

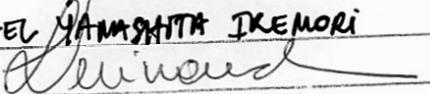
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Rafael Yamashita Ikemori**



**Análise de possíveis mecanismos e  
conseqüências funcionais da expressão de  
galectina-3 em células de glioma expostas a  
condições hipóxicas**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular na Área de Imunologia**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
**RAFAEL YAMASHITA IKEMORI**  
  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Orientadora: Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roger Chammas**

**Campinas**

**2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Ik3a

Ikemori, Rafael Yamashita

Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas / Rafael Yamashita Ikemori. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Liana Maria Cardoso Verinaud.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Glioma. 2. NG97ht. 3. Galectina 3. 4. Pseudopaliçada. 5. Hipóxia celular. I. Verinaud, Liana Maria Cardoso, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Analysis of possible mechanisms and functional consequences of galectin-3 expression in glioma cells exposed to hypoxia.

**Palavras-chave em inglês:** Gliomas; NG97ht; Galectin 3; Pseudopalisading; Cellular hypoxia.

**Área de concentração:** Imunologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Liana Maria Cardoso Verinaud, Maria Cristina Roque Antunes Barreira, Marcelo Brocchi.

**Data da defesa:** 19/05/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 19 de maio de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra . Liana Verinaud (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Assinatura

Prof. Dr. Francesco Langone

Assinatura

*“A definição de insanidade é fazer a mesma coisa várias vezes e esperar resultados diferentes”*

Albert Einstein

# Dedicatória

Dedico aos meus pais, Elizabeti e Roberto, e aos meus avôs, Sadao e Florinda, por todo apoio recebido em todos estes anos da minha vida.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologias do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – IB, UNICAMP –, Campinas, SP, Brasil, e também em colaborações e parcerias científicas com o Laboratório de Investigação Médica, LIM 24, da Faculdade de Medicina da USP, com o Grupo de Estudos sobre Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig de Pesquisas Sobre o Câncer, e com o Laboratório de Neurobiologia da Degeneração e Regeneração Neural do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia, UNICAMP.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente a meus pais, Elizabeti e Roberto, e também aos meus avôs, Sadao e Florinda, por todo apoio recebido durante a minha vida.

Aos meus amigos, aos que fazem parte da minha vida e aos que fizeram da minha passagem pela UNICAMP uma experiência única, Luiz Henrique, Fernanda, Luciana, Mineiro, Patrícia, Gustavo, Kívia, Marília, Goshima, Joni, Farani e ao nosso eterno querido amigo Vitor.

Aos meus companheiros de laboratório que me ajudaram em meus questionamentos e dúvidas e que me acolheram no meu início da jornada científica através dos confins do conhecimento, Camila, Jacy e Patrícia e aos alunos de iniciação que me acompanharam nestes tempos, Carol Bonetto e Carol Francelin.

Aos meus amigos do LIM-24, Renata, Lara, Andréia, Cláudia, Guilherme, Tharcísio, Luciana, Gabriella, Silvina, Mara, Raimundo, Helano, Ana, Patrícia, Willame, Jair, Ivonete e Maria José, e a Verônica, cujo projeto de doutorado auxiliou imensamente o meu projeto de mestrado.

Aos pesquisadores do Instituto Ludwig, Ricardo e Anamaria Camargo, pelo apoio na realização dos experimentos envolvendo metilação do gene de galectina-3.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido durante meu mestrado.

Finalmente à minha orientadora, a professora doutora Liana Verinaud e ao meu co-orientador, professor doutor Roger Chammas, os quais me ajudaram a amadurecer, me preparar academicamente e abrir a minha mente para as diversas possibilidades que a ciência pode nos levar.

# **RESUMO**

---

**IKEMORI, R. Y.** “Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão da galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas”, **Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP**

Gliomas são tumores primários do sistema nervoso central e o glioblastoma multiforme é sua forma clínica mais comum e de pior prognóstico. Na tentativa de entender sua biologia, a linhagem NG97 foi estabelecida, demonstrando características de glioblastoma com atipia nuclear e elevadas taxas de mitose.

Recentemente, descobriu-se que esta é uma linhagem híbrida humano-murina derivada da fusão de células de astrocitoma humano e estroma murino que provavelmente ocorreu no processo de estabelecimento desta linhagem, a qual foi posteriormente denominada NG97ht.

Esta linhagem apresenta crescimento de massas tumorais quando inoculada em camundongos imunodeficientes, demonstrando características histopatológicas de pseudopaliçada, comuns a glioblastomas. Estas são regiões hiper celulares que margeiam ambientes necróticos e postula-se que sejam células migrantes de ambientes necróticos/hipóxicos.

Além disso, estas áreas têm como característica a expressão de moléculas relacionadas à adaptação a hipóxia, como o fator induzido por hipóxia (HIF), atuando na sobrevivência celular pela indução de diferentes genes. É visto que em hipóxia há aumento da produção de galectina-3, a qual está envolvida em diversos processos celulares e que é somente expressa nestas regiões de pseudopaliçada, não sendo detectada em suas áreas tumorais adjacentes.

A galectina-3 é uma lectina que possui ligação a beta-galactosídeos e se relaciona com o aumento da mobilidade, adesão, crescimento e progressão tumoral. Além disso, estudos indicam que em alguns tipos tumorais, a metilação do promotor de galectina-3 é responsável pela modulação de sua expressão.

Nossos resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a hipóxia é capaz de modular positivamente a expressão de galectina-3, tanto em câmara de hipóxia quanto em cloreto cobaltoso, composto químico capaz de mimetizar a hipóxia, apresentando aumento de expressão de galectina-3 em meio completo ou privado de soro fetal bovino, mimetizando ambientes necróticos com pouco oxigênio e nutrientes. Além disso, foi demonstrado que a regulação da expressão gênica de galectina-3 *in vitro* e *in vivo* não é realizada pela metilação de seu promotor.

Ensaio utilizando a técnica de interferência por RNA demonstraram que o *knockdown* de galectina-3, em situação *in vitro* com privação de oxigênio e nutrientes, induziu aumento das taxas de morte celular. Estes dados podem indicar também que a galectina-3 protege as células tumorais dentro de ambientes necróticos em glioblastomas, criando as áreas de pseudopaliçada.

Em conclusão, estes experimentos demonstram as propriedades da galectina-3 de proteção contra a morte em privação de oxigênio e nutrientes, comuns dentro de tumores, destacando sua importância como alvo para agentes anti-neoplásicos.

## **Abstract**

**IKEMORI, R.Y.** “Analysis of possible mechanisms and functional consequences of galectin-3 expression in glioma cells exposed to hypoxia”

Gliomas are primary Central Nervous System tumors. Among them, glioblastomas are the most common clinical forms and have the worst prognosis. In an attempt to understand glioma biology, the NG97 cell line was established. This cell line presents glioblastoma’s characteristics, showing nuclear atipia and high growth rate.

Recently, it was discovered that this is a human-murine hybrid cell line derived from the fusion between human astrocytoma and murine stroma cells that likely occurred in the process of cell line establishment. The cell line was therefore renamed NG97ht.

This cell line grows as tumors in immunodeficient mice displaying histopathological characteristics of pseudopalisades commonly seen in glioblastomas. These areas are comprised by hypercellular regions in the edge of necrotic environments and are possibly constituted by actively migrating cells out of necrotic/hypoxic environments. Besides, these pseudopalisades show the expression of molecules related to adaptation to oxygen deprivation, like Hypoxia Inducible Factor (HIF), which is involved in cell survival through the induction of many genes. Also, it has been shown that under hypoxia, galectin-3 production is stimulated, a protein involved in diverse cellular processes and that is only present in these pseudopalisades in glioblastomas, not being detected in its adjacent areas.

Galectin-3 is a lectin that binds to beta-galactosides and is related to increased motility, adhesion, tumor growth and progression. Also, studies describe that galectin-3 expression is related to its promoter methylation degree in some tumor types.

Our results presented here demonstrated that assays performed in hypoxic chamber and in a chemical condition mimicking hypoxia (incubation with cobaltous chloride) showed galectin-3 induction in either complete medium or deprived of fetal bovine serum, mimicking tumor's necrotic areas deprived of oxygen and nutrients. Besides, it was demonstrated that galectin-3 modulation *in vitro* and *in vivo* is not due to promoter methylation.

Tests related to galectin-3 knockdown in oxygen and nutrient deprivation demonstrated that this protein has a key role in protection against cell death. It is possible that these results may indicate that galectin-3 can also protect tumor cells inside glioblastoma's necrotic areas, acting as a survival factor in disadvantageous environments with low concentrations of oxygen and nutrients.

In conclusion, these experiments demonstrate galectin-3 properties related to protection against cell death in environments deprived of oxygen and nutrients, commonly found inside tumors, highlighting its importance as a target to antineoplastic agents.

---

**SUMÁRIO**

<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Objetivo</b>	16
<b>3. Objetivos específicos</b>	17
3.1 Experimentos <i>in vivo</i>	17
3.2 Experimentos <i>in vitro</i>	17
<b>4. Materiais e Métodos</b>	18
4.1 Cultura de células	19
4.2 Xenotransplantes heterotópicos e processamento das massas tumorais	19
4.2.1 Fixação e emblocamento em parafina	19
4.2.2 Congelamento de tecidos	20
4.3 Análise do padrão de metilação em células da linhagem NG97ht <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	20
4.3.1 Extração de DNA	20
4.3.2 Identificação das ilhas CpG	21
4.3.3 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	21
4.3.4 PCR Metilação específica (MSP)	23
4.3.5 Sequenciamento do DNA tratado por bissulfito de sódio	24
4.4 Avaliação da produção de galectina-3: proteínas e RNA mensageiro	26
4.4.1 Extrações protéicas	26
4.4.2 Extração do RNA mensageiro e criação de cDNAs	27
4.4.3 Análise da expressão de galectina-3 por imunofluorescência	29
4.5 Avaliação da expressão de ligantes de galectina-3 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	30
4.5.1 Análise de ligantes de galectina-3 <i>in vitro</i>	30
4.5.2 Análise de ligantes de galectina-3 <i>in vivo</i>	30

---

4.6 Ensaio de exposição à hipóxia mimética através de $\text{CoCl}_2$ 100 $\mu\text{M}$ ou em câmara de hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino	31
4.6.1 Análises de expressão gênica de galectina-3 por PCR em Tempo Real	32
4.6.2 Análises protéicas de galectina-3	34
4.6.3 Análise das taxas de migração celular em transwell	35
4.6.4 Análise da morte celular com detecção pela incorporação de iodeto de propídeo	35
4.6.5 Análise do impacto do knockdown de galectina-3 na sobrevivência celular e na expressão de galectina-3	36
4.6.6 Análise do padrão de sialilação frente à privação de soro fetal bovino	37
4.6.7 Análise do impacto da inibição da sialilação na proteção contra a morte pela galectina-3 extracelular	37
4.7 Análises estatísticas	38
<b>5. Resultados</b>	<b>39</b>
5.1 A galectina-3 é produzida <i>in vitro</i> desde passagens baixas a altas na linhagem NG97ht	40
5.2 Produção de galectina-3 a partir do genoma murino	43
5.3 Expressão de ligantes de galectina-3	45
5.4 A expressão de galectina-3 não é modulada através da metilação de seu promotor	47
5.5 Ensaio em hipóxia mimética e em câmara de hipóxia	48
5.5.1 Aumento da expressão de galectina-3 em hipóxia e hipóxia mimética	48
5.5.2 Cloreto cobaltoso 100 $\mu\text{M}$ induz aumento da migração celular <i>in vitro</i> em transwell	52
5.5.3 Ensaio de morte celular em hipóxia mimética e em câmara de hipóxia	54

---

---

5.5.4 A galectina-3 atua como fator de proteção contra a morte em privação de oxigênio e nutrientes	58
5.5.5 Redução da expressão de galectina-3 induz aumento de células em fase G0/G1 e diminuição de células em fase S/G2/M	62
5.5.6 Diminuição do ácido siálico de ligação $\alpha$ 2-6 a resíduos de galactose e aumento da exposição de galactose- $\beta$ (1-4)-N-acetilglucosamina em privação de nutrientes	66
5.5.7 A galectina-3 extracelular não atua na indução da morte	69
<b>6. Discussão</b>	<b>71</b>
6.1 A galectina-3 é produzida por diversas passagens na linhagem NG97ht e possui distribuição citoplasmática e nuclear	72
6.2 A produção de galectina-3 através do genoma murino	73
6.3 Os ligantes de galectina-3 <i>in vitro</i> apresentam-se no citoplasma/membrana e concentrados no Complexo de Golgi e <i>in vivo</i> em áreas de pseudopaliçada	74
6.4 O controle da expressão de galectina-3 nos tumores derivados da linhagem NG97ht não é realizado pela sua metilação do promotor	76
6.5 Ensaio em hipóxia mimética em $\text{CoCl}_2$ 100 $\mu\text{M}$ e em câmara de hipóxia	77
6.5.1 Aumento da expressão de galectina-3 em $\text{CoCl}_2$ e em câmara de hipóxia	77
6.5.2 Ensaio de migração celular em câmara de transwell demonstram aumento de migração frente à exposição ao cloreto cobaltoso	78
6.5.3 Células da linhagem NG97ht são resistentes à morte frente à hipóxia, porém apresentam altas taxas de morte celular em hipóxia e privação de nutrientes	80
6.5.4 Galectina-3 protege as células da linhagem NG97ht da morte frente à privação de oxigênio e nutrientes <i>in vitro</i> , indicando sua possível função no microambiente de pseudopaliçada	81

---

6.5.5 Galectina-3 atua diminuindo células em fase G0/G1 e aumentando células em fase S/G2/M na linhagem NG97ht	84
6.5.6 A privação de soro fetal bovino in vitro leva à diminuição da adição de resíduos de ácido siálico, porém sem aumentar a susceptibilidade à morte pela galectina-3 extracelular	85
6.5.7 O cloreto cobaltoso como agente mimetizador da hipóxia	86
<b>7. Conclusões</b>	<b>88</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>90</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>108</b>

LISTA DE ABREVIATURAS

**APB** = Tampão fosfato alcalino, do inglês *Alkaline Phosphate Buffered*

**BSA** = Albumina do Soro Bovino, do inglês *Bovine Serum Albumine*

**cAMP** = Adenosina monofosfato cíclico

**CEEA** = Comitê de Ética em Experimentação Animal

**cDNA** = DNA complementar

**COBEA** = Comitê Brasileiro de Experimentação Animal

**CRD** = Domínio de Ligação a Carboidratos, do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*

**CT** = Ciclo Limiar

**DAPI** = Diamidino-2-fenilindol

**DEPC** = Dietilpirocarbonato

**DMSO** = Dimetil sulfóxido

**DNA** = Ácido Desoxirribonucléico

**DAS** = Aglutinina de *Datura stramonium*

**E** = Eficiência

**EDTA** = Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

**FITC** = Isotiocinato de fluoresceína

**GBM** = Glioblastoma multiforme

**HIF** = Fator Induzido por Hipóxia, do inglês *hipoxya inducible factor*

**IgG** = Imunoglobulina G

**LacNac** = N-acetil-lactosamina

**MSP-PCR** = PCR Metilação Específica, do inglês *Methylation Specific PCR*

**N** = necrose

**Neu-5Gc** = Ácido N-glicolil-neuramínico

**Neu-5Ac** = Ácido N-acetil-neuramínico

**NWGR** = seqüência de asparagina, triptofano, glicina e arginina

**OMS** = Organização Mundial da Saúde

**PBS** = Tampão Fosfato Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

**PCR** = Reação de Polimerase em Cadeia, do inglês *Polimerase Chain Reaction*

**PHD** = Prolil hidroxilase

**PI** = Iodeto de propídeo

**PVDF** = Polivinil difluorido

**qRT-PCR** = PCR em Tempo Real, do inglês *Real-Time PCR*

**RNA** = Ácido Ribonucléico

**RPMI** = meio de cultura Rose Park Memorial Institute

**SBCAL** = Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório

**SCID** = Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada, do inglês *Severe Combined Immunodeficiency*

**SPF** = Livre de Patógenos Específicos, do inglês *Specific Pathogen Free*

**SNA** = Aglutinina de *Sambucus nigra*

**TBE** = Solução de Tris, ácido Bórico e EDTA

**TBS** = Tampão tris salino, do inglês *Tris Bufferd Saline*

**TNF** = Fator de Necrose Tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor*

**VEGF** = Fator de Crescimento Vascular Endotelial, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

**VS** = vaso sangüíneo

# **INTRODUÇÃO**

---

## 2. Introdução

O câncer, também denominado como neoplasia ou tumor malignos, é uma doença que pode acometer virtualmente qualquer tecido, levando ao crescimento celular, invasão e destruição de tecidos adjacentes, com possível migração das células alteradas para diferentes tecidos do organismo (metástase). Estas metástases levam, em última análise, à morte do indivíduo, na maioria dos casos.

Entre os diversos tumores que podem se originar, os provenientes de tecidos pertencentes ao sistema nervoso central estão entre os mais delicados devido a sua localização e sensibilidade a injúrias, como os gliomas, sendo o centro de interesse de diversos cientistas.

Glioma é a denominação genérica dada a todos os tumores do sistema nervoso central (SNC) provenientes de células da glia, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estas células são derivadas de uma mesma célula glial progenitora e incluem os astrócitos, oligodendrócitos e os ependimócitos, os quais possuem grande habilidade mitótica, podendo explicar seu potencial transformante (OZOG *et al.* 2002). Quando sofrem transformação, dão origem respectivamente a astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas (Fig. 1) (RAO 2003).

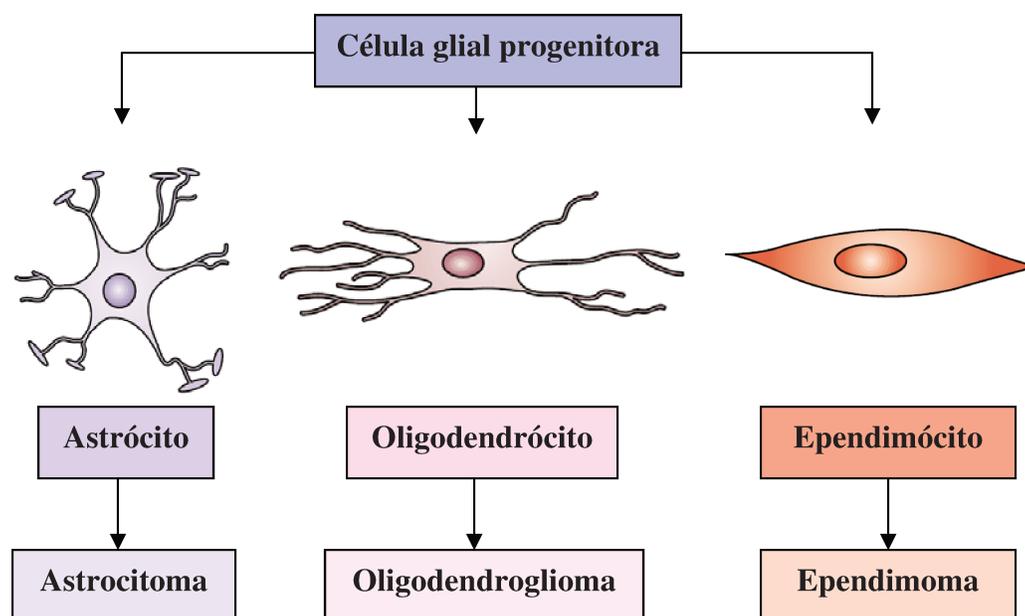


Figura 1 – Os gliomas podem ser originados a partir de diferentes tipos de células gliais, como os astrócitos, oligodendrócitos e ependimócitos, os quais possuem um progenitor em comum (Adaptado de RAO 2003).

