-3 extracelular.

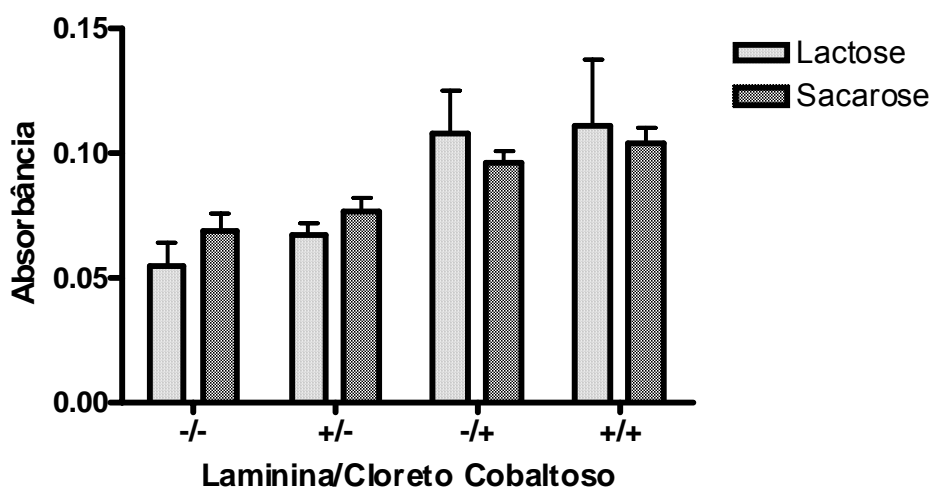


Figura 14 - A migração celular é independente da ação de galectina-3 solúvel extracelular.

Ensaio de 4 horas de migração por *transwell*, com 10^6 células de melan-a. Insetos sensibilizados ou não com laminina-1. As células foram submetidas a um ambiente de normóxia ou tratadas com CoCl_2 e adicionados com lactose/sacarose. Quantificação foi realizada por solubilização do corante em SDS e medição da absorbância em filtro 595nm. Não foi observada diferença significativa na migração celular na presença de lactose ou sacarose em nenhuma das condições ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A secreção não convencional de galectina-3 ainda é pouco conhecida. A galectina-3 é recrutada para a membrana celular, primeiramente para a membrana interna, e depois transportada para a membrana externa. Nesse cenário, a galectina-3 pode se apresentar de 3 maneiras diferentes: permanecer associada a proteínas/carboidratos/lipídios da membrana externa; associada a matriz extracelular por interação com proteínas insolúveis; ser liberada para o meio externo, podendo associar-se a proteínas solúveis. A distribuição de galectina-3 nesses compartimentos permanece em um equilíbrio dinâmico.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que em condições de hipóxia essa dinâmica de distribuição de galectina-3 é alterada. Em melanócitos murinos imortalizados, há um aumento da deposição de galectina-3 na matriz extracelular, acompanhado de um aumento transcricional do gene. Paralelamente, temos uma redução da galectina-3 solúvel no meio extracelular. O nível de galectina-3 solúvel presente na célula pareceu inalterado, no entanto, apresentou clara alteração pós-traducional do tipo fosforilação (Figura 15).