Entre os gliomas, os astrocitomas estão entre as neoplasias mais comuns, sendo responsáveis por 60% dos casos de tumores cerebrais primários (ZHU *et al.* 2002), e estão subdivididos em quatro grupos de acordo com critérios histopatológicos pela OMS: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma infiltrativo (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma multiforme (grau IV) (Fig. 2).

O astrocitoma pilocítico é caracterizado como benigno, sendo mais comum em crianças e adolescentes, tendo altas taxas de sobrevida após ressecção tumoral (maior do que 5 anos em 96% dos casos) (dados do grupo Cancer Research UK), porém com o aumento do grau tumoral, somam-se características e a probabilidade de sobrevida do paciente diminui gradativamente.

O astrocitoma infiltrativo possui atipia nuclear e sua densidade vascular é levemente maior do que o do tecido sadio e após ressecção tumoral, 46% dos pacientes ultrapassam 5 anos

de sobrevida, já ao astrocitoma anaplásico soma-se a atipia nuclear a altas taxas de mitose, com aumento da densidade vascular (BRAT *et al.* 2004a) e diminuição da sobrevida do paciente.

Por último, o glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum e de pior prognóstico por ser muito agressivo e maligno (MAHER *et al.* 2001; CHOI *et al.* 2002; KONNIKOVA *et al.* 2003, HOLLAND 2000), possuindo atipia nuclear, altas taxas de mitose e áreas necróticas com pseudopaliçada (BRAT *et al.* 2004a). A manifestação do GBM é originada por progressiva disfunção neurológica dependendo da área do cérebro envolvida e é refratária aos principais métodos de tratamento, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (LEGLER *et al.* 1999) devido a sua plasticidade, características de crescimento infiltrativo e heterogeneidade. A vida média dos pacientes acometidos por este tipo de tumor após ressecção é menor do que dois anos (MAHER *et al.* 2001; ROSZMAN *et al.* 1991; WECHSLER-REYA & SCOTT, 2001), onde 42,4% dos pacientes alcançam seis meses de vida, 17,7% um ano e somente 3,3% alcançam o terceiro ano após os tratamentos (OHGAKI 2004).

O surgimento do GBM pode ser tanto devido à progressão tumoral de graus mais baixos (GBM secundário), comum em pessoas de meia-idade (média de 45 anos), ou pode surgir rapidamente sem demonstrar evidências de graus predecessores, tipicamente encontrado em pacientes mais velhos (média de 80 anos) (GBM primário ou *de novo*, Fig. 2) (OHGAKI *et al.* 2004).

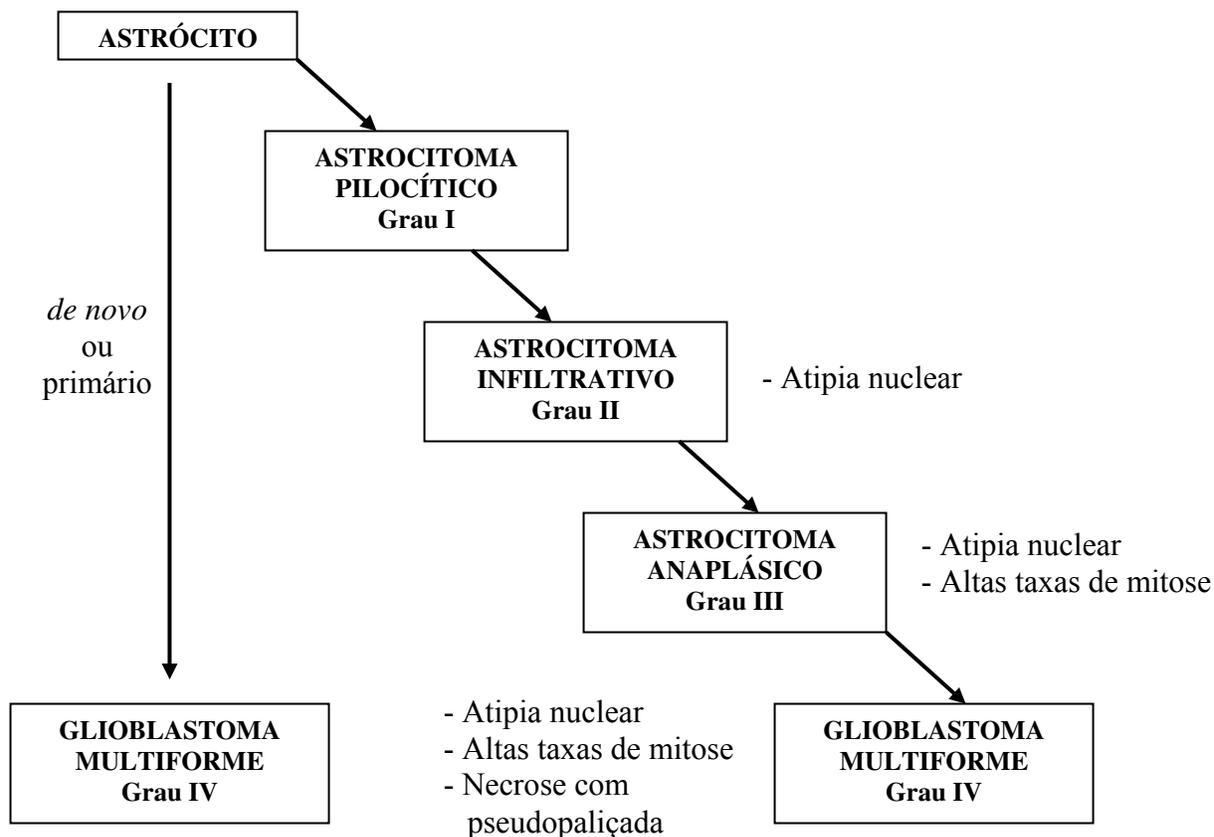


Figura 2 – Os astrocitomas são provenientes de células astrocíticas e são divididos em quatro graus de acordo com a OMS. O astrocitoma pilocítico possui o grau mais leve, não é invasivo e seu tecido é similar ao tecido cerebral normal. O astrocitoma infiltrativo possui atipia nuclear e menor tempo de sobrevivência. O astrocitoma anaplásico possui atipia nuclear e altas taxas de mitose, levando invariavelmente a progressão para o estágio mais avançado, o glioblastoma multiforme (secundário). Este possui as características previamente descritas adicionada de áreas necróticas com pseudopaliçada, podendo também surgir sem a detecção prévia de seus graus precedentes, sendo denominado *de novo* ou primário.

Com a finalidade de entender a biologia dos gliomas, a linhagem de glioma NG97 foi estabelecida em nosso laboratório a partir de células provenientes de tumor bruto obtido de um paciente cujo diagnóstico da biópsia foi astrocitoma de grau III. As células foram processadas, isoladas por tratamento enzimático e adaptadas ao cultivo *in vitro* inicialmente em meio seletivo a fibroblastos (meio essencial Eagle contendo D-valina) e subcultivadas posteriormente em meio RPMI suplementado (20% de Soro Fetal Bovino e antibiótico) por aproximadamente 120 passagens. Inicialmente duas populações morfológicamente distintas foram observadas; uma de células pequenas e arredondadas, e outra de células maiores do tipo fusiforme (GRIPPO *et al.* 2001).

A inoculação subcutânea das células NG97 no dorso de camundongos congenitamente atímicos (nu/nu) induziu o desenvolvimento de massa tumoral sólida, demonstrando sua tumorigenicidade e malignidade. As análises histológicas destas massas tumorais produzidas em camundongos *nude* demonstraram características celulares compatíveis à descrição de glioblastoma multiforme, denotando a progressão tumoral espontânea a partir do tumor original. Uma vez recuperadas da massa tumoral dos animais, processadas e digeridas enzimaticamente estas células foram colocadas em cultura (GRIPPO *et al.* 2001).

*In vitro*, estas células da linhagem NG97 apresentam tempo de duplicação médio de 24h e três morfotipias distintas quando analisadas por microscópio. Cada morfotipia da linhagem apresentava diferentes padrões morfológicos na superfície da membrana celular, tais como: (i) bolhas e filopódios nas células de formato arredondado, (ii) extensos prolongamentos e vesículas de secreção nas células do tipo dendrítica gigante e (iii) microvilosidades nas células do tipo fusiforme (MACHADO *et al.* 2005).

Recentemente, a linhagem NG97 foi reclassificada como um híbrido interespecífico de lote cromossomal murino hipertriplóide com translocações de cromossomos humanos

---

(MACHADO *et al.* 2008), sendo renomeado para NG97ht. É provável que a fusão tenha ocorrido no início do processo de caracterização da linhagem, quando esta foi inoculada em camundongos *nude* para verificar sua capacidade tumorigênica. Em mesmo trabalho, é referido que embora o componente murino exista, há a expressão de proteínas humanas e manutenção do padrão histopatológico maligno de glioblastoma quando estas células são injetadas em animais *nude* e CB17-SCID/SCID.

Estas massas tumorais geradas em camundongos imunodeficientes apresentam áreas hipercelulares que margeiam ambientes necróticos, denominadas de pseudopaliçadas (Fig. 3), sendo estas áreas utilizadas como ferramenta para classificação de glioblastomas.

Brat e colaboradores (2004b) descrevem estas áreas de pseudopaliçada como sendo compostas por células que estão migrando ativamente para fora de um ambiente necrótico/hipóxico originado pelo crescimento tumoral exacerbado, o qual não é acompanhado por uma angiogênese adequada, gerando a oclusão das vias de suprimento de oxigênio, e também pela trombose de vasos sanguíneos. Desta forma, estas células escapam deste ambiente pouco propício ao seu desenvolvimento e restabelecem suas condições normais ao alcançarem concentrações mais altas de oxigênio e nutrientes. É demonstrado ainda que estas células não se acumulam nestas áreas devido à diminuição das taxas de morte ou através do aumento da proliferação celular, além de expressarem enzimas de degradação de matriz extracelular, como as metaloproteinases.

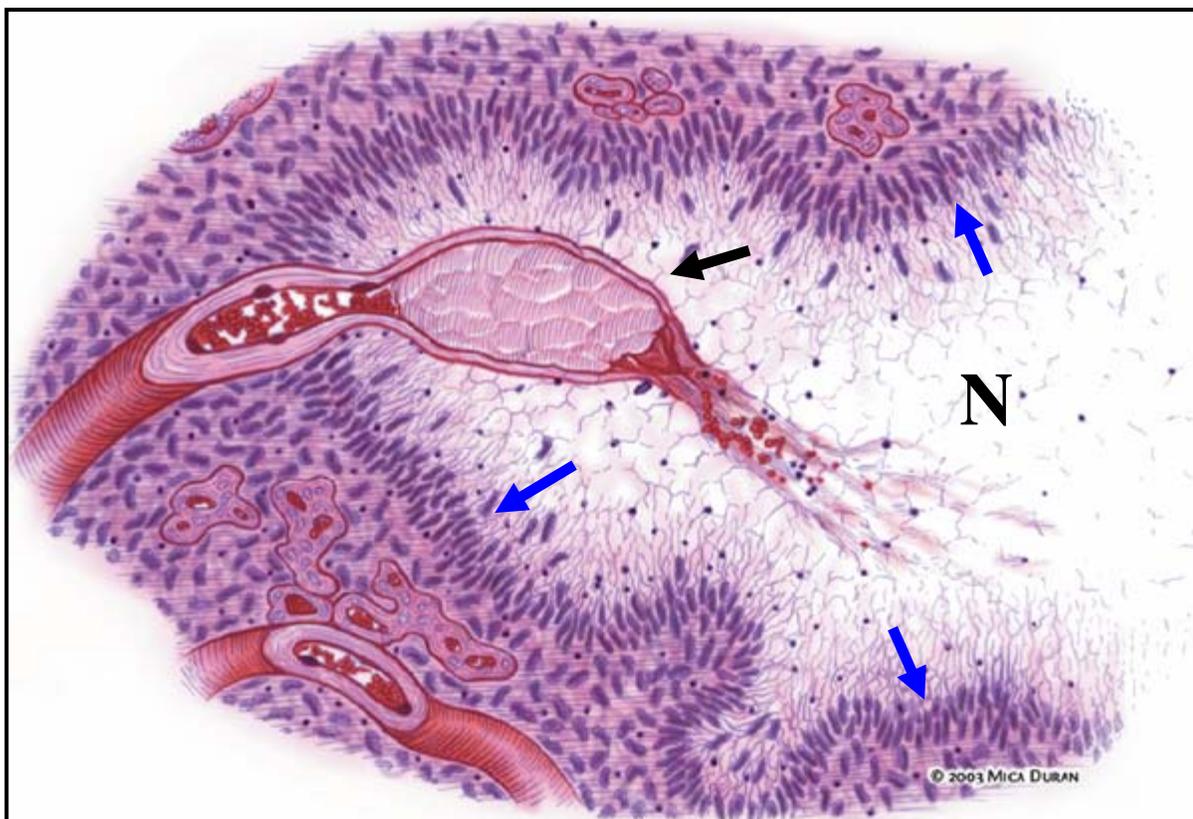


Figura 3 – Representação esquemática da formação da área de pseudopaliçada (setas azuis) em GBMs. Vaso-oclusão/colapso e trombose intravascular (seta preta) levam a hipóxia tecidual em sua região perivascular, levando à migração celular tanto em áreas próximas quanto distantes da vaso-oclusão e trombose devido à falta de vasos sanguíneos funcionais. Células tumorais que não migram sofrem apoptose ou necrose, eventualmente deixando uma zona central necrótica crescente (N). Células hipóxicas da pseudopaliçada demonstram secreção de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) mediado pelo Fator Induzido por Hipóxia (*hypoxia inducible factor*, HIF) (Adaptado de BRAT *et al.* 2004a).

É descrito que estas áreas de pseudopaliçada demonstram expressão nuclear do Fator Induzido por Hipóxia-1 (*hypoxia inducible factor-1*, HIF-1) (BRAT *et al.* 2004b,

SONDERGAARD *et al.* 2002). Powis & Kirkpatrick (2004) descrevem HIF-1 como um heterodímero que consiste de uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$  pertencentes a uma superfamília de fatores de transcrição eucarióticos na qual a ligação com o DNA é mediada por domínios básicos e dimerização de subunidades do domínio *basic-helix-loop-helix* (bHLH).

HIF-1 $\alpha$  é descrita como uma proteína produzida constitutivamente e cuja acumulação é estimulada pela hipóxia de células tanto normais quanto tumorais quando há uma distância maior do que 180 $\mu$ m do vaso. Neste caso, há seu acúmulo em ambientes privados de oxigênio a partir de uma concentração de 5% de oxigênio (40 mmHg), aumentando progressivamente sua atividade com a diminuição do gradiente de oxigênio até 0,2-0,1% (1,6-0,8 mmHg), perto da anóxia. Este fenômeno ocorre devido a vasos sanguíneos suprimidos por compressão ou obstruídos pelo seu crescimento, comumente encontrados no desenvolvimento rápido de tumores.

Em sua via de degradação induzida por concentrações normais de oxigênio, a proteína HIF-1 $\alpha$  é hidroxilada em dois resíduos específicos de prolina (Pro402 e Pro564) na região amino do domínio de ativação da transcrição (LANDO *et al.* 2002) por uma prolil-4-hidroxilase (PHD-1, 2 e 3) dependente de oxigênio, 2-oxoglutarato e ascorbato, por isso não há seu acúmulo em condições normais de oxigênio nas células. Esta sinalização promove reconhecimento pela proteína de von Hippel-Lindau, que se liga diretamente ao HIF-1 $\alpha$ , recrutando o complexo ubiquitinante para degradação da proteína pela via do proteossomo 26S (MAXWELL *et al.* 2001).

Esta molécula está relacionada à progressão tumoral e angiogênese, participando do controle da expressão de uma variedade de genes envolvidos na adaptação à deficiência de oxigênio que levam à sobrevivência celular e inibição da apoptose. Este processo ocorre pela alteração do metabolismo energético destas células, as quais passam a apresentar altas taxas de

glicólise anaeróbia, além de induzir a migração celular (POWIS & KIRKPATRICK 2004; SEMENZA 2003).

É visto que o estímulo da angiogênese por HIF é realizado pela ativação de genes como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), aumentando a oxigenação e sendo de vital importância para o crescimento tumoral (WENGER & GASSMANN 1997; PAPETTI & HERMAN 2002), sendo que tumores cerebrais relacionados com o aumento de HIF-1 $\alpha$  são mais agressivos e pró-angiogênicos (ZAGZAG *et al.* 2000, TALKS *et al.* 2000).

Em relação à migração celular, é demonstrada correlação positiva entre o acúmulo de HIF e o aumento de mobilidade e invasão tecidual. Brat e colaboradores (2004b) descrevem o aumento das taxas de migração quando células de glioblastoma das linhagens LN229, 2024 e WT11 são expostas à condições de hipóxia (1% de oxigênio) *in vitro*.

Em outros estudos é descrito que em linhagens de glioblastomas U87MG, U251MG, U373MG e LN18, a migração é dependente de HIF-1 $\alpha$  em hipóxia, onde o tratamento através de RNA de interferência contra o RNAm deste gene leva à diminuição das taxas de migração em todas as linhagens. Além disso, estes pesquisadores demonstram que HIF-1 $\alpha$  é importante na invasão do tecido normal cerebral por células de glioma (FUJIWARA *et al.* 2007).

Além de induzir a expressão destas moléculas e alterar o comportamento celular, a hipóxia também está relacionada com a expressão de outra proteína intrigante e de múltiplos papéis, a galectina-3 (ZENG *et al.* 2007; GREIJER *et al.* 2005; OLBRYT *et al.* 2006).

A galectina-3 é descrita como provável biomarcador para tumores cerebrais (PARK *et al.* 2008), sendo expressa largamente em áreas de pseudopaliçada (NEDER *et al.* 2004) e através de estudos prévios de nosso grupo (Ikemori, R. Y.; Iniciação científica - FAPESP #06/50408-2), esta proteína foi detectada por imunistoquímica nos tumores derivados do implante de células

NG97ht em camundongos *nude*, expressa ao longo de todas as células ao redor das áreas necróticas, porém não em suas outras áreas tumorais (Fig. 4).