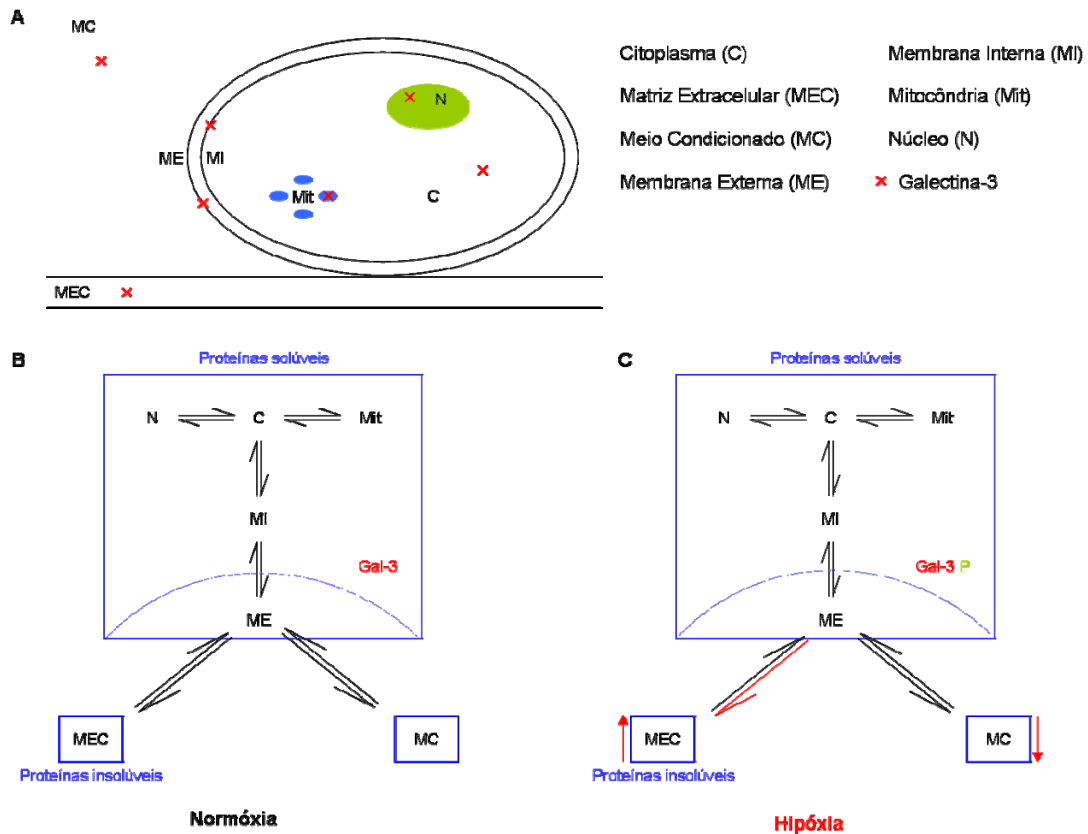


Figura 15 - Modificações na compartimentalização de galectina-3 em condições de hipóxia.

Esquema mostrando as possíveis compartimentalizações de galectina-3 em uma célula (A). Esquema mostrando quais compartimentos celulares estão envolvidos em cada separação protéica analisada nesse trabalho e como cada um desses compartimentos foram afetada em relação ao acúmulo de galectina-3 na situação de normóxia (B) e hipóxia (C).

Os melanócitos presentes na pele vivem em uma ambiente com baixa tensão de oxigênio (\leq a 10%), o que permite estabilização de HIF-1 α e a expressão de genes alvo como transportador de glicose 1 (Glut-1). Para alguns pesquisadores (BEDOGNI e POWELL 2009) o baixo nível de oxigênio permite uma significativa redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que poderia ser um fator protetor a senescência celular. Além disso, a estabilização de HIF-1 α colabora com a sobrevivência

e o crescimento de melanócitos. No entanto, o ambiente hipóxico também pode ser um ambiente propício à transformação celular. Células deficientes em HIF-1 α apresentaram menor capacidade *in vitro* de transformação e diminuição do crescimento tumoral *in vivo*. Além disso, células expressando HIF-1 α de forma estável levaram à transformação celular em condições de normóxia e o crescimento de melanomas altamente agressivos *in vivo*. (BEDOGNI e POWELL 2009).

Em células já transformadas, o ambiente hipóxico passa agir como um fator seletivo, promovendo a progressão tumoral e aquisição da capacidade metastática. Em resposta ao ambiente hipóxico, células transformadas passam a promover a sinalização para angiogênese, facilitam invasão pela expressão de metaloproteinases, facilitam migração e remodelação da matriz extracelular (MICHAYLIRA e NAKAGAWA 2006; VICTOR et al. 2006).

Recentemente foi descrito uma via de estabilização de HIF-1 α em células tumorais independente da concentração de oxigênio. Nesse modelo, a estabilização de HIF-1 α é mediada pelo antígeno-11 de melanoma (MAGE-11). Esse estudo propôs que MAGE-11 interage com PHD 2, inibindo sua ação, permitindo a estabilização de HIF-1 α e por consequência sua translocação para o núcleo e dimerização com HIF-1 β , agindo sobre genes- alvo (APRELIKOVA et al. 2009).

Assim como já foi descrito em diversas linhagens tumorais, a linhagem melan-a apresenta expressão estável de HIF-1 α em condições de

normóxia. Essa expressão em melan-a poderia estar associada a ativação por outras vias que sejam independentes de oxigênio.

A linhagem de melan-a, quando exposta ao tratamento com CoCl_2 por 4 horas apresentou aumento da transcrição do gene *Igals3A*. O mesmo aumento não foi observado nas células submetidas pelo mesmo período ao ambiente de hipóxia. Quando as células foram expostas às mesmas condições por 24 horas o que observamos foi um aumento similar da transcrição gênica nas duas condições. Esses resultados sugerem que a ação do CoCl_2 no metabolismo celular seja mais rápido que a sinalização desencadeada pela baixa tensão de oxigênio.

Podemos especular que o tratamento com CoCl_2 atinge um limite de transcrição gênica mais rapidamente que aquele observado no ambiente hipóxico, uma vez que a diferença observada entre os tratamentos em 4 horas não é mais observado em 24 horas. O aumento da transcrição gênica de galectina-3 em condições de hipóxia por 24 horas já havia sido demonstrado em células B16(F10), linhagem de melanoma murino. Foi demonstrado o aumento da transcrição de galectina-3 em condições de hipóxia por microarray seguido de validação por PCR em tempo real (OLBRYT et al. 2006).