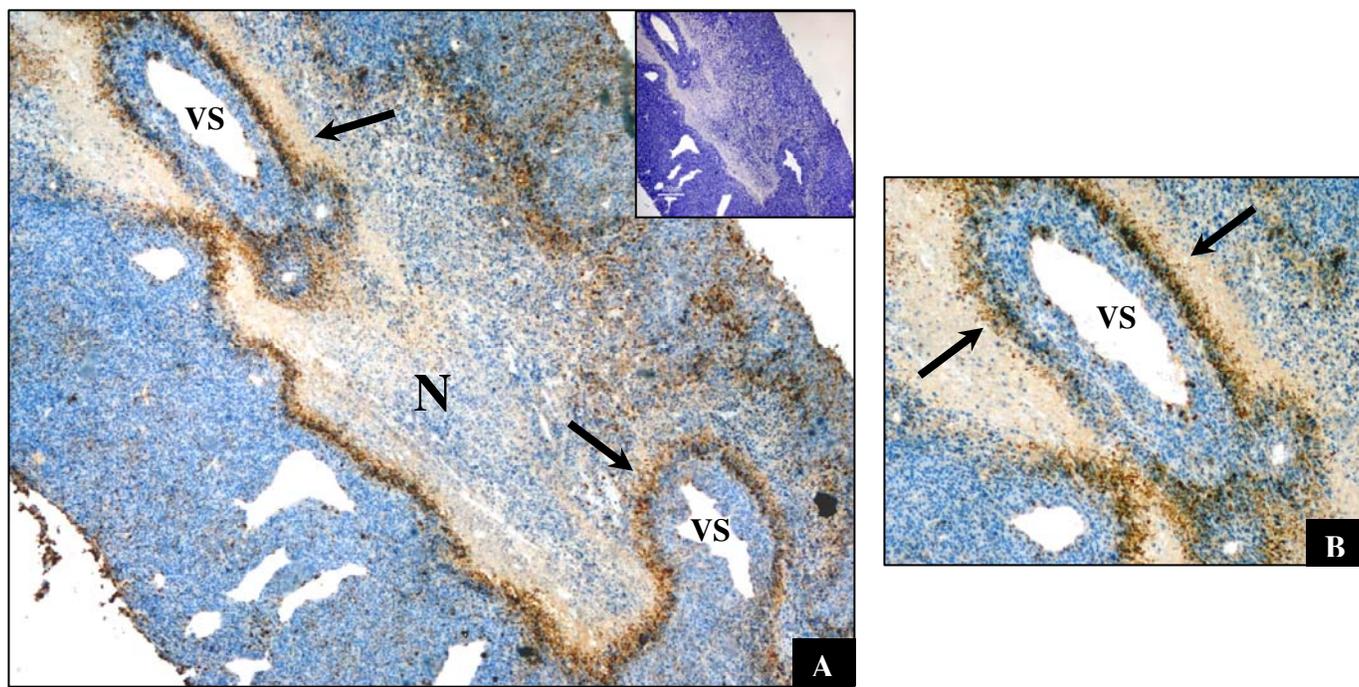


Figura 4 – Análise imunohistoquímica para galectina-3 em tumores derivados da inoculação de células da linhagem NG97ht em camundongos *nude*. (A, 100X) Evidencia-se positividade para galectina-3 na camada pseudopaliçada (setas), e postula-se que seja constituída de células tumorais migrantes de ambientes necróticos (N) possivelmente em direção a vasos sanguíneos (VS) (B, detalhe digitalmente ampliado). (A, figura superior direita) Controle negativo contra corado com hematoxilina (Ikemori, R. Y.; Iniciação científica - FAPESP #06/50408-2).

A galectina-3 pertence à família das galectinas, classificadas como lectinas com domínios ligantes a  $\beta$ -galactosídeos. Atualmente existem descritas 15 tipos de galectinas em mamíferos, sendo classificadas em três grupos distintos: protótipos, quimera e com repetições em *tandem* (HIRABAYASHI *et al.* 1993, ELOLA *et al.* 2007, LIU *et al.* 2005).

Todas as galectinas possuem uma seqüência principal contendo 130 aminoácidos e podem ser encontradas extracelularmente, na superfície das células, no citoplasma e no núcleo, embora não haja um peptídeo sinal secretório para sua inserção no retículo endoplasmático (COOPER & BARONDES, 1999), sendo realizada por uma via de secreção não-clássica pouco conhecida.

Estruturalmente, a galectina-3 apresenta de 29 a 35kDa e é única galectina classificada como de subtipo quimera. Em sua região C-terminal é encontrado o domínio de reconhecimento de carboidratos (*carbohydrate recognition domain*, CRD), a qual contém uma região conservada NWGR (asparagina, triptofano, glicina e arginina). Esta região é presente também no domínio BH1 da proteína Bcl-2, sendo responsável por sua ação anti-apoptótica, além de estar envolvida na multimerização da galectina-3 através de seu CRD (YANG *et al.* 1996).

Esta região C-terminal é conectada a uma região N-terminal incomum rica em aminoácidos prolina e glicina (KADROFSKE *et al.* 1998), a qual pode atuar no processo de ligação da galectina-3 a carboidratos, além de também participar no seu processo de multimerização. Esta região está implicada no processo de secreção da galectina-3 para fora da célula, além de afetar sua ação apoptótica através da fosforilação da Ser<sup>6</sup>, funcionando como um mecanismo *on-off* desta proteína. Tal fosforilação seria responsável pela redução da habilidade de ligação da galectina-3 com seu substrato, a qual é retomada após sua desfosforilação pela ação da fosfatase tipo I (MAZUREK *et al.* 2000). Cowles e colaboradores (1990) descrevem em experimentos realizados com fibroblastos murinos da linhagem 3T3 que a galectina-3 fosforilada é encontrada tanto no núcleo como no citoplasma, porém a galectina-3 desfosforilada é encontrada somente no citoplasma.

Devido a estas diferentes localizações e estrutura ímpar, a galectina-3 apresenta múltiplas funções celulares dependentes de sua compartimentalização.

No núcleo é reportada sua participação na remodelação do pré-mRNA (DAGHER *et al.* 1995), expressão gênica (PARON *et al.* 2003; LIN *et al.* 2002) e como supressor tumoral (CALIFICE *et al.* 2004). Apesar de possuir diversas funções nucleares, seu transporte para o núcleo ainda não é bem esclarecido, porém evidências tem sido demonstradas sobre a atuação do transporte ativo e também por difusão passiva (NAKAHARA *et al.* 2006).

No citoplasma pode atuar como inibidor apoptótico (AKAHANI *et al.* 1997) e também como promotor tumoral, aumentando sua capacidade de invasão, crescimento independente de ancoragem, crescimento tumoral *in vivo* e angiogênese e diminuição da indução da apoptose, demonstrando papéis opostos quando comparado com suas ações no núcleo (CALIFICE *et al.* 2004).

Na superfície celular pode atuar nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular quando presente na superfície ou secretada (KUKLINSK *et al.* 2000). É descrito ainda a possibilidade de indução da apoptose através da ligação da galectina-3 secretada com as  $\beta$ 1-integrinas em colonócitos da linhagem SW48, porém esta morte pode ser inibida através da adição de resíduos de ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 a  $\beta$ -galactosídeos em sua cadeia terminal, impedindo sua ligação com a galectina-3 (ZHUO *et al.* 2008). Também é visto que em células de linfoma, a galectina-3 atua na indução da apoptose pela ligação a resíduos de carboidratos na superfície celular, sendo esta aumentada após a ação de neuraminidases, indicando o papel do ácido siálico na proteção contra a morte celular (SUZUKI *et al.* 2008).

A galectina-3 também está relacionada ao aumento da mobilidade (DEBRAY *et al.* 2004) e adesão celular pela ligação com diversos componentes da matriz extracelular, como fibronectina (SATO *et al.* 1992), laminina (KUWABARA *et al.* 1996) e colágeno IV (OCHIENG *et al.* 1998), crescimento e diferenciação celular (YOSHII *et al.* 2002; BARONDES *et al.* 1994; NANGIA-MAKKER *et al.* 2000), promovendo às células resistência a espécies reativas de

nitrogênio e oxigênio (MOON *et al.* 2001), atuando como fator antiapoptótico contra diversos estímulos apoptóticos, como estaurosporina, TNF, radiação e anticorpos anti-FAS (AKAHANI *et al.* 1997; YANG *et al.* 1996; MATARRESE *et al.* 2000a/b) e sendo importante na formação de colônias metastáticas (SONG *et al.* 2000).

Devido ao seu domínio de ligação a carboidratos, a molécula de galectina-3 possui diversos ligantes biológicos, porém é visto que existe ligação preferencial a moléculas com resíduos de N-acetil-lactosamina (LacNac) (AGRWAL *et al.* 1993, SATO *et al.* 1992). Porém, além de interagir com resíduos de carboidratos, é descrita também a habilidade da galectina-3 de interagir com diversas moléculas não-glicosiladas através de interações proteína-proteína (LAING *et al.* 1988, WANG *et al.* 1995, MENON *et al.* 2000, PARON *et al.* 2003, ELADSFADIA *et al.* 2004, SHIMURA *et al.* 2004, SHIMURA *et al.* 2005).

Dumic e colaboradores (2006) descrevem estes ligantes de galectina-3 como moléculas estruturalmente e funcionalmente variadas, interagindo com a galectina-3 a partir de seus resíduos de N-acetil-lactosamina (LacNac), as quais podem ser inibidas por lactose. Porém nem todas as glicoproteínas com resíduos de LacNac demonstram serem ligantes de galectina-3 provavelmente devido a diferenças de afinidade de ligação como consequência de interferências estéricas por outras partes da cadeia de carboidratos ou por dobramentos protéicos específicos. Por outro lado, a especificidade da ligação da galectina-3 pode ser incrementada por uma seqüência particular de peptídeos em volta do resíduo de LacNac.

Também é possível que alguns ligantes *in vitro* não sejam biologicamente relevantes devido a sua expressão em células e tecidos que não apresentem galectina-3 e vice-versa. Além destes fatos, a expressão de galectina-3 tem que ser coordenada temporalmente para que haja interação com seus ligantes. Deste modo, não só a afinidade de ligação da galectina-3 com seus

ligantes e seus *status* de fosforilação são relevantes, mas também a coordenação de sua expressão espacial e temporal contribuem para que haja a devida interação entre estas moléculas.

Apesar de ter suas funções largamente descritas, seu controle transcricional ainda é pouco conhecido. É visto que a região promotora do gene de galectina-3 apresenta diversos elementos regulatórios, como 5 supostos sítios de ligação ao fator de transcrição Sp1, 5 sítios de motivos de resposta a elementos cAMP-dependentes, 4 sítios de ligação ao AP-1 e 1 tipo AP-4, 2 sítios do tipo NF- $\kappa$ B, entre outros (KADROFSKE *et al.* 1998), além de possuir diversas Ilhas CpG, as quais podem sofrer regulação através de sua metilação.

Tais alterações nos padrões de metilação de Ilhas CpG do promotor do gene de galectina-3, denominadas de alterações epigenéticas, são descritas em diferentes tipos tumorais, como da pituitária, mama (RUEBEL *et al.* 2005), próstata (AHMED *et al.* 2007) e melanomas (TEIXEIRA *et al.* 2006). Teixeira e colaboradores (2006) descrevem que o promotor de galectina-3 encontra-se em uma ilha CpG totalmente desmetilada em células provenientes de uma linhagem de melanócitos não-tumorigênicos murinos (melan-a), porém metilada em suas contrapartes tumorais (Tm1 e Tm5). Em mesmo trabalho, testes posteriores induzindo sua superexpressão *de novo* nas células tumorais levaram à diminuição do crescimento e incremento da sensibilidade à morte celular, demonstrando que a perda de expressão da proteína talvez seja uma vantagem para o crescimento de células de melanoma murino.

Deste modo, este trabalho tem como objetivo geral continuar com a caracterização da expressão de galectina-3 na linhagem de glioma híbrido NG97ht, analisando seus possíveis mecanismos de expressão, além de suas conseqüências funcionais frente a ambientes de hipóxia, mimetizando suas condições *in vivo*, como em áreas de pseudopaliaçada presentes nestes tumores derivados da inoculação destas células em camundongos *nude*.

# **OBJETIVOS**

## 2. Objetivo

Analisar os possíveis mecanismos de expressão de galectina-3 *in vivo* e suas conseqüências funcionais *in vitro* em células de glioma da linhagem NG97ht expostas a hipóxia.

## 3. Objetivos específicos

### 3.1 Experimentos *in vivo*

- Verificar se a metilação do promotor do gene de galectina-3 é responsável por sua modulação de expressão em regiões de pseudopaliçada, que expressam galectina-3, e regiões adjacentes que não expressam esta proteína nos tumores derivados da inoculação de células da linhagem NG97ht em camundongos *nude*.

### 3.2 Experimentos *in vitro*

- Realizar a caracterização da expressão de galectina-3 em células de glioma da linhagem NG97ht, analisando também o grau de metilação de seu promotor;
- Avaliar as possíveis alterações na produção de galectina-3 e suas conseqüências funcionais em células da linhagem NG97ht expostas a hipóxia mimética através de  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em câmara de hipóxia, modulando a concentração de soro fetal bovino (13% ou 1%), mimetizando ambientes necróticos tumorais com baixas concentrações de oxigênio e nutrientes.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Cultura de células

As células da linhagem de glioma NG97ht foram mantidas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com 13% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen) em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e repique realizado com ATV Tripsina-Versene (0,05%) (GIBCO, Invitrogen).

### 4.2 Xenotransplantes heterotópicos e processamento das massas tumorais

Para a análise histopatológica da linhagem NG97ht, 1x10<sup>6</sup> células foram inoculadas subcutaneamente no dorso de sete animais *nude*, os quais receberam células da passagem 37. Os animais "*Specific Pathogen Free*" (SPF) foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP e foram alimentados com água e ração autoclavados *ad libitum* trocadas três vezes por semana para manutenção de sua qualidade.

Ao final de 20 dias, o animal era sacrificado por eutanásia com uma solução de Xilasina 2% (Sedafarm®) e Cloridrato de Cetamina (Vetaset®) na proporção 1:3 (v/v) e todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas.

Após a remoção dos tumores, eles sofreram dois tratamentos distintos descritos a seguir:

#### *4.2.1 Fixação e emblocamento em parafina*

As massas foram fixadas em tampão formalina 3,4% por 24 horas, lavadas, desidratadas em gradientes alcoólicos 70%, 80%, 90% e 100%. Seguiram-se três banhos de xilol, xilol/parafina (v/v) e finalmente as massas foram incluídas em parafina e posteriormente

emblocadas a fim de serem cortadas em micrótomo. Para a análise histopatológica, as lâminas contendo cortes das massas tumorais foram coradas com Hematoxilina de Harris/Eosina (THOMPSON, S. W. 1966; SHEEHAN, D. C. 1987) e Tricômio de Masson (MASSON, M. 1929) e montadas em resina Permount e analisadas em microscópio de luz.

#### *4.2.2 Congelamento de tecidos*

Além da fixação em tampão formalina, as amostras foram imediatamente congeladas em meio de congelamento de tecidos (Jung, Leica) a  $-70^{\circ}\text{C}$ , garantindo boa conservação tanto de seu DNA e RNA como de proteínas para análises posteriores.

### 4.3 Análise do padrão de metilação em células da linhagem NG97ht *in vitro* e *in vivo*

#### *4.3.1 Extração de DNA*

O DNA genômico, tanto da linhagem NG97ht quanto das amostras de tecidos foi extraído segundo protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989) e a quantidade do DNA obtida foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Ao fim da extração, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, preparado a partir de solução estoque de TBE 10X, e brometo de etídeo 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A eletroforese foi realizada a 120 V em tampão TBE 1X e o padrão de migração do DNA foi verificado em transiluminador (ImageMaster, Pharmacia).



Este tratamento foi adaptado de Goldenberg e colaboradores (2004), onde são utilizados 2µg de DNA, 1µL de glicogênio (20mg/mL, Invitrogen) para carreamento do DNA, 2µL de hidróxido de sódio (NaOH) 3M em um volume final de 17µL. Esta solução foi misturada vigorosamente e centrifugada, sendo depois incubada a 50°C por 20 minutos em banho seco.

A seguir, as amostras foram tratadas com 500 µL de uma solução de bissulfito (2,5 M bissulfito de sódio, 1 M hidroquinona, 2 M NaOH) e incubadas, na ausência de luz, a 70°C por 3 horas. Ao fim desse período, adicionou-se 1mL de uma resina (*Wizard minipreps DNA purification resin*, Promega) a cada amostra e homogeneizou-se vigorosamente. A seguir, as amostras foram transferidas para uma minicoluna de purificação (*Wizard minicolumns*, Promega). Após a transferência, as minicolunas foram lavadas com 4 mL de isopropanol 80% e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Para eluição do DNA, transferiram-se as minicolunas para tubos de minicentrífuga, adicionaram-se 45µL de água préaquecida a 80°C e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Ao fim da incubação, as amostras foram centrifugadas e as minicolunas descartadas. Após a adição de 5 µL de NaOH 3M, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 75 µL de acetato de amônio 5M, incubou-se a solução por 5 minutos a temperatura ambiente, adicionou-se, então, 350 µL de etanol absoluto gelado, 1 µL de glicogênio 20 mg/mL (Invitrogen) e incubou-se a -20°C *overnight*.

Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, submetido a uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos e, após secar naturalmente, eluído em 20 µL de água ultrapura. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento de uso.

#### 4.3.4 PCR Metilação específica (MSP)

*Primers* específicos para distinção do DNA metilado do não-metilado foram descritos por Lahm *et al.* (2001) de forma que as amostras de DNA metiladas são somente amplificadas com os *primers* metilados (senso-5'AGT TTT GAT AGT TAG **CGG** AGC **GG** 3', anti-senso-5' CCA AAA CCC **GCT** AAC ATC **CCG** 3', dinucleotídeos CG em negrito) enquanto que as não metiladas são amplificadas com os *primers* não metilados (senso-5' TTA GTT TTG ATA GTT AGT **GGA** **GTG** G 3', anti-senso-5' ACC CAA AAC CCA CTA ACA TCC **CA** 3', dinucleotídeos CG em negrito) devido a troca de citosinas por uracilas durante o tratamento através do bissulfito de sódio.

O DNA das células NG97ht e do tumor, tanto de áreas positivas, como a pseudopaliçada, como áreas negativas para galectina-3, após modificação com bissulfito de sódio conforme descrito no item 4.3.3, foram amplificados por PCR utilizando os pares de *primers* previamente descritos. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 uL contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 0,16 µM de cada *primer* e 1 U de Taq *Platinum* (Invitrogen). Em cada tubo de reação foi adicionado 1 uL de DNA modificado com bissulfito de sódio. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 90 segundos e extensão final de 72°C por 1 minuto. Ao final da PCR, as amostras foram corridas em um gel de poliacrilamida 8%. Ao final da corrida, o gel foi fixado em 200 mL de solução de fixação (etanol absoluto e ácido acético glacial 0,5%), sob agitação, por 10 minutos, corado com AgNO<sub>3</sub> 10% por 10 minutos, lavado com água destilada e revelado com 200 mL de NaOH 3% e 2 mL de formaldeído 37%.

#### 4.3.5 Sequenciamento do DNA tratado por bissulfito de sódio

Após tratamento com bissulfito de sódio o DNA modificado foi amplificado por um protocolo de *Nested-PCR*, que consiste de duas reações de PCR, nas quais dois pares de *primers* são desenhados, sendo um mais externo (senso-5' TAG GTA GTT TTA GAT AAG GG 3', anti-senso-5' CCC CAA CAT ACC AAA AAA AAC 3') e outro mais interno (senso-5' GGT ATA GGT GAG GGG TAT AG 3', anti-senso-5' TAA CCA AAC TAA AAA CCA ACT AC 3'). A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 uL contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 200 uM de dNTPs (Invitrogen); 0,32 uM de cada *primer* (senso e anti-senso) e 1 U de *Taq Platinum* (Invitrogen). Para a primeira reação utilizaram-se os *primers* mais externos e 1 uL de DNA modificado. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C por 5 minutos, 2 ciclos de 94°C por 3 minutos, 50°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos, 5 ciclos de 94°C por 3 minutos, 52°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 6 minutos. Para a segunda reação de PCR utilizaram-se os *primers* mais internos, 1 uL da primeira reação e as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 5 minutos, 2 ciclos de 94°C por 3 minutos, 53°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos, 5 ciclos de 94°C por 3 minutos, 55°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minutos e extensão final de 72°C por 6 minutos.

Para verificar os perfis de amplificação, 3 uL de cada amostra da segunda PCR foram aplicados em um gel de poliacrilamida 8% e revelado como no item 4.3.4.

Os fragmentos foram clonados utilizando o *Kit* de clonagem *InsT/Aclone PCR Cloning Kit* (Fermentas) segundo especificações do fabricante. Após a inserção das seqüências nos plasmídeos, eletroporação e clonagem das bactérias e seleção dos clones transformados, 24 colônias de cada placa foram capturadas e adicionadas com o auxílio de palitos de dente

autoclavados a um tubo de reação de PCR (uma colônia por tubo). As reações foram realizadas em um volume final 20 uL contendo 1X tampão da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 uM de dNTPs (GIBCO BRL), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,4 uM de *primers* específicos para o plasmídeo (pUC/M13, senso-5' CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' e pUC/M13, anti-senso-5' TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA -3'). O DNA foi inicialmente denaturado por 5 minutos a 95°C e em seguida submetido a 35 ciclos de denaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. Finalmente correu-se um gel de agarose 1% em TBE 0,5X, acrescido de brometo de etídeo 0,5 ug/mL. A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TBE 0,5X por 1 hora. Ao final da corrida, o gel foi visualizado sob luz UV e, as colônias que continham um fragmento de DNA de ~640pb foram selecionadas e submetidas a uma reação de seqüenciamento.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada uma reação de seqüenciamento contendo somente *primer* anti-senso do mesmo vetor. A reação foi realizada em um volume final de 10 uL contendo 0,6 uL (~300ng) de amostra (produtos gerados a partir da PCR de colônia); 1 uL do mix BigDye e 0,5 uL de *primer* 10 uM.

As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 90 segundos, 35 ciclos de 95°C por 18 segundos, 55°C por 12 segundos, 60°C por 4 minutos.

Após a PCR, adicionaram-se 60 uL de isopropanol 75% a cada amostra, homogeneizou-se em vórtex e estocou-se no escuro a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, centrifugaram-se as amostras a 13.000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 150 uL de etanol 70%. Realizou-se uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* em 10 uL de formamida ultrapura. As amostras foram então

---

homogeneizadas vigorosamente em vórtex e incubadas a 95°C por 3 minutos. Em seguida, foram colocadas em banho de gelo por 90 segundos e submetidas à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante.

#### 4.4 Avaliação da produção de galectina-3: proteínas e RNA mensageiro

Foi realizada a análise da produção de galectina-3 nestas células da linhagem NG97ht, e devido à descoberta da fusão das células humanas da linhagem NG97 com células do estroma murino, houve a necessidade de se constatar também a origem da produção da galectina-3 nestas células. Realizaram-se ensaios de *western blot* para análises protéicas e reações de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se amostras controle humanas, como o câncer de mama MDA-MB-231, e murinas, como a linhagem de melanócitos Melan-a.

##### *4.4.1 Extrações protéicas*

Para a extração protéica, células das linhagens NG97ht, Melan-a e MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup>, tiveram seu sobrenadante descartado e foram então lavadas em tampão fosfato salino (PBS) gelado. Após este passo, as proteínas destas células foram extraídas através de um tampão detergente descrito por Califice *et al.* (2004) (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 0,1% triton x-100, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM de PMSF, 2µg/mL de aprotinina).

Após esta extração, o sobrenadante foi classificado como de fração citoplasmática e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise nuclear (50mM Tris, 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150mM NaCl, 1mM de EDTA, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF e 2µg/mL

aprotinina) por 15 minutos a 4°C e centrifugado a 15600xg por 10 minutos, sendo este novo sobrenadante classificado como de fração nuclear.

Após quantificação pelo Método de Lowry (1951), as proteínas foram incubadas em tampão não redutor (120mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% bromofenol blue e 20% glicerol) e aquecidas a 100°C em banho seco por 5 minutos, corridas em gel de eletroforese de bis 0,8%-acrilamida 30% em tampão de corrida pH 8,5 (250mM de Tris base, 190mM de glicina, 1% de SDS), e depois transferidas para membranas de PVDF em tampão de transferência (25mM Tris, 192mM glicina e 20% metanol) a 100 volts por 1 hora.

Os anticorpos utilizados nas membranas resultantes foram: IgG de rato anti-galectina-3 proveniente de hibridoma M3/38 e IgG de camundongo anti- $\beta$ -actina (ABCam). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-IgG de camundongo (SIGMA) e anti-IgG de rato (SIGMA), ambos conjugados com peroxidase, sendo as membranas reveladas pelo kit *Enhanced Chemiluminescence System* (ECL, Amershan Biosciences) e com o filme Amershan Hyperfilm (ECL, Amershan Biosciences).

#### 4.4.2 Extração do RNA mensageiro e criação de cDNAs

Para a análise do RNA mensageiro, células das linhagens NG97ht, Melan-a e MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, sendo então lavadas em PBS gelado. Após a retirada total do PBS, adicionou-se 0,5 mL de reagente de Trizol® (GIBCO BRL), sendo lisadas e retiradas por ressuspensão com uma micropipeta, depois foram transferidas para tubos de minicentrífuga, onde ficaram homogeneizando por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionou-se 100 uL de clorofórmio (Merck) a cada amostra, as quais foram homogeneizadas por inversão por aproximadamente 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos.

As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos.

Imediatamente após a transferência, 260 uL de álcool isopropílico (Merck) foram adicionados a cada amostra, que foram incubadas *overnight* a -20°C. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado duas vezes com 500 uL de etanol 75%.

Após homogeneização em vórtex, as amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C, o *pellet* foi dissolvido em água DEPC (dietilpirocarbonato, Merck), no volume de 10 a 30 uL (dependendo do tamanho do *pellet*), e as amostras incubadas a 60°C por 10 minutos para permitir a completa dissolução do RNA. Finalmente, as amostras foram estocadas a -70°C até o momento de uso.

A quantidade do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) e sua integridade foi verificada através da visualização de bandas ribossomais 28S e 18S íntegras.

Para a reação de transcriptase reversa, 2 ug de RNA total foram acrescentados 1 uL de oligo dT 500 ug/mL (Invitrogen), 1 uL de dNTP mix 10 mM (Invitrogen) e completado para 14 uL com água ultrapura. A seguir, incubou-se o material a 70°C por 10 minutos. Imediatamente após esse período, as amostras foram rapidamente resfriadas em gelo e brevemente centrifugadas. Adicionaram-se, então, 4 uL de tampão *first-strand* 5x (Invitrogen), 1 uL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1 uL de *Superscript III* 200 U (Invitrogen) e incubou-se as amostras por mais 50 minutos a 50°C. Para interromper a reação, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 minutos, e o cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

Para a análise dos cDNAs, realizou-se uma PCR com *primers* específicos para a sequência do RNA mensageiro de galectina-3 humana (senso-5' ATG GCA GAC AAT TTT TCG CTG C -

---

3', anti-senso-5' ATG TCA CCA GAA ATT CCC AGT T -3' ) e murina (senso-5' CCT GGA GCT TAT CCT GGT CA -3', anti-senso-5' GTC ACC ACT GAT CCC CAG TTT -3'). A reação teve um volume final de 20 uL contendo tampão de reação 1x (Invitrogen), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10uM de dNTPs (Invitrogen), 2uM de primers (Invitrogen) e 1U de Taq platinum (Invitrogen). As condições da PCR foram 95°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido de 72°C por 5 minutos.

#### 4.4.3 Análise da expressão de galectina-3 por imunofluorescência

Realizaram-se ensaios de imunofluorescência em células da linhagem NG97ht a fim de se verificar possíveis alterações na compartimentalização e/ou co-localização com organelas celulares, visto que a galectina-3 pode agir como agente anti-apoptótico como a família de proteínas Bcl-2 (AKAHANI *et al.* 1997), havendo a possibilidade de migração para a mitocôndria e impedimento da liberação de citocromo-C, o qual, no citoplasma, induziria a morte celular pela via das caspases.

Cerca de  $3 \times 10^3$  células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em lâminulas de 13mm em placas de 24 poços. Ao fim de 48 horas, as células foram incubadas por 40 minutos com um marcador para mitocôndrias (MitoTracker, 1:2000, Invitrogen), e depois foram fixadas em paraformaldeído 3,7% em pH 7,4 por 15 minutos, lavadas em PBS, havendo o bloqueio de sítios inespecíficos através de uma solução de PBS pH 7,4 com 5% de albumina do soro bovino e incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo anti galectina-3 (ABCam, A3A12). Depois as células foram incubadas com um anticorpo secundário anti-mouse ALEXA 488 por 3 horas a temperatura ambiente. Seus núcleos foram então marcados através de diamidino-2-fenil-indole (DAPI) e montadas em lâminas de vidro para análise em microscópio confocal (Zeiss LSM 510 Meta).

---

#### 4.5 Avaliação da expressão de ligantes de galectina-3 *in vitro* e *in vivo*

Além da avaliação da expressão de galectina-3, foram realizados experimentos para averiguar a expressão de ligantes de galectina em células *in vitro* em células da linhagem NG97ht e *in vivo* em tumores derivados da inoculação de células desta linhagem em camundongos *nude*, como descrito no item 4.2.

##### *4.5.1 Análise de ligantes de galectina-3 in vitro*

As células sofreram manejo de acordo com o item 4.1 e  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13mm, sendo deixadas *overnight* para adesão.

Após este período, o meio de cultura destas células foi retirado, sendo então fixadas em metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após este período, estas células foram lavadas 3 vezes em TBS, sofrendo posterior bloqueio em TBS-BSA 5% por 1 hora a temperatura ambiente.

A marcação para ligantes de galectina-3 foi realizada pela incubação com uma galectina-3 conjugada com fosfatase alcalina (gal-3FA), descrita por Mello e colaboradores (2007) diluída 1:7 em TBS-BSA 5% *overnight* a  $4^{\circ}\text{C}$  e para a reação controle, este passo foi omitido incubando estas lamínulas em TBS-BSA 5%. Após este período, estas células foram lavadas duas vezes em TBS-BSA 5% e uma vez em tampão fosfato alcalino (APB), sendo revelada por uma solução de NBT-BCIP.

##### *4.5.2 Análise de ligantes de galectina-3 in vivo*

Células da linhagem NG97ht foram inoculadas em camundongos *nude* como descrito no item 4.2 e fixadas como descrito no item 4.2.1. Foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas derivadas deste processo sofreram recuperação antigênica em tampão citro-fosfato pH

6,0 por 10 minutos em forno microondas. A seguir os cortes foram bloqueados em PBS-BSA 1% e então incubados em gal-3FA 30ug/mL em PBS-BSA 1% *overnight* a 4°C. Após lavagens, a solução foi revelada através de Fast Red em tampão Tris-HCl fosfato Naftol (1mg/mL, Dako). Amostras controle não sofreram incubação com gal-3FA, somente com PBS-BSA 1%.

#### 4.6 Ensaio de exposição à hipóxia mimética através de $\text{CoCl}_2$ 100 $\mu\text{M}$ ou em câmara de hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino

Os ensaios de exposição deram-se através de dois métodos distintos: hipóxia mimética através de  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em hipóxia ( $\text{pO}_2 < 1,5\%$ ) através de uma câmara de hipóxia (Billups-rothenberg – Modular Incubator Chamber, Del mar, Califórnia, EUA), sendo a concentração de oxigênio monitorada em tempo real através de um detector de oxigênio (PAC 3000, Dräger, Alemanha).

A utilização do  $\text{CoCl}_2$  como agente químico indutor da hipóxia tem como base suas propriedades descritas na estabilização do HIF-1 $\alpha$  pela inibição de sua ligação com a proteína de Von Hippel-Lindau, agente que induz a degradação do HIF-1 $\alpha$  em presença de oxigênio via proteossomo 26S (KANAYA *et al.* 2003; YUAN *et al.* 2003) e apesar de existir oxigênio disponível para a célula, ela se comporta como se estivesse em hipóxia, ocorrendo indução de fatores de adaptação a falta de oxigênio.

Os ensaios foram realizados com variação da concentração de soro fetal bovino, utilizando condições normais de cultura celular com meio RPMI completo com 13% de soro fetal bovino, ou privado com 0% ou 1% de soro fetal bovino. Estas duas últimas situações reproduzem o microambiente necrótico tumoral, o qual possui baixa concentração de oxigênio e nutrientes devido a sua distância ou bloqueio de vasos sanguíneos.

A exposição à hipóxia mimética através de cloreto cobaltoso deu-se pela retirada do meio de cultura enriquecido, lavagem das células com PBS e adição de meio RPMI completo ou privado de soro fetal bovino e com concentração final de  $\text{CoCl}_2$   $100\mu\text{M}$ , sendo as incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

A exposição à hipóxia em câmara de hipóxia deu-se pela troca de meio de cultura enriquecido, lavagem das células com PBS e adição de meio RPMI completo ou privado de soro fetal bovino. A seguir, estas células sofreram incubação em câmara de hipóxia por 10 minutos em atmosfera com 95% de  $\text{N}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$  (20 litros/minuto), sendo posteriormente lacrado e mantido a  $37^\circ\text{C}$ , sendo a concentração de  $\text{O}_2$  nesta situação monitorada por um detector (PAC 3000, Draeger, Alemanha).

Os controles utilizados tiveram remoção do meio de cultura, lavagem em PBS e adição de novo meio RPMI completo ou privado de soro fetal bovino, sendo então incubados em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , não sofrendo qualquer tratamento.

Os seguintes dados foram analisados:

#### *4.6.1 Análises de expressão gênica de galectina-3 por PCR em Tempo Real*

As células foram plaqueadas em garrafas de  $25\text{cm}^2$ , de acordo com o item 4.1, e tratadas de acordo com o item 4.5, expondo estas células à normóxia,  $\text{CoCl}_2$   $100\mu\text{M}$  e hipóxia por 3, 6, 24 e 48 horas em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino. Ao final do tratamento, tinham seu RNAm extraído e seu cDNA criado como descrito no item 4.4.2.

Para a reação de qRT-PCR utilizou-se a metodologia do *SYBR-Green*, na qual um fluoróforo é capaz de se ligar ao DNA dupla fita, aumentando sua fluorescência ao longo da reação. Os valores quantitativos foram obtidos no ponto no qual a fluorescência emitida

ultrapassou um limiar de detecção estabelecido de 0,2 (CT: *Cycle Threshold*), ou seja, no ponto no qual a amplificação do produto foi detectada. Os dados de quantificação obtidos foram analisados pelo *software* de análise do aparelho *Rotor Gene 3000* (Corbett Life Science).

Primeiramente, realizou-se a curva de eficiência do gene de galectina-3 (alvo) e da  $\beta$ -actina (normalizador). Para tal, utilizou-se quantidades exponenciais de cDNA em duplicata (100ng, 10ng, 1ng, 0,1ng, 0,01ng) em um volume final de 20ul de reação contendo tampão de reação 1x (Invitrogen), 1,5mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen), 1U Taq Platinum (Invitrogen), 10uM de dNTPs (Invitrogen), 1,5  $\mu$ M de primers para galectina-3 murina (senso-5' CCT GGA GCT TAT CCT GGT CA -3', anti-senso-5' GTC ACC ACT GAT CCC CAG TTT -3') e  $\beta$ -actina (senso-5' AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC -3', anti-senso-5' AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA -3'), 1% de SYBR Green 1:100 (Invitrogen) e 5% de DMSO (dimetil sulfóxido, SIGMA).

As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Uma etapa final, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 72°C para 95°C a 1°C a cada 5 segundos com a contínua aquisição da fluorescência, foi adicionada ao fim da amplificação para submeter os produtos amplificados a uma curva de dissociação.

A expressão diferencial da galectina-3 (transcrito alvo) foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador, no caso, a  $\beta$ -actina. Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), seguindo a fórmula:

$$R = (E \text{ alvo})^{\Delta CT \text{ alvo (controle-tratado)}} / (E \text{ normalizador})^{\Delta CT \text{ normalizador (controle-tratado)}},$$

Onde:

**E alvo:** Eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o transcrito alvo, no caso galectina-3;

**E normalizador:** Eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene normalizador, no caso  $\beta$ -actina;

**$\Delta$ CT alvo:** Corresponde à diferença entre o CT de galectina-3 obtido para a amostra de referência (controle) e do CT de galectina-3 obtido para a amostra em análise (tratado);

**$\Delta$ CT normalizador:** Corresponde à diferença entre o CT da  $\beta$ -actina obtido para a amostra de referência (controle) e do CT da  $\beta$ -actina obtido para a amostra em análise (tratado).

As eficiências de amplificação dos *primers* foram calculadas de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/slope)},$$

Onde o *Slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do CT do transcrito alvo e do normalizador em função do *log* de diferentes quantidades de cDNA.

#### 4.6.2 Análises protéicas de galectina-3

As células foram mantidas em cultura como descrito no item 4.1, sendo expostas à hipóxia mimética através de  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou em câmara de hipóxia com variação de soro fetal bovino (13% ou 1%) por 48 horas como descrito no item 4.5. Após estas exposições, as proteínas foram extraídas e analisadas pelo método descrito no item 4.4.1.

#### 4.6.3 *Análise das taxas de migração celular em transwell*

Células da linhagem NG97ht foram cultivadas como descrito anteriormente e utilizadas em ensaios de migração celular em placas *Transwell Permeable Support 3422*, poro de 8µm (Costar). Os insertos das placas foram sensibilizados com fibronectina, um estimulante migratório, recebendo aplicações de 0µg/ml ou 10µg/ml de fibronectina em 500µL de meio sem soro durante uma hora a 37°C.

Seguiu-se o bloqueio de sítios inespecíficos através 10µg/mL de BSA em 500µL de meio sem soro por inserto por uma hora a 37°C, sendo a solução de BSA também adicionada de CoCl<sub>2</sub> 100µM para os experimentos envolvendo esta molécula.

As garrafas foram tripsinizadas como descrito no item 4.1, sendo adicionadas 1x10<sup>5</sup> células/500µL de meio sem soro para cada inserto. Estas células sofreram três tipos de tratamento, sendo um em ambiente normóxico, em CoCl<sub>2</sub> 100µM e em câmara de hipóxia em meio privado com 0% de soro fetal bovino, como descrito no item 4.6.

Estes testes foram realizados em triplicata e após 3 e 24 horas de migração as células foram fixadas em PBS-Paraformaldeído 1% por 15 minutos e coradas em Azul de Toluidina durante 5 minutos. Após limpeza e secagem dos insertos, as células migradas foram contadas em microscópio de luz invertido.

#### 4.6.4 *Análise da morte celular com detecção pela incorporação de iodeto de propídeo*

As células foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços (Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), cada um contendo 1x10<sup>5</sup> células e sofreram os tratamentos descritos no item 4.6 por 24, 48 e 72 horas.

Após esta exposição, as células foram retiradas por tripsinização e sofreram procedimento experimental para avaliação do ciclo e morte celular por incorporação do iodeto de propídeo (AUZUBEL *et al.*, 1995; ROSKANS, J. & RODGERS, L. 2002), sendo sua leitura realizada em aparelho de citometria FACS Calibur.