A análise protéica de melan-a em condições de normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 por 4 ou 24 horas mostraram não haver acúmulo de galectina-3 no citoplasma (fração solúvel de proteínas). Diferentemente do nosso achado, células da linhagem BeWo mostraram aumento da expressão protéica de galectina-3 quando submetidas a hipóxia (HU et al. 2006). Esse

achado foi demonstrado utilizando-se a técnica de MALDI-TOF-TOF-MS, uma técnica mais sensível para quantificação de alteração da expressão protéica.

No meio condicionado das células expostas às diferentes condições por 4 horas houve redução de galectina-3 solúvel, quando as células eram exposta ao ambiente hipóxico. Essa redução no acúmulo da proteína pode ocorrer por redução de secreção de galectina-3 solúvel, como consequência de uma alteração na compartimentalização subcelular, ou por aumento da deposição de galectina-3 no meio extracelular pela célula. Células de carcinoma de mama apresentam aumento da deposição de galectina-3 no meio extracelular que auxilia na adesão e espalhamento dessas células em suspensão (BAPTISTE et al. 2007).

O aumento no acúmulo de galectina-3 insolúvel na matriz extracelular (fração insolúvel), após as células serem expostas a hipóxia ou ao tratamento com CoCl_2 por 24 horas, sugere aumento da secreção de galectina-3. Diversas funções já foram atribuídas à interação de galectina-3 com a matriz extracelular, como adesão célula-célula, adesão célula-matriz e a migração celular. Já foi demonstrado que alta concentração de galectina-3 na superfície de células tumorais leva a uma redução na capacidade de adesão dessas células com proteínas da matriz extracelular (laminina-1, colágeno- IV e fibronectina). A perda da adesão celular parece envolver a porção CRD da galectina-3, uma vez que a adesão das células foi restabelecida na presença de lactose, mas não de sucrose (OCHIENG et al. 1998). A remodelação da matriz extracelular e a alteração da adesão célula-

célula é um fator importante na aquisição de um fenótipo migratório pela célula.

MEHUL e HUGHES (1997) mostraram que a secreção de galectina-3 para a membrana plasmática é favorecida com a adição de resíduos de aminoácidos passíveis de miristoilação e palmitoilação na porção N-terminal da proteína. Demonstraram ainda que uma vez na membrana, a galectina-3 pode ser secretada para o meio extracelular através de vesículas. Se a secreção de galectina-3 solúvel para o meio extracelular ocorre através de vesículas originadas da membrana plasmática, é possível imaginar em nosso modelo, que em condições de hipóxia, a secreção por vesículas esteja inibida, favorecendo o acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular e diminuindo o acúmulo de galectina-3 solúvel no meio condicionado.

O ambiente hipóxico é um fator seletivo das células tumorais, sendo esse ambiente associado à capacidade de metastatização e, portanto a uma mau-prognóstico (YANG et al. 2007; BACHMANN et al. 2008).

A prolongada exposição das células melan-a à hipóxia leva a um aumento transcricional de galectina-3. Essa proteína recém sintetizada poderia ser direcionada à matriz extracelular como resposta a adaptação ao novo ambiente, levando a uma remodelação da matriz extracelular e a alteração na adesão célula-matriz. Galectina-3 presente na matriz extracelular pode ser clivada por metaloproteases (NANGIA-MAKKER et al. 2007), um processo que poderia contribuir para a remodelação da matriz extracelular. A clivagem de galectina-3 tem sido associada a mau prognóstico em câncer de próstata e foi sugerida como um marcador

molecular de agressividade (WANG et al. 2009). Em nosso modelo, no entanto, não observamos formas clivadas de galectina-3 na matriz extracelular. Outros tipos tumorais devem ser avaliados para formas clivadas de galectina-3, a fim de determinar qual a especificidade desse possível marcador molecular.

Recentemente foi demonstrado que galectina-3 endógena está localizada em *lipids rafts* de membrana de células dendríticas, possivelmente por interação proteína-proteína (HSU et al. 2009). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que células dendríticas deficientes em galectina-3 apresentaram menor mobilidade *in vitro* e *in vivo* quando comparada a células dendríticas que expressavam galectina-3. A migração *in vitro* não foi inibida por lactose, corroborando a noção de que galectina-3 intracelular desempenharia um papel controlador do processo de migração celular. Os *lipids rafts* são estruturas na membrana celular com capacidade de remodelação do citoesqueleto, expondo ou escondendo receptores, propiciando ou inibindo sinalização celular. A presença de galectina-3 nesses *lipids rafts* poderia estar contribuindo para a modulação do citoesqueleto de forma a favorecer a migração celular.