#### 4.6.5 Análise do impacto do knockdown de galectina-3 na sobrevivência celular e na expressão de galectina-3

As células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços (Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), cada um contendo  $1 \times 10^5$  células em meio RPMI completo com 13% de SFB. Após adesão por um período de 17 horas, o meio foi retirado e as células foram lavadas com meio OPTIMEM (Gibco, Invitrogen) para retirada total de seu soro fetal bovino.

Após as lavagens, as células foram incubadas com 100pmols de siRNA anti galectina-3 (5' rUrUrUrCrCrUrGrArUrUrArGrUrGrCrUrCrCrArCrCrCrGrCrCrGrC -3'; 5' - /5Phos/rGrGrGrGrGrGrUrGrGrArGrCrAeCrUrArArUrCrArGrGrAAA -3') ou 100pmols de siRNA controle em 4ul de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) por poço e deixadas por 6 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim deste período, as células foram expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100uM ou hipóxia com meio completo com 13% ou privado com 1% de soro fetal bovino.

Após 48 horas, estas células foram retiradas para análise de morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo, como descrito no item 4.6.3, e avaliação do *knockdown* de galectina-3 através de *western blots*, como descrito no item 4.4.1.

Além destas análises, também houve avaliação de possíveis mudanças de ciclo celular nestas células expostas ao siRNA anti-galectina-3.

#### 4.6.6 Análise do padrão de sialilação frente à privação de soro fetal bovino

As células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> de acordo com o item 4.1, alcançando uma confluência celular de cerca de 80%, sendo então expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM ou hipóxia com 13%, 1% ou 0% de soro fetal bovino por 48h.

Ao fim deste processo, houve extração protéica destas células de acordo com o item 4.4.1, sendo então realizadas membranas em PVDF para análise do padrão de sialilação destes extratos através do *DIG Glycan Differentiation Kit* (Roche) seguindo as instruções do fabricante. Estas membranas foram incubadas com SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) e DSA (*Datura stramonium* agglutinin) conjugado a digoxigenina.

O SNA é capaz de reconhecer ligações α2-6 de ácido sialico à galactose em sua porção terminal de cadeias de carboidratos, enquanto que o DSA reconhece ligações terminais de galactose-β(1-4)-N-acetilglucosamina, capaz de demonstrar a diminuição de ácido siálico e aumento da exposição de resíduos de carboidratos.

#### 4.6.7 Análise do impacto da inibição da sialilação na proteção contra a morte pela galectina-3 extracelular

A avaliação de um possível papel da galectina-3 extracelular na indução da morte em células da linhagem NG97ht com diminuição da adição de ácido siálico terminal em cadeias de carboidratos foi realizado utilizando-se a lactose como substrato competidor da ligação da galectina-3 com receptores de superfície celular.

As células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços (Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), cada um contendo 1x10<sup>5</sup> células em meio RPMI

completo com 13% de SFB. Após a adesão *overnight* destas células, os poços foram lavados com meio RPMI sem soro e então sofreram exposição à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e hipóxia em meio RPMI privado com 1% de soro fetal bovino como descrito no item 4.6.

Complementando esta exposição, estas células foram também tratadas com lactose 10 e 20mM (SIGMA), um ligante de galectina-3 de baixa afinidade, sacarose 20mM (VETEC), como controle da adição de carboidratos, e também foi realizada uma triplicata inalterada como controle.

Ao fim de 48 horas de exposição, estas células foram extraídas de acordo com item 4.6.3 para análise da morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo.

#### 4.7 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 4.0 utilizando os parâmetros de avaliação *Two-Way ANOVA*.

# **RESULTADOS**

## 5. Resultados

### 5.1 A galectina-3 é produzida *in vitro* desde passagens baixas a altas na linhagem NG97ht

A caracterização da expressão de galectina-3 nestas células de glioma da linhagem NG97ht foi realizada a partir de extratos protéicos de células *in vitro* em diversas passagens, como passagens baixas realizadas após o início de seu cultivo *in vitro*, como passagens mais altas, e foi demonstrado por *western blot* que há expressão estável de galectina-3 por todas estas passagens (Fig. 6).

Além dos ensaios realizados por *western blot*, análises de imunofluorescência demonstraram a distribuição citoplasmática de galectina-3 nestas células da linhagem NG97ht (Fig. 7) com pouca ou nenhuma marcação nuclear, além de apresentar padrão de expressão peculiar, com marcações pontuais em grânulos dentro da célula. Também foi possível observar algumas células com fenótipo espraído contendo galectina-3 em suas porções mais terminais (seta branca).

Quanto à localização mitocondrial, é possível visualizar mitocôndrias na região perinuclear nestas células da linhagem NG97ht, porém não houve co-localização de mitocôndrias com a proteína de galectina-3 quando analisada através de microscopia confocal (dados não mostrados).

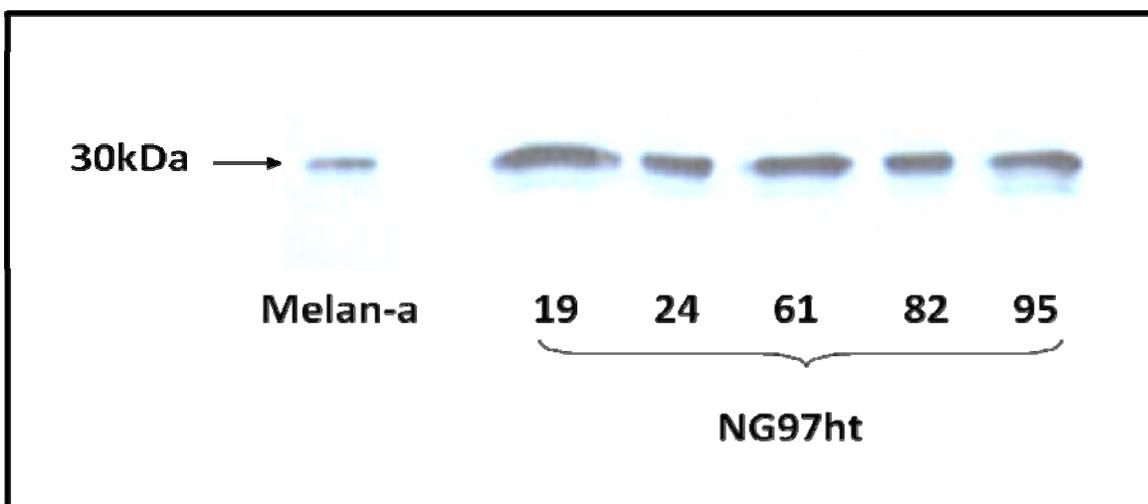


Figura 6 – *Western blot* para caracterização da expressão de galectina-3 em extratos protéicos citoplasmáticos de diversas passagens celulares *in vitro* da linhagem de glioma NG97ht. Constatação da produção estável de galectina-3 com cerca de 30kDa em células em cultura de diferentes passagens: 19, 24, 61, 82 e 95, utilizando como controle positivo proteínas de melanócitos murinos (linhagem Melan-a).

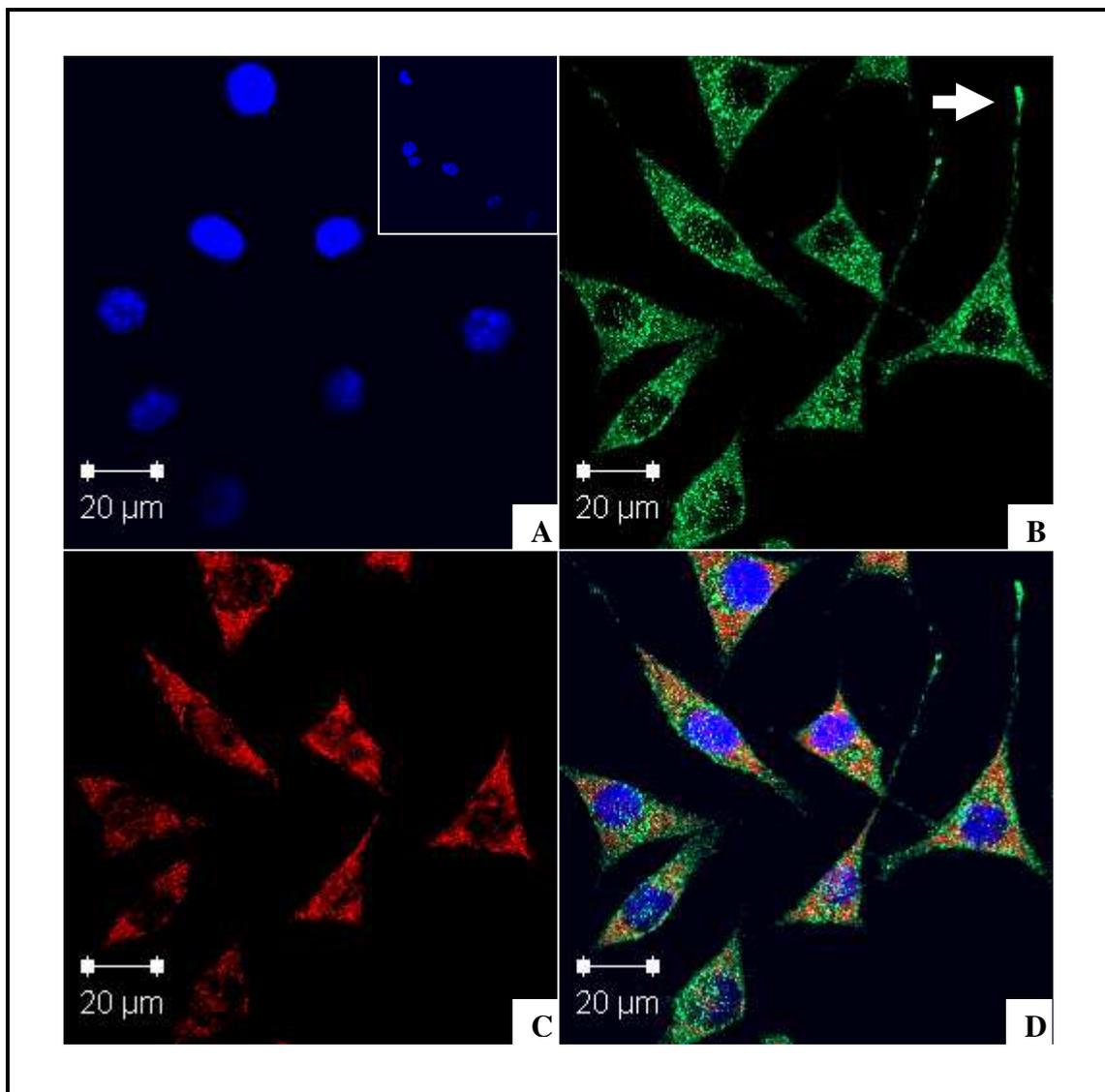


Figura 7 – Imunofluorescência para galectina-3 *in vitro* em células da linhagem NG97ht. (A) Marcação nuclear através de DAPI. (B) Marcação de galectina-3 demonstrando padrão de expressão predominantemente citoplasmático e em padrão granular, além de demonstrar positividade em focos de adesão para galectina-3 em células espreiadas (seta branca). (C) Marcação mitocondrial através de MitoTracker com localização perinuclear. (D) Junção dos quadros A, B e C. Figura superior esquerda: controle negativo.

## 5.2 Produção de galectina-3 a partir do genoma murino

Devido ao fenômeno da fusão celular, foram realizados testes para verificar a origem da produção da proteína de galectina-3, se a partir do genoma humano, responsável pelo fenótipo de glioblastoma multiforme, ou genoma murino, derivado das células do estroma do camundongo *nude* no qual estas células foram inoculadas.

Os testes envolvendo ensaios de *western blot* demonstraram alterações no padrão de peso molecular da galectina-3 produzida por esta linhagem, NG97ht, similar ao peso comparando-se com o da linhagem de melanócitos murina, Melan-a, e diferente da linhagem de câncer de mama humano, MDA-MB-231, ambas positivas para galectina-3 (dados não mostrados), indicando a possibilidade da produção desta proteína a partir do genoma murino nestas células da linhagem NG97ht.

Em ensaios posteriores, analisou-se o RNA mensageiro destas três linhagens através de *primers* específicos para a sequência murina (amplificado de 504pb) e humana (amplificado de 719pb). Viu-se através da análise dos fragmentos amplificados através de PCR e submetidos a eletroforese em gel de agarose que o par de *primers* específico para a sequência humana amplificou somente a amostra MDA-MB-231, enquanto que o par de *primers* específico para a sequência murina amplificou tanto a amostra NG97ht quanto a Melan-a, indicando a produção de galectina-3 a partir do genoma murino em células da linhagem NG97ht (Fig. 8).

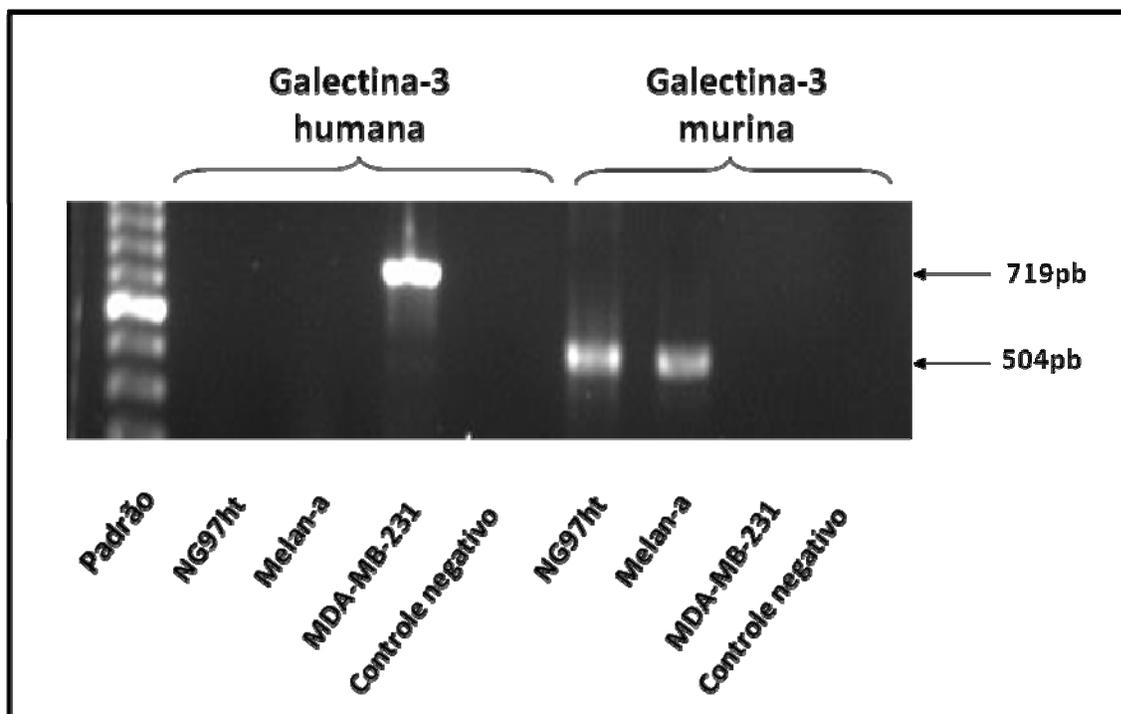


Figura 8 – Análise por eletroforese de produtos de cDNA amplificados por PCR obtidos da linhagem NG97ht, linhagem de melanócitos murinos Melan-a e câncer de mama humano MDA-MB-231. *Primers* específicos para a galectina-3 humana amplificaram o cDNA da linhagem MDA-MB-231 (719pb), porém não das linhagens NG97ht e Melan-a, enquanto que *primers* específicos para a galectina-3 murina amplificaram tanto o cDNA das linhagens NG97ht e Melan-a (504pb), porém não de MDA-MB-231, demonstrando possível produção de galectina-3 a partir do genoma murino na linhagem NG97ht.

### 5.3 Expressão de ligantes de galectina-3

Análises por testes citoquímicos *in vitro* da expressão de ligantes de galectina-3 através desta proteína conjugada com fosfatase alcalina revelaram padrões de distribuição citoplasmáticos/membranar com a ausência destes ligantes no núcleo das células da linhagem NG97ht (Fig. 9A).

A possibilidade da ocupação de sítios de ligação de galectina-3 no núcleo das células foi analisada através de *western blots* comparando-se a ação de tampões redutores e não-redutores e confirmou-se a ausência de ligantes de galectina-3 no núcleo destas células analisadas (dados não mostrados).

Através destes mesmos ensaios também se evidenciou a presença de ligantes de gal-3 em regiões perinucleares destas células, indicando a localização no Complexo de Golgi.

Além da análise de ligantes *in vitro*, ensaios foram realizados para detecção de ligantes de galectina-3 em cortes histológicos de tumores provenientes da inoculação das células da linhagem NG97ht em camundongos atímicos. Houve detecção de ligantes de galectina-3 principalmente em grupos celulares constituintes da camada de pseudopaliçada (Fig. 9B/C/D - setas). É possível que esta marcação seja de células tumorais, mas também de células infiltradas, como macrófagos e neutrófilos, sendo também detectados ligantes na matriz extracelular. Fora da camada de pseudopaliçada, encontramos células infiltradas positivas para ligantes, como também células endoteliais.

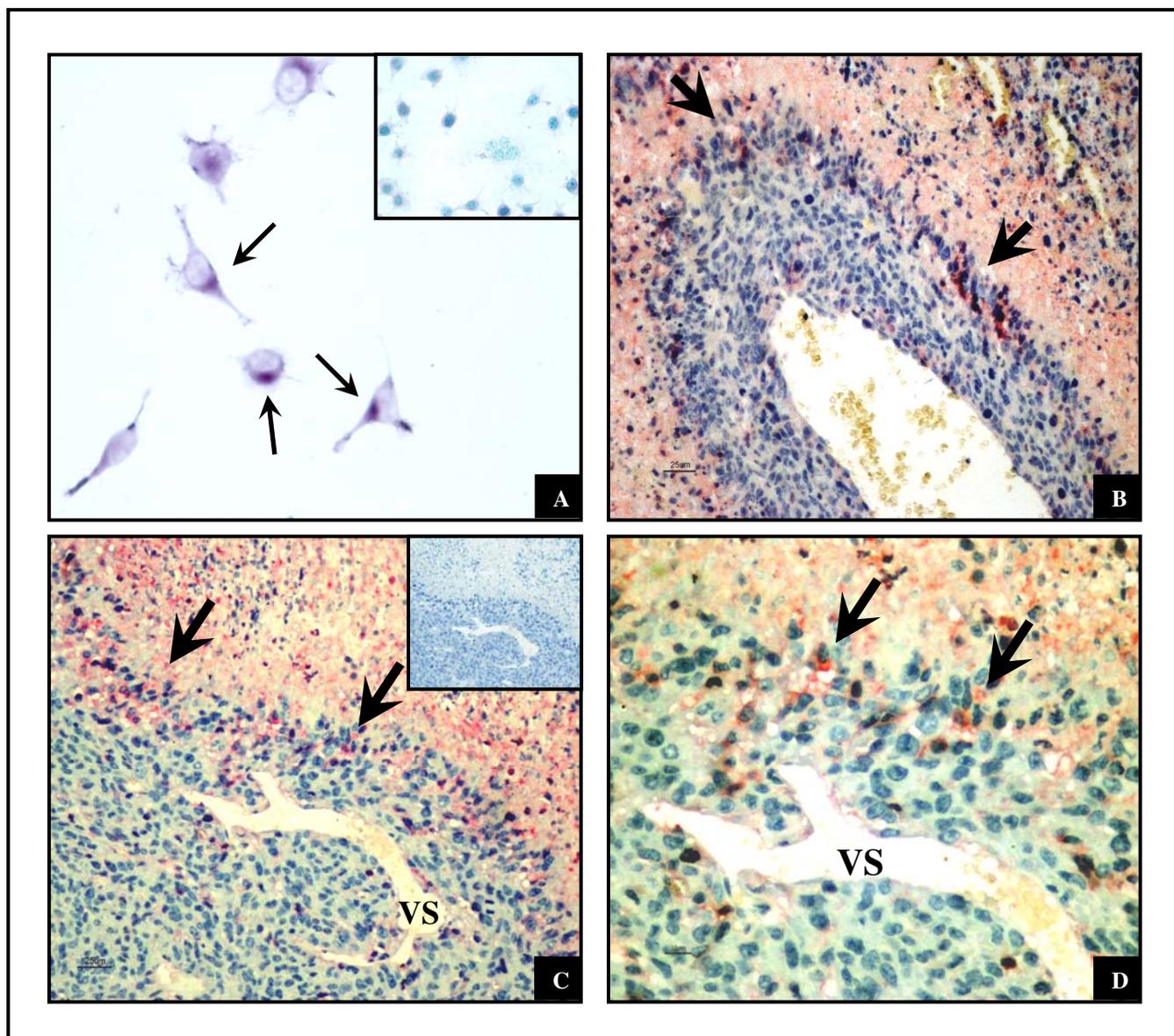


Figura 9 – Análise da expressão de ligantes de galectina-3 *in vitro* e *in vivo* por citoquímica em células da linhagem de glioma NG97. (A, 400x) Citoquímica para células *in vitro* marcadas com galectina-3 conjugada com fosfatase alcalina e contra-coradas com verde de metila; padrão de expressão citoplasmático/membranar com áreas de concentração (setas) provavelmente apontando Complexos de Golgi. (B, 100x; C, 100x; D, 200x) Histoquímica para ligantes de galectina-3 em tumor derivado da inoculação de células da linhagem de glioma NG97ht em camundongos atímicos; detecção de ligantes em células e em regiões da matriz extracelular da zona de pseudopaliçada (setas). (A e C, canto superior direito) Controle negativo.

---

#### 5.4 A expressão de galectina-3 não é modulada através da metilação de seu promotor

As análises por PCR metilação-específica (MSP) demonstraram dados contraditórios em relação a possível metilação do promotor do gene de galectina-3 nesta linhagem NG97ht, onde o promotor de células *in vitro* demonstrou-se completamente não metilado, enquanto que áreas tumorais positivas e negativas para galectina-3 demonstraram variações em suas bandas de amplificação, indicando tanto amostras com DNA metilado quanto não metilado (dados não mostrados).

Porém estes dados de MSP não se confirmaram quando o promotor de galectina-3 foi seqüenciado. Foi visto que a região de seu promotor possui 36 dinucleotídeos CGs passíveis de serem metilados e foram obtidos os seguintes resultados:

- *In vitro*:
  - 0,2777% dos dinucleotídeos CG de células *in vitro* apresentaram metilação (1 dinucleotídeo metilado de 360 possíveis)
- *In vivo*:
  - Células que não expressam galectina-3: 0,2314% dos dinucleotídeos CG apresentaram metilação (2 dinucleotídeos metilados de 864 possíveis)
  - Áreas de pseudopaliçada que expressam galectina-3: 0,8680% dos dinucleotídeos CG apresentaram metilação (5 dinucleotídeos metilados de 576 possíveis).

Estes dados indicam que a modulação da expressão de galectina-3 nos tumores originados pela inoculação destas células em camundongos imunodeficientes não é devido à metilação de seu promotor.

## 5.5 Ensaio em hipóxia mimética e em câmara de hipóxia

### 5.5.1 Aumento da expressão de galectina-3 em hipóxia e hipóxia mimética

Os testes de PCR em tempo real realizados a partir do cDNA extraído de células em normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em câmara de hipóxia não demonstraram alterações estatisticamente significantes na produção do RNAm de galectina-3 em relação ao controle após 3h e 6h de exposição (Tab. 1 e Fig. 10A).

Tabela 1 - Indicação das alterações nas expressões relativas de galectina-3 quando expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipóxia por 3, 6, 24 e 48 horas em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

<b>Alterações na expressão relativa de galectina-3 (%)</b>		
<b>Tempo (h)</b>	<b>13% soro fetal bovino</b>	
	<b><math>\text{CoCl}_2</math> 100<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Hipóxia</b>
<b>3h</b>	-14,93	-20,20
<b>6h</b>	-13,20	-5,53
<b>24h</b>	+69,35**	+108,06***
<b>48h</b>	+49,53*	+128,12***
	<b>1% soro fetal bovino</b>	
<b>3h</b>	+35,42	+22,51
<b>6h</b>	+54,42	+51,17
<b>24h</b>	+168,64***	+490,83***
<b>48h</b>	+159,89***	+248,69***

Porém, após 24 horas de exposição a estes três tratamentos, demonstrou-se aumento relativo de produção do RNAm de galectina-3 em relação ao controle tanto em hipóxia quanto

em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  nesta linhagem NG97ht quando realizado em meio completo com 13% de soro fetal bovino. Estes aumentos permanecem também após 48 horas de exposição à hipóxia e em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$ .

Quando estas células foram expostas nestas mesmas condições, porém com redução da disponibilidade de soro fetal bovino (1%), houve indução aparente, porém não estatisticamente significativa, em 3 e 6 horas de exposição de hipóxia e  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  (Fig. 10B e Tab. 1).

A partir de 24 horas, houve aumento significativo da produção do RNAm de galectina-3 em hipóxia e em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$ , permanecendo até 48 horas de exposição.

Quanto ao aumento de expressão protéica de galectina-3, demonstrou-se aumento através de *western blot* desta proteína após 48h de exposição tanto em meio completo quanto privado de soro fetal bovino em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  (39% e 86%, respectivamente) e em hipóxia (115% e 155%, respectivamente), demonstrando correlação entre ao aumento do RNAm e da proteína de galectina-3 nestas células da linhagem NG97ht.

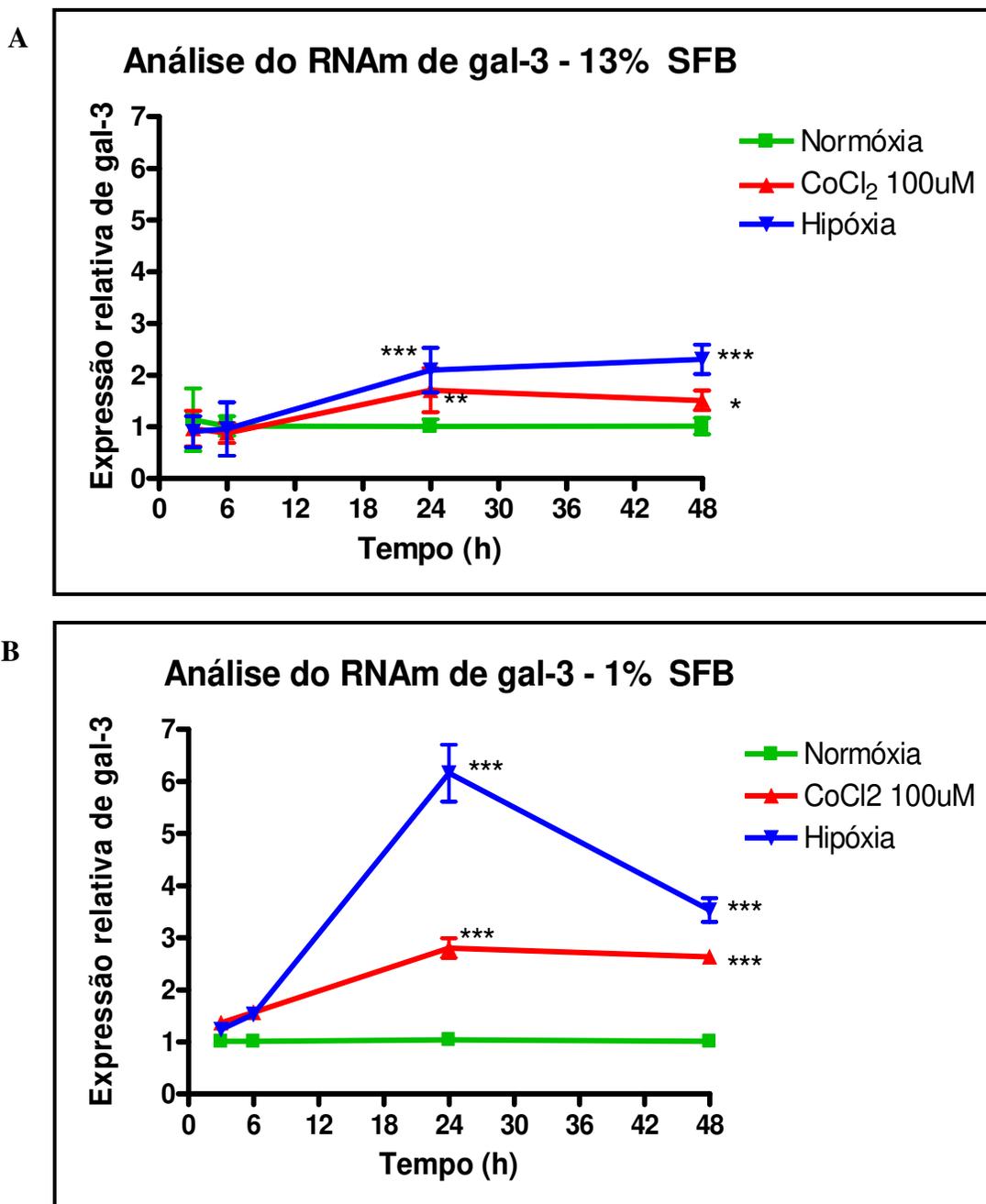


Figura 10 – Análise da produção relativa do RNAm de galectina-3 em meio completo com 13% (A) ou 1% (B) de SFB em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM ou hipóxia. Aumento estatisticamente significante após 24 horas de tratamento, permanecendo até 48 horas. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

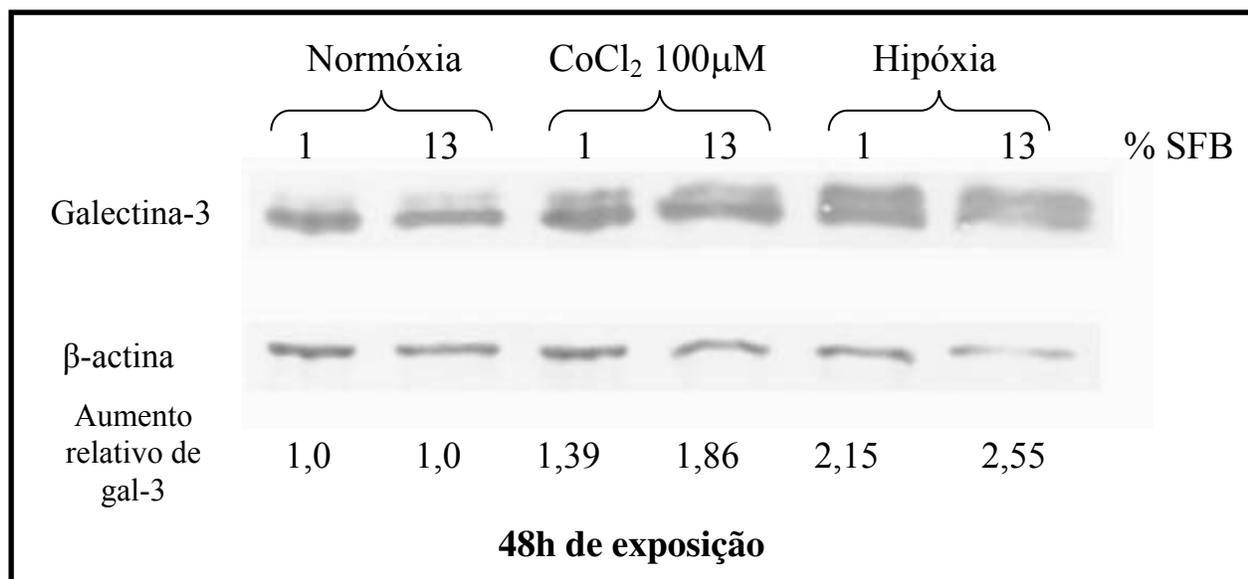


Figura 11 – *Western blot* para galectina-3 em extratos de células da linhagem de glioma NG97ht expostas o condições de normoxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipoxia por 48 horas e em meio completo com 13% ou privado com 1% de soro fetal bovino. Aumento da produção de galectina-3 em células expostas ao cloreto cobaltoso e o hipoxia em comparação com células em normoxia.

### 5.5.2 Cloreto cobaltoso 100 $\mu$ M induz aumento da migração celular *in vitro* em *transwell*

A exposição destas células da linhagem NG97ht a ambientes de normóxia, hipóxia mimética e hipóxia em câmara de hipóxia em câmaras de *transwell* sensibilizadas através de 10 $\mu$ g/mL de fibronectina não revelou alterações estatisticamente significantes nas taxas de migração celular após 3h de exposição (normóxia: média de 414 células/*transwell*; CoCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M: média de 480,33 células/*transwell*; hipóxia: 269,66 média de células/*transwell*) (Fig. 12).

Análises posteriores com 24h de exposição revelaram aumento das taxas de migração celular em células que sofreram exposição ao CoCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M ( $p < 0,001$ , média de 5736,66 células/*transwell*) em relação à células em ambiente de normóxia (média de 1709,66 células/*transwell*) e hipóxia (média de 825,66 células/*transwell*), indicando que o cloreto cobaltoso é capaz de induzir a migração celular nestas células da linhagem NG97ht.

Quando vistas em microscópio de luz invertido, constatamos regiões de grande celularidade em tratamentos com CoCl<sub>2</sub> 100 $\mu$ M quando comparadas com células em normóxia e em câmara de hipóxia (dados não mostrados) após 24h de exposição, porém não houve diferenças em relação à qualidade da migração, pois em todos os tratamentos as células demonstravam fenótipo de células espalhadas e aderidas, diferente das células que não foram sensibilizadas com fibronectina, as quais não migraram e demonstraram fenótipo arredondado e de pouca aderência (dados não mostrados).

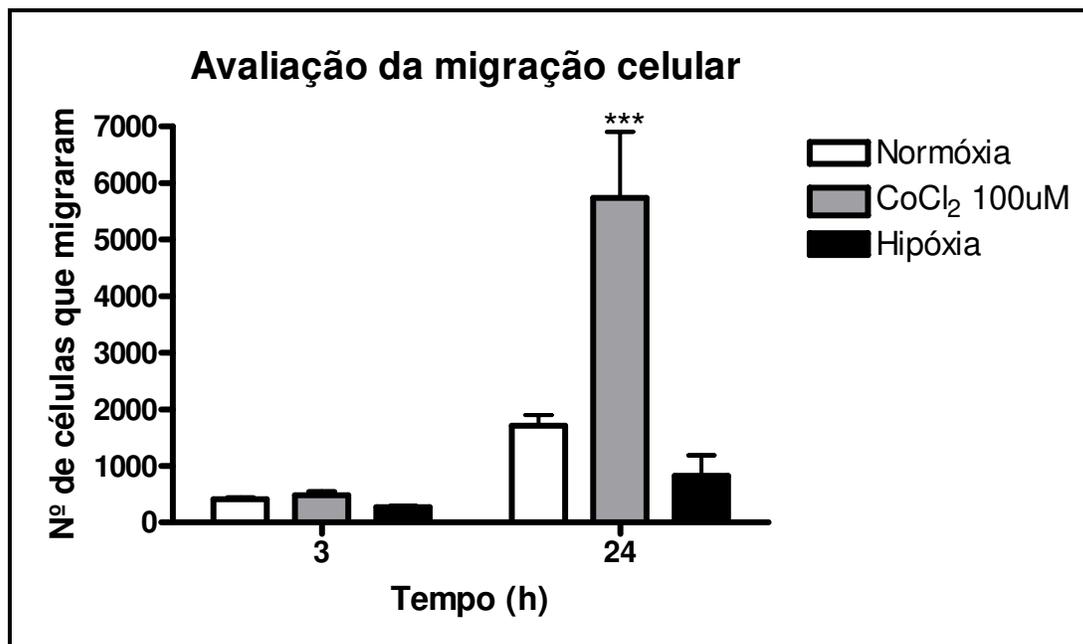


Figura 12 – Avaliação das taxas de migração celular em células da linhagem NG97ht por 3 e 24 horas expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100µM ou hipóxia e sensibilizadas através de 10ug/mL de fibronectina em placas de *transwell*. Não houve alteração das taxas de migração quando estas células foram analisadas após 3 horas de tratamento, porém após 24 horas, há diferenças estatísticas das taxas de migração em células tratadas com cloreto cobaltoso. \*\*\* p<0,001

- 5.5.3 Ensaio de morte celular em hipóxia mimética e em câmara de hipóxia

Os ensaios de morte celular em células da linhagem de glioma NG97ht expostas à hipóxia mimética através de  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou em câmara de hipóxia não revelaram diferenças significativas entre testes realizados com 24h de exposição (Tab. 2 e Fig. 13A) em meio completo com 13% de soro fetal bovino, porém o aumento da exposição para 48h demonstra maior sensibilidade para a morte em células expostas ao cloreto cobaltoso, tornando-se maior após 72h de exposição, demonstrando que este agente é capaz de induzir morte nesta concentração após longas exposições. Quanto à exposição destas células em câmara de hipóxia, não foram observadas alterações nas taxas de morte mesmo após 72h de tratamento em meio completo com 13% de soro fetal bovino.

Tabela 2 – Porcentagem de células hipodiplóides da linhagem NG97ht expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino por 24, 48 e 72 horas. \*\*\*  $p < 0,001$

<u>% células hipodiplóides</u>				
Tempo (h)	13% soro fetal bovino			
	Normóxia	$\text{CoCl}_2$ 100 $\mu\text{M}$	Hipóxia	
24	0,86	0,92	1,31	
48	1,32	3,07***	2,01	
72	1,35	5,51***	1,53	
	1% soro fetal bovino			
	24	2,24	3,85	2,69
	48	4,3	15,08***	30,32***
	72	9,93	46,04***	48,84***

Em relação aos tratamentos com privação de soro fetal bovino (1%), não foram observadas alterações nas taxas de morte celular após 24h de exposição (Fig. 13B e Tab. 2) aos três tratamentos, porém, após 48h de exposição, há aumento significativo das taxas de morte celular em cloreto cobaltoso e em câmara de hipóxia, continuando até 72h de exposição, apresentando grande número de fragmentos de células e corpos apoptóticos.

Estas condições de privação de soro fetal bovino foram acompanhadas de alterações fenotípicas nos três tratamentos realizados, como alongamento de células fusiformes e espraiamento de células dendríticas (dados não mostrados).