O ensaio de migração celular em *transwell* por 4 horas mostrou uma maior mobilidade sobre o tratamento com CoCl_2 , seguida pela exposição a hipóxia. Uma resposta mais rápida ao tratamento com CoCl_2 quando comparado a hipóxia corrobora com o que foi observado na transcrição gênica de galectina-3. Esses resultados de mobilidade, no entanto, foram observados na presença de laminina-1, na sua ausência não houve

diferença de migração entre as diferentes condições. Nesse ensaio, a laminina-1 age como um agente haptotático do processo, permitindo que a influência do ambiente hipóxico sobre a mobilidade da célula seja observado em período curto de tempo. Já o ensaio de transwell realizado por 24 horas mostrou não haver uma diferença entre a migração em normóxia e o tratamento com CoCl_2 , além disso mostrou uma menor migração das células em hipóxia, na presença de laminina-1. Aparentemente, o tempo de 24 horas de exposição levou a um platô de resposta, onde não mais observamos diferenças entre o tratamento com CoCl_2 e a normóxia.

Diferentemente do que foi observado pelo trabalho de HSU et al. (2009) os resultados não permitem supor uma relação direta entre a galectina-3 presente na matriz extracelular e a migração celular. O acúmulo de galectina-3 na matriz foi observado apenas após 24 horas de exposição e a alteração na mobilidade celular foi observada com 4 horas de exposição às diferentes condições.

A mobilidade das células frente ao tratamento com CoCl_2 não foi inibida pela ação da lactose, sugerindo que a sinalização para migração é independente da ação de galectina-3 solúvel extracelular. Esse mesmo resultado foi obtido usando-se células de glioma híbridos por IKEMORI (2009). A lactose é um inibidor pouco específico de galectina-3. A utilização de inibidores mais específicos, como lactosaminas, auxiliará no estudo de possíveis funções de galectina-3 extracelular, estes experimentos estão sendo realizados.

Um dos mecanismos de resposta à hipóxia é a estabilização da proteína HIF-1 α . As vias que levam a sua estabilização não foram completamente elucidadas, porém já são conhecidas algumas moléculas que participam do processo. Em condições de hipóxia, p38 fosforila Siah2 (Seven in absentia homolog 2 - uma ubiquitina-ligase), que por sua vez irá ubiquitinar a PHD. A ubiquitinação da PHD levará a sua degradação proteossomal, permitindo a estabilização de HIF-1 α (NAKAYAMA et al. 2009). Modificações pós-traducionais parecem exercer um papel importante na resposta ao ambiente hipóxico. Esse é um mecanismo de resposta rápido, que permite a sinalização a uma resposta mais lenta, envolvendo alterações transcricionais.

A fosforilação é uma modificação pós-traducional já associada à galectina-3 em diferentes condições. Em fibroblastos de camundongo foi demonstrado que galectina-3 fosforilada está localizada no citoplasma e no núcleo. Já galectina-3 não fosforilada aparece quase que exclusivamente no núcleo (COWLES et al. 1990). Em outro estudo, foi demonstrado que as células BT-549 (derivadas de carcinoma de mama), e que não expressam galectina-3, não são tumorigênicas. A expressão de galectina-3 conferiu um potencial tumorigênico e metastático a essas células. Foi visto ainda que a galectina-3 expressa era fosforilada, e quando as células eram transfectadas com galectina-3 mutada em serina 6 (incapaz de ser fosforilada) as células não apresentaram potencial tumorigênico (MAZUREK et al. 2005). Esses resultados mostraram que o potencial tumorigênico adquirido pela célula é dependente da fosforilação de galectina-3.

Eletroforese em duas dimensões de melan-a submetida a normóxia, hipóxia ou tratamento com CoCl_2 mostrou uma tendência a prevalência de formas de galectina-3 com pI mais básico e uma perda de formas com pI mais elevado em condições de hipóxia quando comparada com normóxia. Mostramos que essas formas de baixo pI prevalentes em condições de hipóxia são modificações pós-traducionais do tipo fosforilação, uma vez que as mesmas foram eliminadas após o tratamento com fosfatase ácida. As formas com ponto isoelétrico mais baixo em normóxia não foram responsivas ao tratamento com fosfatase ácida, sugerindo que as modificações pós traducionais observadas não são do tipo fosforilação. Notamos ainda que há mais de uma forma eletroforética de galectina-3 fosforilada, sugerindo múltiplos pontos de fosforilação na proteína.

O uso de anticorpo específico contra galectina-3 fosforilada ou não na região N-terminal da proteína corrobora o achado da eletroforese em duas dimensões. Até o momento, nenhum trabalho na literatura de nosso conhecimento relacionou a fosforilação de galectina-3 como resposta a adaptação a um ambiente de baixa tensão de oxigênio.