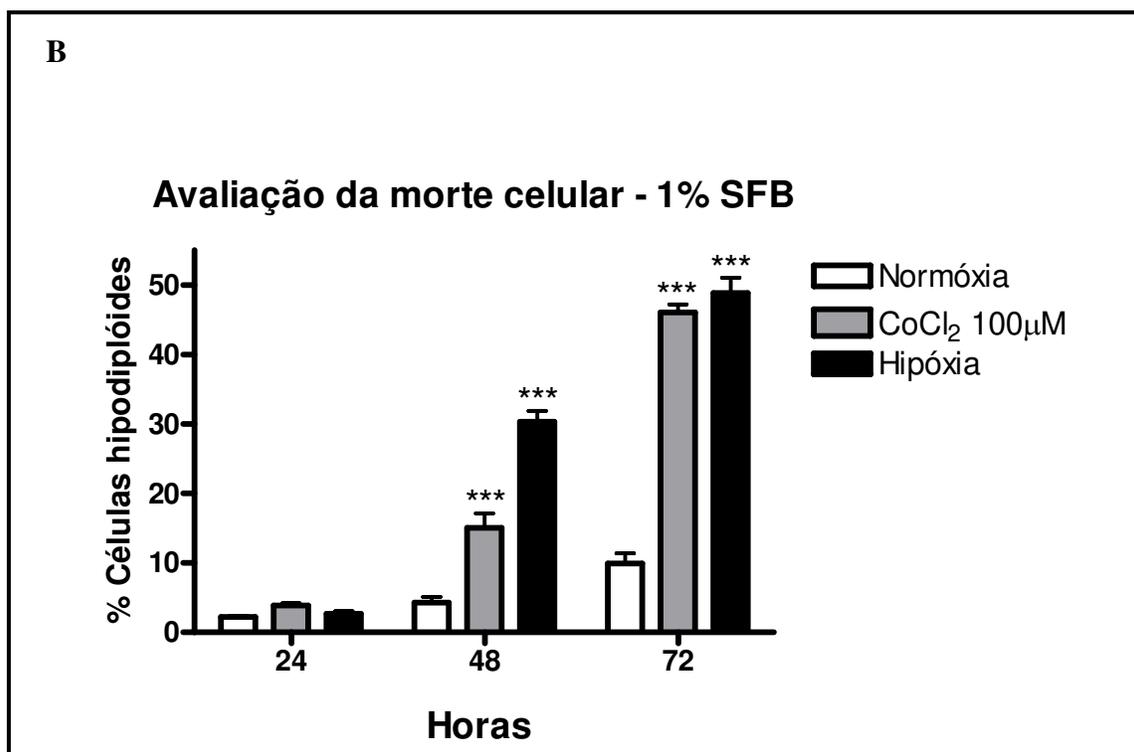
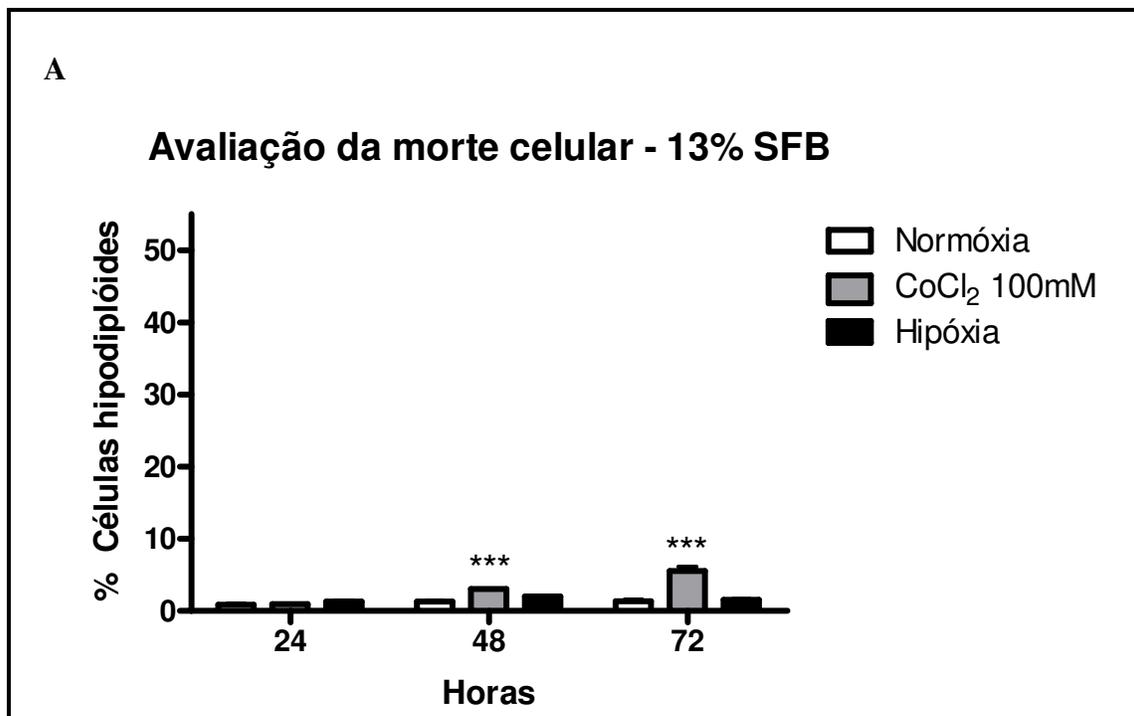


Figura 13

Figura 13 – Análise das taxas de morte celular pela incorporação de iodeto de propídeo em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em câmara de hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino. (A) Ensaio realizado com 24h de exposição não demonstraram alterações nas taxas de morte celular nestes três tratamentos, porém o aumento da exposição para 48h demonstra maior susceptibilidade para a morte em células expostas ao cloreto cobaltoso, tornando-se maior após 72h de exposição. (B) Ensaio realizado com 24h de exposição não demonstraram alterações nas taxas de morte celular nestes três tratamentos, porém, após 48h de exposição, há aumento significativo das taxas de morte celular em cloreto cobaltoso e em câmara de hipóxia, continuando até 72h de exposição. \*\*\*  $p < 0,001$ .

- 5.5.4 *A galectina-3 atua como fator de proteção contra a morte em privação de oxigênio e nutrientes*

A análise das taxas de morte de células da linhagem NG97ht após os tratamentos em normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM e hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino em presença de siRNA controle ou siRNA anti galectina-3 não demonstrou diferenças estatísticas entre os diversos tratamentos em normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM, e hipóxia em 13% de SFB com a utilização de siRNA controle e siRNA anti galectina-3 (Tab. 3 e Fig. 14A).

Tabela 3 – Porcentagem de células hipodiplóides da linhagem NG97ht expostas á normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM ou hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino e tratadas com siRNA controle ou siRNA anti gal-3 por 48h. \*\*\* p<0,001

<b><u>% células hipodiplóides</u></b>		
	<b>siRNA controle</b>	<b>siRNA anti gal-3</b>
	<b>13% soro fetal bovino</b>	
<b>Normóxia</b>	3,15	2,75
<b>CoCl<sub>2</sub> 100μM</b>	5,89	4,71
<b>Hipóxia</b>	2,74	2,81
	<b>1% soro fetal bovino</b>	
<b>Normóxia</b>	6,8	9,26
<b>CoCl<sub>2</sub> 100μM</b>	14,72	32,7***
<b>Hipóxia</b>	14,03	24,94***

Porém, quando estas células foram expostas a estas mesmas condições e em privação de soro fetal bovino (1%), houve aumento de morte em todas as situações, sendo esta mais alta quando estas células foram tratadas com siRNA anti galectina-3 do que com o siRNA controle

(Fig. 14B e Tab. 3). Estes dados indicam que a diminuição da expressão de galectina-3 nestas células da linhagem NG97ht em hipóxia e privação de nutrientes aumentam sua susceptibilidade à morte.

A análise da expressão protéica por *western blots* demonstra a diminuição da expressão de galectina-3 quando estas células da linhagem NG97ht foram expostas ao siRNA anti galectina-3 (Fig.15). Em normóxia, houve diminuição de 55% e 48% em alta concentração e baixa concentração de soro fetal bovino, respectivamente, e em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$ , diminuição de 24% e 47%, respectivamente, e em hipóxia, diminuição de 56% e 46%, respectivamente.

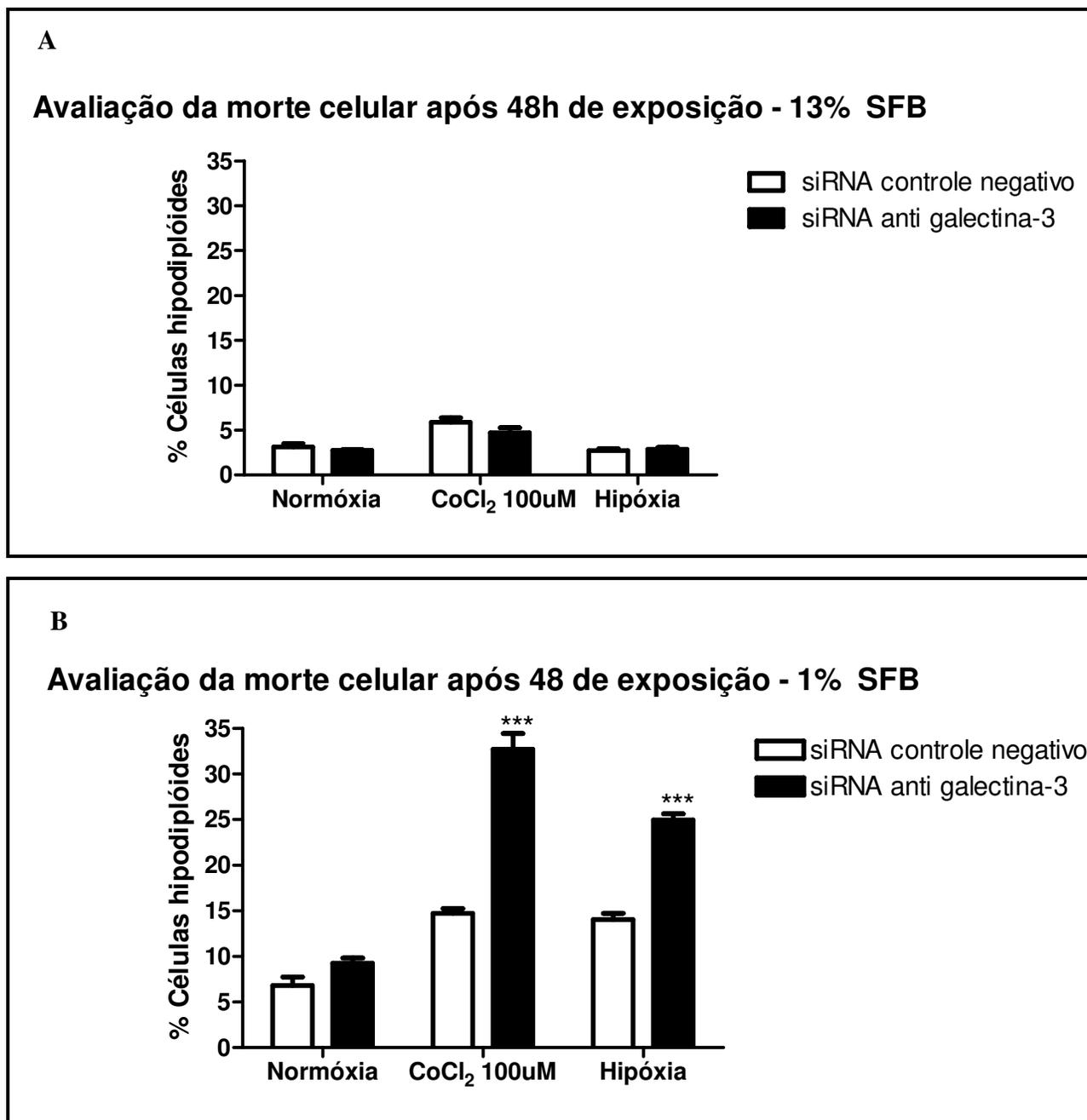


Figura 14 – Avaliação da morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM ou hipóxia, em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino e tratadas com siRNA anti galectina-3 ou siRNA controle. (A) Não há alterações nas taxas de morte celular nos tratamentos com siRNA anti galectina-3 ou siRNA controle em células com meio completo com 13% de soro fetal bovino. (B) Aumento das

taxas de morte celular nos tratamentos com siRNA anti galectina-3 em comparação com células tratadas com siRNA controle em células expostas ao  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou em câmara de hipóxia em meio privado (1%) de soro fetal bovino. \*\*\*  $p < 0,001$ .

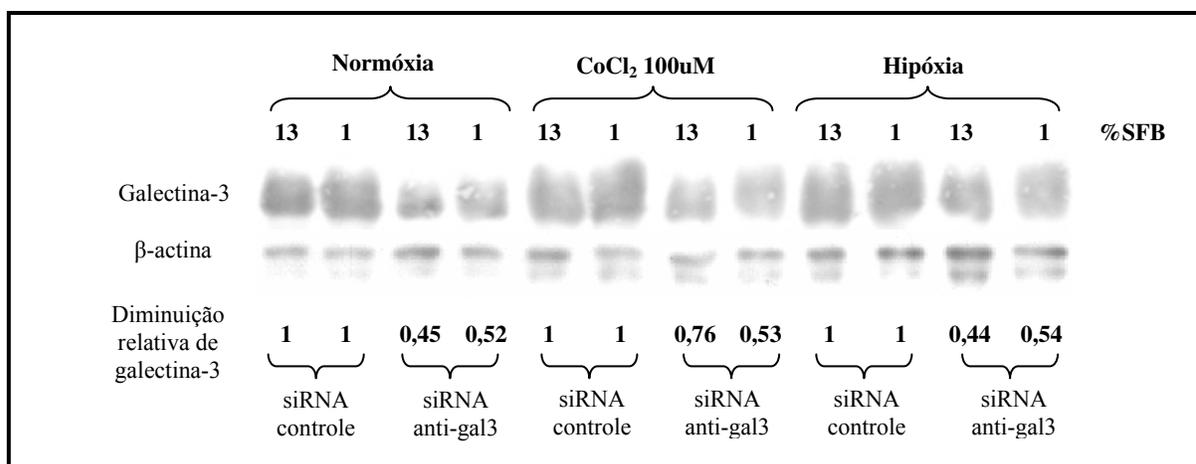


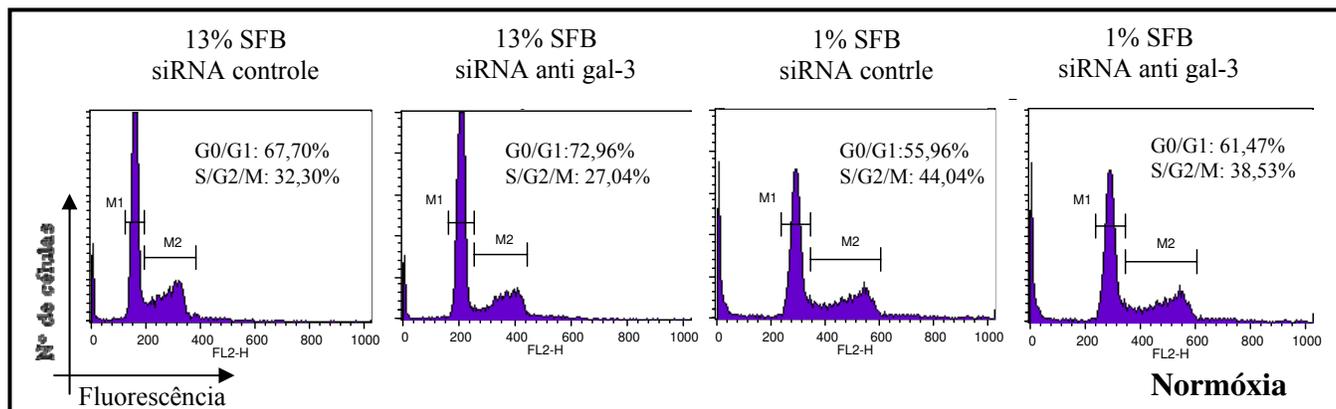
Figura 15 – *Western blot* para galectina-3 e  $\beta$ -actina em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipóxia, em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino e expostas a siRNA controle ou siRNA anti galectina-3. Diminuição da expressão de galectina-3 em todos os tratamentos com siRNA anti galectina-3, demonstrando o *knockdown* desta proteína. Controle de adição de massa através de  $\beta$ -actina.

- *5.5.5 Redução da expressão de galectina-3 induz aumento de células em fase G0/G1 e diminuição de células em fase S/G2/M*

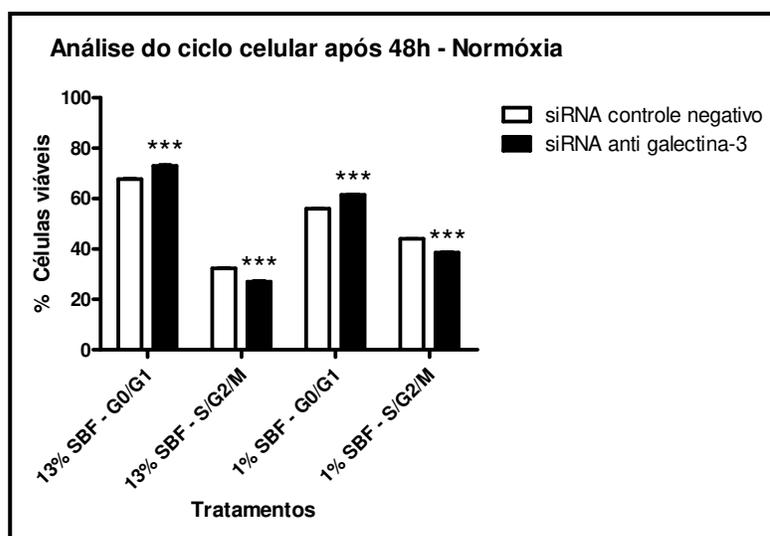
Além da análise das taxas de morte celular após os tratamentos em normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino em presença de siRNA controle ou siRNA anti galectina-3, foram realizadas análises de ciclo celular avaliando possíveis alterações devido a redução da expressão de galectina-3 em células da linhagem NG97ht..

Houve aumento de células em fase G0/G1 e diminuição de células em fase S/G2/M em todos os tratamentos com siRNA anti gal-3, tanto em meio completo quanto privado de soro fetal bovino (Fig. 16).