Em estudo com a linhagem BT-549 transfectada com galectina-3 selvagem ou mutada em serina 6 demonstrou-se que galectina-3 fosforilada por caseína quinase-1 é necessária para a sinalização anti-apoptótica (YOSHII et al. 2001). Em outro estudo utilizando o mesmo modelo, foi demonstrado que a fosforilação em serina 6 é um marcador para translocação do núcleo para o citoplasma, onde irá conferir a função anti-apoptótica de galectina-3 (TAKENAKA et al. 2004). Podemos especular que

as modificações observadas em hipóxia estão relacionadas a uma subcompartimentalização celular da proteína, modulando suas funções.

As diferentes formas eletroforéticas de galectina-3 em normóxia não foram eliminadas com o tratamento por fosfatase ácida, indicando que a fosforilação não é um tipo de modificação pós traducional nessas condições. Em condições de normóxia, HIF-1 α é hidroxilada em prolina pela enzima prolil hidroxilase. Essa modificação é o início de uma sinalização que culminará na degradação de HIF-1 α via proteassomo. Galectina-3 é uma proteína rica em prolina, principalmente na porção N-terminal. Hipotetizamos se galectina-3 em condições de normóxia não poderia ser hidroxilada em prolina, assim como ocorre com HIF-1 α , conferindo o padrão de distribuição eletroforética observada na eletroforese em duas dimensões.

Para verificar se tal modificação conferiria mudança da forma eletroforética de galectina-3 utilizamos o software ProMoST desenvolvido no *Bioinformatics Research Center and Biotechnology and Biomedical Engineering Center, Medical College of Wisconsin* (HALLIGAN et al. 2004).

Essa ferramenta prevê o ponto de focalização isoeétrica e a massa molecular esperada de uma proteína. Além disso, possibilita a previsão do ponto de focalização isoeétrica e a massa molecular esperada da proteína com modificações pós traducionais. As informações geradas pelo programa são apresentadas de duas maneiras: um gel hipotético de duas dimensões; uma tabela com os pI e as massa moleculares esperadas para cada condição analisada. Simulamos a adição de hidroxilação em prolina e a adição de até três fosforilações em serina na galectina-3 (Figura 16).

ProMoST Results

Output from ProMoST version 13

Date: Aug 31, 2009 Time 9:45:11

protein	acc no.	ave_mass	pl	phosST	Hydroxyproline
1	gi 225543163 ref NP_001139425.1	27396.73	8.28	0	n
1	gi 225543163 ref NP_001139425.1	27396.73	7.18	1	n
1	gi 225543163 ref NP_001139425.1	27396.73	6.66	2	n
1	gi 225543163 ref NP_001139425.1	27396.73	6.35	3	n
1	gi 225543163 ref NP_001139425.1	27396.73	7.61	0	y

1 proteins analyzed.

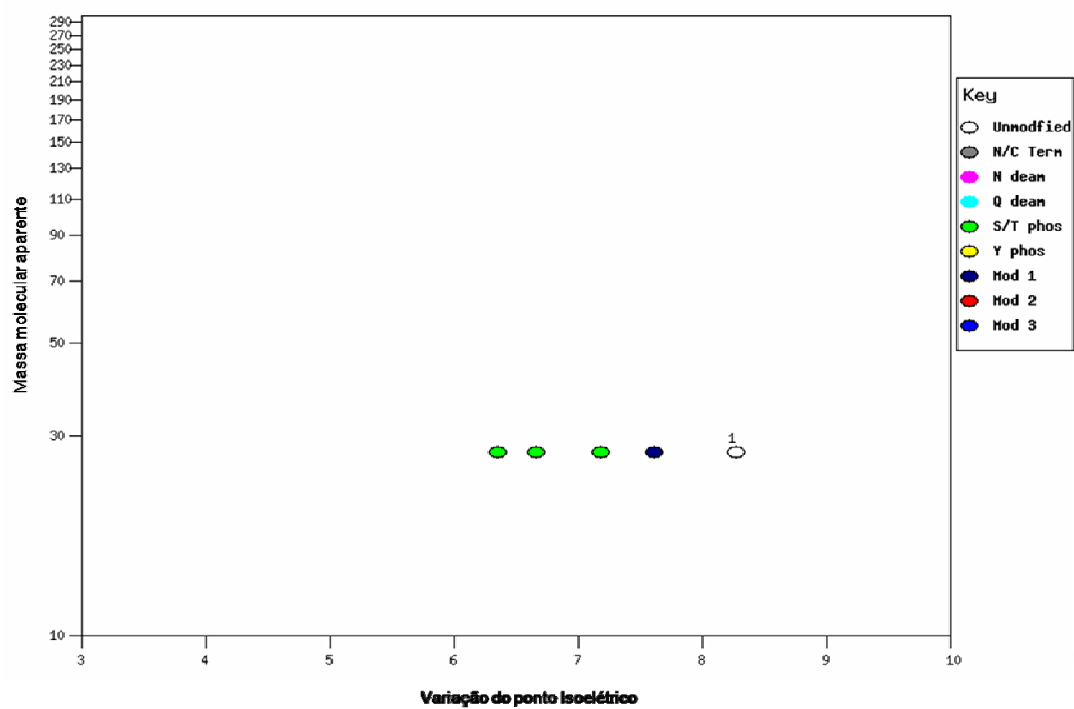


Figura 16 - Simulação no ProMoST de alterações no ponto isoelétrico de galectina-3 como consequência de alterações pós-traducionais.

Foram simuladas dois tipos de modificações pós traducionais simultaneamente em galectina-3. A primeira modificação foi a fosforilação de serina em até três aminoácidos de forma simultânea. Foram plotados os pI esperados para a adição de um, dois e três fosfatos a serina. Cada adição modificando a forma eletroforética de galectina-3 para um pI mais baixo. Nessa modificação pós-traducional foi mantido os pKa sugeridos no programa (6,9 e 1,2). A segunda modificação foi a adição de uma hidroxila em prolina. Nesse caso, foi observada uma forma eletroforética de galectina-3 com pI mais baixo. Para essa modificação foi informado que os pKa de hidroxiprolina são de 9,73 e 1,92. Para essa simulação foi utilizada a seqüência de galectina-3 em formato FASTA obtida no banco de dados de proteínas do NCBI (NP_001139425.1).

Quanto a tabela de resultados gerado pelo programa a primeira e segunda coluna são para identificação da proteína. A terceira coluna mostra a massa molecular esperada da proteína. A quarta coluna mostra o ponto isoelétrico esperado da proteína. A quinta coluna mostra quantas adições de fosfato foram feitas na proteína. A quinta e última coluna mostra se houve (y = Yes) ou não (n = No) adição de hidroxiprolina.

A forma eletroforética de galectina-3 com a adição de uma hidroxiprolina apresenta seu pI mais baixo, consistente com o o que foi observado em eletroforese de duas dimensões para amostra em normóxia. As sucessivas adições de fosforilação a galectina-3 também corroboram com o observado para as amostra em hipóxia, em que parece haver mais de uma forma eletroforética em pI mais baixo.

Podemos hipotetizar que, assim como ocorre com HIF-1 α , em condições de normóxia galectina-3 poderia ser hidroxilada, sendo essa modificação uma sinalização que culminaria na degradação da mesma. Em condições de hipóxia, galectina-3 não mais seria hidroxilada e nem degradada, levando ao acúmulo de galectina-3 fosforilada.

Para verificar se esses mecanismos estão ocorrendo duas abordagens podem auxiliar: bloquear a degradação proteassomal utilizando lactasistina e verificando se há acúmulo dessa forma eletroforética;

imunoprecipitação seguida de espectrometria de massa para verificar se há peptídios hidroxilados. Essas abordagens auxiliariam na elucidação de mecanismos de controle da galectina-3 em condições de normóxia e hipóxia.

Trabalho anterior de nosso grupo mostrou que a linhagem Tm1 não expressa galectina-3 em decorrência da metilação do promotor. O tratamento com a agente inibidor de metilação 5-Aza-2-deoxicitidina mostrou-se capaz de induzir a expressão *de novo* de galectina-3, porém uma reexpressão fraca, indicando que há outros mecanismos envolvidos na regulação de galectina-3 nessa linhagem (TEIXEIRA et. al. 2007). Poderia a hipóxia alterar a regulação de galectina-3 nessa linhagem?

A exposição prolongada à hipóxia ou ao tratamento com CoCl_2 não induziu a expressão *de novo* de galectina-3 na linhagem Tm1. A exposição a normóxia ou a hipóxia concomitante com o tratamento de 5-Aza-2-deoxicitidina não apresentou diferença no acúmulo de galectina-3 no citoplasma. Os mecanismos que regulam negativamente a expressão de galectina-3 nessa linhagem parecem não ser alterados pelos mecanismos de adaptação ao ambiente hipóxico.

Células Tm1 transfectadas com galectina-3 (Tm1G3) apresentaram respostas diferentes à exposição à hipóxia a ao tratamento com CoCl_2 . Quando expostas à hipóxia, da mesma maneira como ocorreu quando expostas à normóxia, as células apresentaram acúmulo de galectina-3 na matriz extracelular. O mesmo acúmulo não foi observado nas células tratadas com CoCl_2 , levando a crer que o mecanismo de ação de resposta ao tratamento com CoCl_2 e ao ambiente hipóxico sejam diferentes.

OLBRYT et al. (2006) mostraram por microrray um perfil gênico distinto entre células B16(F10) expostas a hipóxia ou ao tratamento com CoCl_2 . Nossos resultados levam a crer que a expressão diferencial de genes frente à exposição à hipóxia e ao tratamento com CoCl_2 possa influir na compartimentalização subcelular de galectina-3 nas diferentes condições. Outro fator importante a ser considerado é que a galectina-3 presente em Tm1G3 está sob a regulação de um promotor heterólogo, enquanto que em melan-a, galectina-3 está sob o controle de seu promotor homólogo.

Os resultados obtidos com o uso de CoCl_2 mostram que em diversas situações esse agente químico não atua como um mimetizador de hipóxia, como aparece em diversos trabalhos na literatura. IKEMORI (2009) observaram o mesmo em seus resultados. O agente químico CoCl_2 simula condições de hipóxia apenas parcialmente

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou que em condições de hipóxia há um aumento transcricional do gene *Igals3a* em concordância com o acúmulo da proteína galectina-3 insolúvel na matriz extracelular. Paralelamente, foi observado uma redução de galectina-3 solúvel no meio condicionado. Esses resultados juntos mostram que o ambiente hipóxico altera o padrão de compartimentalização dessa proteína.

Além de modificar a dinâmica de distribuição de galectina-3, o ambiente hipóxico levou a modificações pós traducionais do tipo fosforilação e inibiu outras modificações pós traducionais presentes em normóxia, a serem caracterizadas.

A linhagem tumorigênica Tm1 não expressou galectina-3 *de novo* quando submetida ao ambiente hipóxico. Os mecanismos epigenéticos de regulação do gene de galectina-3 nessa linhagem parecem não ser afetados pelas respostas celulares desencadeadas pela hipóxia.

A linhagem transfectada com galectina-3 não apresentou alteração no acúmulo de galectina-3 heteróloga em condições de hipóxia. Nessa linhagem o controle do promotor exógeno parece ser independente de HIF.

O CoCl_2 simula apenas parcialmente o efeito da hipóxia sobre a célula, sugerindo que haja outros sensores de oxigênio na célula além de HIF.

Uma das conseqüências funcionais observadas foi o aumento na capacidade migratória da linhagem melan-a, após curtos períodos de exposição a ambientes hipóxicos ou hipóxia-miméticos. Essa migração é aparentemente independente da galectina-3 extracelular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelman DM, Gertsenstein M, Nagy A, Simon MC, Maltepe E. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. **Genes Dev** 2000; 14:3191-203.

Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, et al. Analysis of *ras* oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. **Oncogene** 1989; 4:1363-74.

Aprelikova O, Pandolfi S, Tackett S, et al. Melanoma Antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response. **Cancer Res** 2009; 69:616-24.

Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, Naumov GN, Akslen LA. Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. **BMC Cancer** 2008; 8:362.

Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: Implications in the extracellular functions of the lectin. **Exper Cell Res** 2007; 313:652-64.

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:683-90.

Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. **Cancer Cell** 2005; 8:443-54.

Bedogni B, Powell MB. Hypoxia melanocytes and melanoma – survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. **Pigment Cell Melanoma Res** 2009; 22:166-74.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. **Cancer Res** 2000; 60:4693-6.

Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1661-8.

Boni R, Schuster C, Nehrhoff B, Burg G. Epidemiology of skin cancer. **Neuro Endocrinol Lett** 2002; Suppl 2:48-51.

Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:309-14.

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.

Candrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. **J Cell Sci** 2001; 113:1439-45.

Chammas R. Melanoma cutâneo. In: Gil C, Casale JC, editores. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.231-40.

Chilov D, Hofer T, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and clock in mouse brain **FASEB J** 2001; 15:2613-22.

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; 12:1147-65.

Cowles EA, Agrwal N, Anderson RL, Wang JL Carbohydrate-binding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative. **J Biol Chem** 1990; 265:17706-12.

Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995; 92:1213-7.

Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. **Mol Biol Cell** 2004; 15:3580-90.

Gong HC, Honjo Y, Nangia-Makker P, et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Res** 1999; 59:6239-45.

Greijer AE, van der Groep P, Kemming D, et al. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). **J Pathol** 2005; 206:291-304.

Hall HI, Jamison P, Fulton JP, Clutter G, Roffers S, Parrish P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. **J Am Acad Dermatol** 2003; 4:624-30.

Halligan BD, Ruotti V, Jin W, Laffoon S, Twigger SN, Dratz EA. ProMoST (Protein Modification ScreeningTool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. **Nucleic Acids Res** 2004; 32:W638-44.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. **Oncogene** 2005; 24:2899-908.

Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. **Semin Oncol** 2001a; 28(Suppl 8):36-41.

Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definition and current clinical, biologic, and molecular aspects. **J Natl Cancer Inst** 2001b; 93:266-76.

Hsu DK, Chernyavsky AI, Chen H, Yu L, Grando SA, Liu F. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cell. **J Invest Dermatol** 2009; 129: 573-83.

Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P, Li X. Proteomic Analysis of Hypoxia-Induced Responses in the Syncytialization of Human Placental Cell Line BeWo. **Placenta** 2006; 28:399-407.

Ikemori RY. **Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas**. Campinas; 2009. [Dissertação de Mestrado-Instituto de Biologia da Universidade de Campinas].

Inohara H, Raz A. Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. **Cancer Res** 1995; 55:3267-71.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science** 2001; 292:468-72.

Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer Metastasis Rev** 1999; 18:345-57.

Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer H. Active Caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell** 2008; 132:818-31.

Kotch LE, Iyer NV, Laughner E, Semenza GL. Defective vascularization of HIF1- α null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. **Dev Biol** 1999; 209:254-67.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, et al. Hypoxia inducible factor (HIF-1 α and HIF-2 α) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. **Cancer Res** 2001; 61:1830-32.

Littlewood TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcome in patients with cancer. **Semin Oncol** 2001; 28(Suppl 8):49-53.

Liu F, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta** 2002; 1572:263-73.

Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. **Genes Dev** 2001; 15:2675-86.

Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natolib C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Lett** 2000; 473:311-5.

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.

Mehul B, Hughes C. Plasma membrane targeting budding and release of galectin-3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. **J Cell Science** 1997; 110:1169-78.

Menon RP, Hughes C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmatic reticulum-Golgi complex. **Eur J Biochem** 1999; 264:569-76.

Michaylira CZ, Nakagawa H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. **Cancer Biol Ther** 2006; 5:476-9.

Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H, Raz A. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. **Cancer Res** 2006; 66:9995-10006.

Nakayama K, Qi J, Ronai Z. The ubiquitin ligase siah2 and the hypoxia response. **Mol Cancer Res** 2009; 7:443-51.

Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 Cleavage: A novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. **Cancer Res** 2007; 67:11760-8.

Neder L, Marie SK, Carlotti CG Jr, et al. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathol** 2004; 14:399-405.

Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia** 2006; 8:231-41.

Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 246:788-91.

Olbryt M, Jarzab M, Jazowiecka-Rakus J, Simek K, Szala S, Sochanik A. Gene expression profile of B16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. **Gene Expr** 2006; 13:191-203.

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

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell** 1998; 92:713-23.

Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. **Am Fam Phys** 2005; 72:269-76.

Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:2110-5.

Sato S, Burdett I, Hughes RC. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **Exp Cell Res** 1993; 207:8-18.

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. **Mol Cell Biol** 1992; 12:5447-54.

Shalom-Feuershtein R, Plowman SJ, Rotblat B, et al. K-Ras nanoclustering is subverted by overexpression of the scaffold protein galectin-3. **Cancer Res** 2008; 68:6608-16.

Sharpless NE, Ramsey MR, Balasubramanian P, Castrillon DH, DePinho RA. The differential impact of p16 (INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. **Oncogene** 2004, 23:379-85.

Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. **FASEB J** 2001; 15:2445-53.

Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Mol Cell Biol** 2004; 24:4395-406.

Talbot KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancer and tumor-associated macrophages. **Am J Pathol** 2000; 157:411-21.

Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. **Int J Cancer** 1997; 74:255-9.

Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, et al. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIc murine fibrosarcoma. **Cancer Res** 1990; 50:3339-44.

Teixeira VR. **Mecanismos associados à perda de expressão do gene de galectina-3 em um modelo de progressão de melanoma murino.** São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 activation in melanoma. **J Invest Dermatol** 2004; 122:337-41.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene** 2003; 20:3042-52.

Van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, et al. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. **Cancer Res** 2001; 61:5303-6.

Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **Oncologist** 2004; 9(Suppl 5):4-9.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. **Med Oncol** 2001; 18:243-59.

Victor N, Ivy A, Jiang BH, Agani FH. Involvement of HIF-1 in invasion of Mum2B uveal melanoma cells. **Clin Exp Metastasis** 2006; 23:87-96.

Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:4304-8.

Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. **J Biol Chem** 1995; 270:1230-7.

Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, et al. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. **Am J Pathol** 2009; 174:1515-23.

Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB J** 2002; 16:1151-62.

Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene** 2003; 22:3113-22.

Yang QC, Zeng BF, Dong Y, Shi ZM, Jiang ZM, Huang J. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome. **Jpn J Clin Oncol** 2007; 37:127-34.

Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **J Biol Chem** 2002; 277:6852-7.

Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 α . **J Clin Invest** 1999; 103:691-6.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancer and their metastases. **Cancer Res** 1999; 59:5830-5.

Zhuo Y, Chammas R, Bellis S. Sialylation of β 1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2008; 283:22177-85.

8 OBRA CONSULTADA

Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. **Guia de apresentação de teses**. São Paulo: A Biblioteca; 1998.