A



B



C

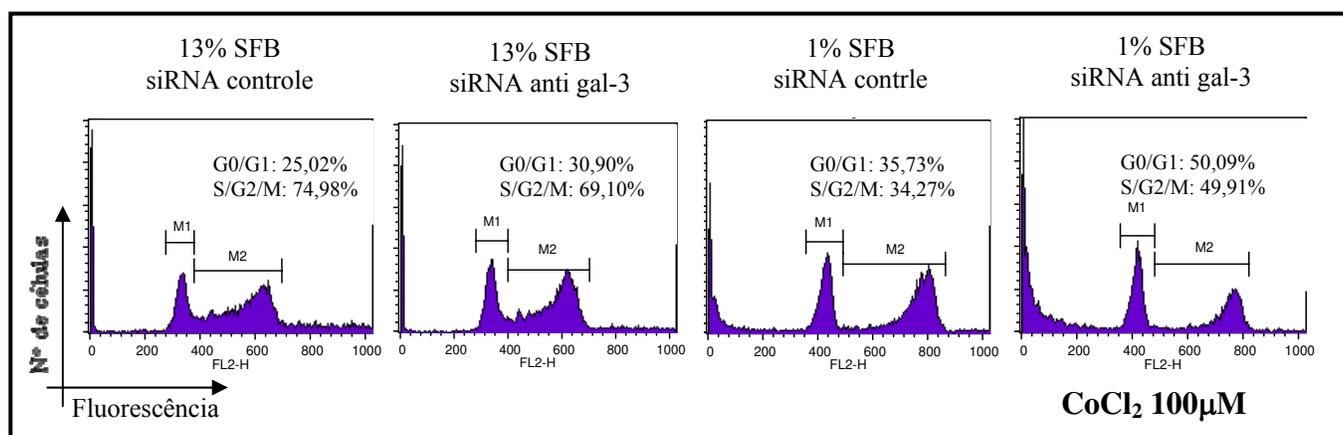
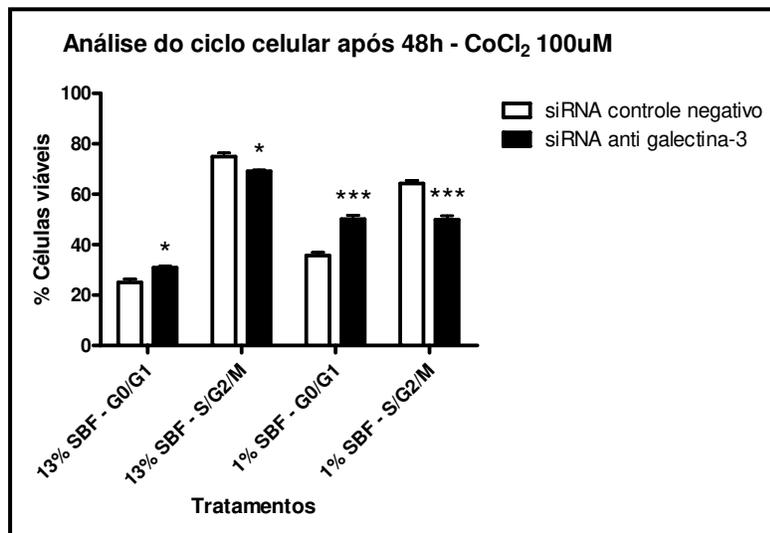
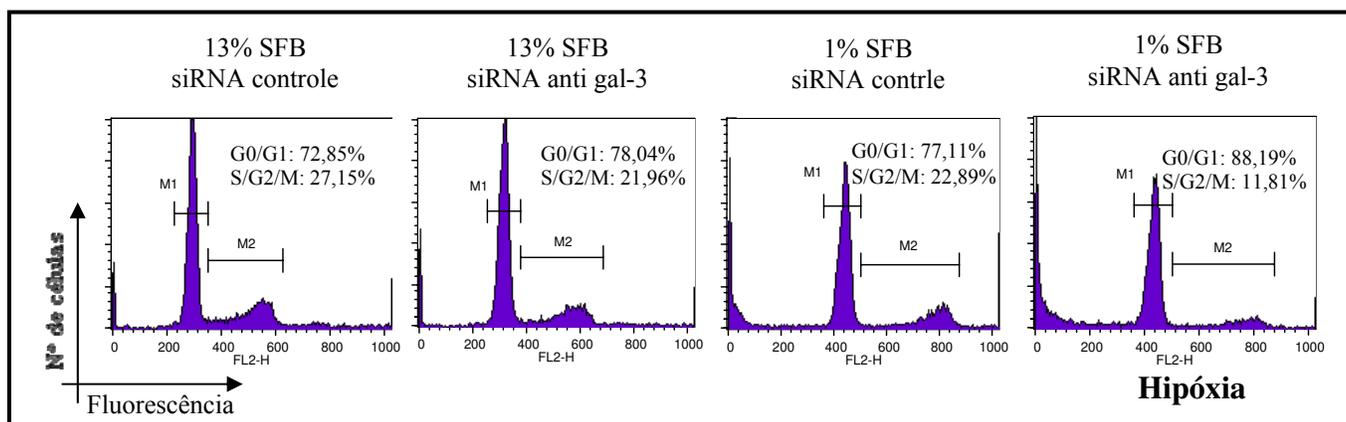


Figura 16

D



E



F

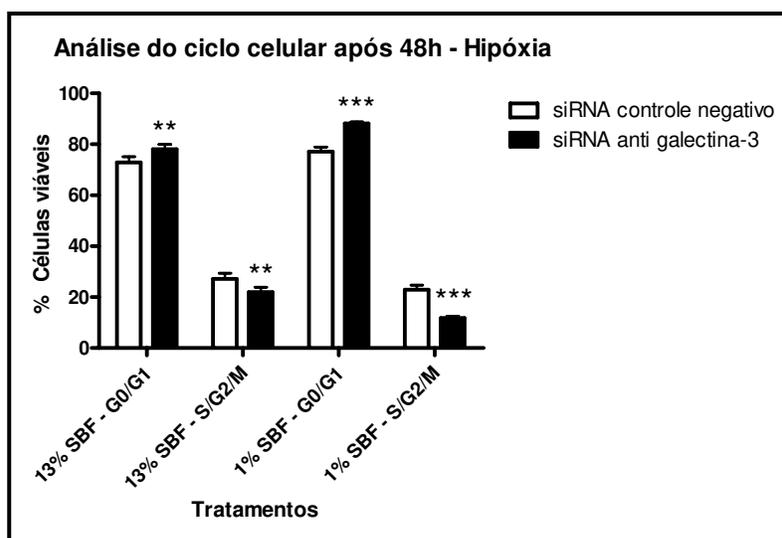


Figura 16

Figura 16 – Demonstração do aumento de células em fase G0/G1 e diminuição em S/G2/M em células da linhagem NG97ht tratadas com siRNA anti galectina-3 por 48 horas e expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipóxia em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino em comparação com células tratadas com siRNA controle. **(A, C, E)** Histogramas demonstrando as fases de ciclo celular através da incorporação de iodeto de propídeo. **(B, D, F)** Aumento de células em G0/G1 tratadas com siRNA anti gal-3 em comparação com células tratadas com siRNA controle, tanto em 13% quanto 1% de soro fetal bovino. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

- 5.5.6 Diminuição do ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 a resíduos de galactose e aumento da exposição de galactose- $\beta$ (1-4)-N-acetilglucosamina em privação de nutrientes

Os experimentos realizados em normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em câmara de hipóxia com variação da concentração de soro fetal bovino (13%, 1% e 0%) revelaram alterações nos padrões de exposição de ácido siálico e galactose- $\beta$ (1-4)-N-acetilglucosamina *in vitro* nesta linhagem de glioma NG97ht.

A figura 17A demonstra que há diminuição da adição de resíduos de ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 em normóxia, cloreto cobaltoso e em hipóxia quando há diminuição da concentração de soro fetal bovino (1% e 0%). Estes resíduos de ácido siálico localizam-se em regiões terminais de cadeias de carboidratos, ligando-se a resíduos de galactose.

A diminuição de resíduos de ácido siálico é acompanhada também pelo aumento da exposição de resíduos de galactose- $\beta$ (1-4)-N-acetilglucosamina (Fig. 17B) com massa molecular de cerca de 110kDa (seta).

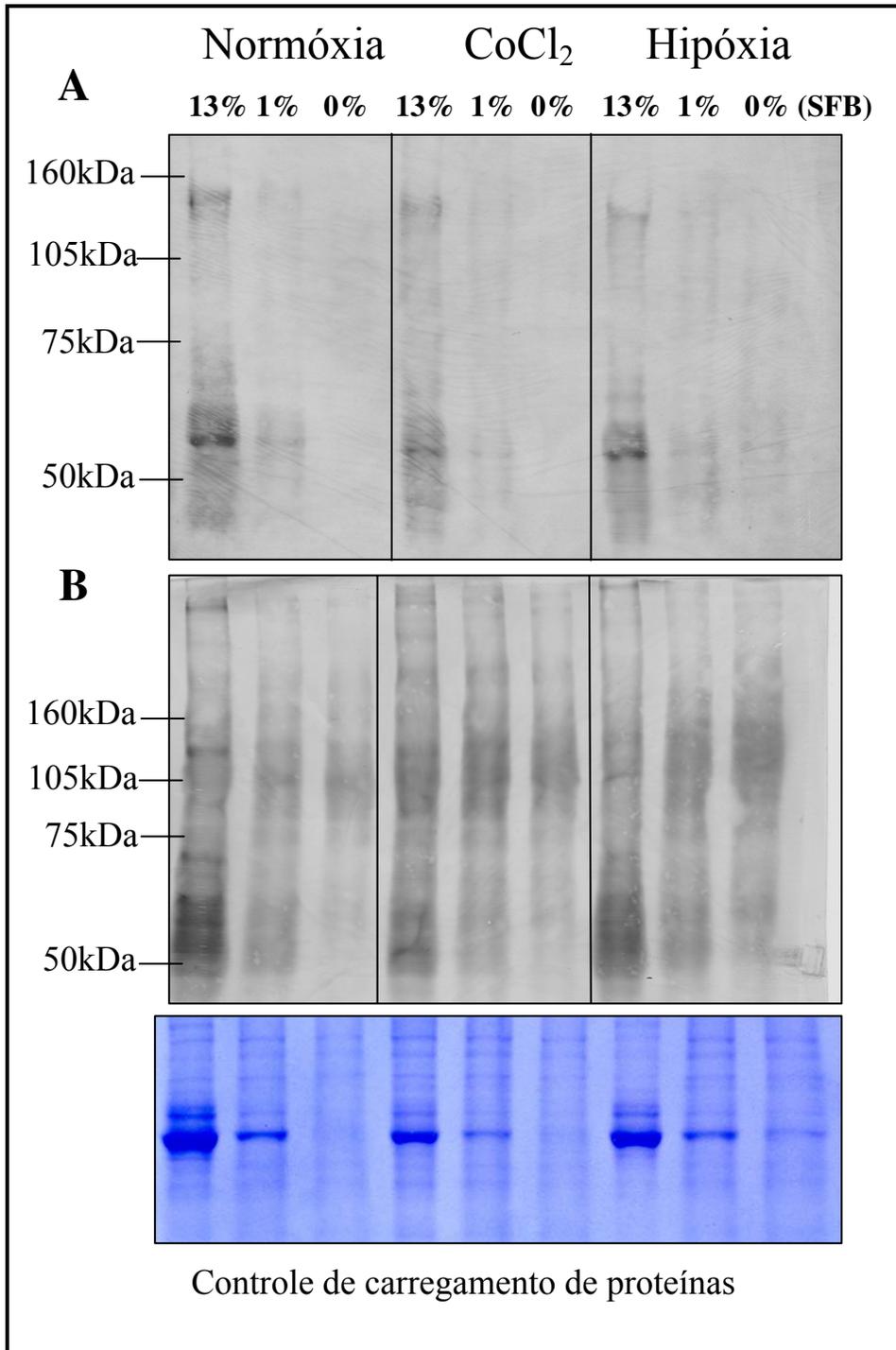


Figura 17

Figura 17 – Análise da produção protéica por *western blot* de extratos de células da linhagem de glioma NG97ht expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em câmara de hipóxia e diferentes concentrações de meio enriquecido com soro fetal bovino (13, 1 e 0%). (A) Diminuição da expressão de ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 a resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina em células em menor concentração de soro fetal bovino (1 e 0%), tanto em normóxia, cloreto cobaltoso e hipóxia. (B) Aumento da exposição de resíduos de galactose- $\beta$ (1-4)-N-acetilglucosamina de alto peso molecular (seta preta, faixa de 110kDa) em células em menor concentração de soro fetal bovino (1 e 0%), tanto em normóxia, cloreto cobaltoso e hipóxia. (C) Controle da adição de proteínas demonstrando que apesar da menor produção protéica em 1% e 0% de soro fetal bovino, há aumento da exposição de resíduos de carboidratos.

- 5.5.7 *A galectina-3 extracelular não atua na indução da morte*

Devido à correlação de diminuição da adição de resíduos de ácido siálico e de privação de soro fetal bovino, testes foram realizados a fim de se avaliar o envolvimento da galectina-3 extracelular na indução da morte.

Não houve diferenças estatisticamente significantes nas taxas de morte celular em tratamentos com células da linhagem NG97ht em normóxia em privação de soro fetal bovino (1%) e na presença de lactose 10mM, 20mM, ligante de galectina-3 de baixa afinidade, e sacarose 20mM, utilizado como controle na adição de açúcares (Tab. 5 e Fig. 18).

Tabela 4 – Porcentagem de células hipodiplóides da linhagem NG97ht expostas à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  ou hipóxia em privação (1%) de soro fetal bovino e tratadas com lactose 10 e 20mM e sacarose 20mM. \*\*  $p < 0,01$

<u>% células hipodiplóides</u>				
	<b>Controle</b>	<b>Lactose 10mM</b>	<b>Lactose 20mM</b>	<b>Sacarose 20mM</b>
<b>Normóxia</b>	0,91	2,32	1,08	0,93
<b><math>\text{CoCl}_2</math> 100<math>\mu\text{M}</math></b>	8,5	7,9	9,67	11,95**
<b>Hipóxia</b>	8,22	8,37	9,68	11,57**

Houve diminuição estatisticamente relevante da morte celular nos tratamentos em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e hipóxia com adição de sacarose 20mM ( $p < 0,01$ ) em comparação com células que não foram expostas a carboidratos.

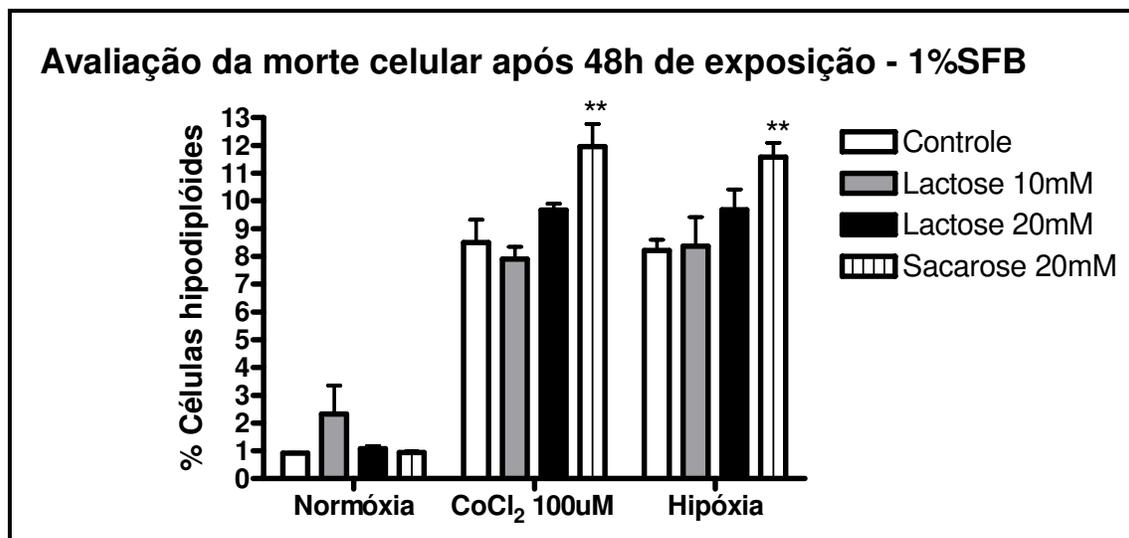


Figura 18 – Avaliação da morte celular pela incorporação de iodeto de propídeo em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl<sub>2</sub> 100μM e em câmara de hipóxia em meio privado de soro fetal bovino (1%) e tratadas com lactose 10mM, 20mM e sacarose 20mM. Células em normóxia não apresentaram diferenças estatísticas, porém em cloreto cobaltoso e hipóxia, houve aumento significativo da morte em células tratadas com sacarose 20mM em comparação com o controle. \*\* p<0,01.

# **DISCUSSÃO**

---

## 6. Discussão

O microambiente tumoral é altamente complexo, onde há a participação de uma intrincada rede de moléculas que participam de diversos processos que levam a evasão da morte celular, auto-suficiência de sinais de crescimento, falta de sensibilidade a sinais anti-proliferativos, invasão tecidual e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese (HANAHAN *et al.* 2000). Entre estas moléculas está a galectina-3, que parece modular muitas destas características tumorais, demonstrando um papel chave no desenvolvimento de neoplasias.

Apesar de ser uma molécula bem estudada, seus mecanismos de ação e de expressão ainda não estão totalmente elucidados, de modo que o objetivo deste projeto visou entender melhor a galectina-3 utilizando como ferramenta uma linhagem de glioma híbrido, NG97ht, tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 6.1 A galectina-3 é produzida por diversas passagens na linhagem NG97ht e possui distribuição citoplasmática e nuclear

A avaliação da produção de galectina-3 em células da linhagem NG97ht *in vitro* demonstrou que estas células não somente expressam esta proteína *in vivo* em áreas de pseudopaliçada, mas também *in vitro* ao longo de suas passagens.

*In vitro*, é vista a expressão de galectina-3 em diversas linhagens, como a linhagem de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, câncer de cólon HCT-116 e HT-29, e também em linhagens de glioma, como a T98G (SATELLI *et al.* 2008; SATISHA *et al.* 2007), sendo pouco detectável em células normais, indicando uma possível indicação da galectina-3 como biomarcador específico de câncer.

Porém, é visto que em outros tipos neoplásicos a expressão de galectina-3 é variável. Dunic e colaboradores (2008) citam um grande número de publicações descrevendo a expressão

---

de galectina-3 em neoplasias, porém estes dados são muitas vezes inconsistentes, impossibilitando uma conclusão sobre o papel da galectina-3 no surgimento de tumores devido aos diversos métodos de avaliação e a heterogeneidade entre os diferentes tipos de câncer. Entretanto, é notável que em comum a estas neoplasias está a proliferação descontrolada, distúrbios de adesão e resistência à apoptose, e a galectina-3 pode estar envolvida com estes diversos fatores.

Quanto aos dados de imunofluorescência demonstrando sua expressão predominantemente citoplasmática, também não é possível descrever sua função somente a partir de sua localização celular, embora haja indícios de maiores atividades pró-tumorais pela galectina-3 citoplasmática. Em relação a marcação para galectina-3 em focos de projeções celulares de células dendríticas gigantes, é possível que haja relação com a adesão celular. Machado e colaboradores (2008) descrevem a positividade para integrinas em extensões citoplasmáticas do tipo *lamelipodia* e *filopodia*. Deste modo, há a possibilidade de interações com moléculas de galectina-3 nestes pontos, levando à modulação da adesão destas células ao substrato.

## 6.2 A produção de galectina-3 através do genoma murino

O fenômeno da fusão celular é um processo que pode ocorrer de forma artificial, como na produção de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais (JONES *et al.* 2009), ou de forma natural, como o caso desta linhagem de glioma híbrido, NG97ht. Em decorrência deste processo, há a exclusão aleatória de material genético de ambas as células originalmente envolvidas, havendo sobrevivência da célula mais apta, e levando conseqüentemente à expressão de diferentes genes (WANG *et al.* 1979).

Os primeiros testes envolvendo ensaios de análise protéica demonstraram alterações no padrão de peso molecular da galectina-3 produzida por esta linhagem quando comparada com linhagens murinas (Melan-a) e humanas (MDA-MB-231) que expressam esta proteína (dados não mostrados).

Foi demonstrado por Davidson e colaboradores (2002) que a massa molecular aparente da galectina-3 produzida por células da linhagem de fibroblastos 3T3 murina é maior do que de células humanas de carcinoma de colo uterino, HeLa, e fibroblastos LG-1. Desta forma, estes dados apontavam para produção de galectina-3 a partir do genoma murino em células da linhagem NG97ht, porém tais alterações de massa podem ser devido a modificações pós-traducionais, como a adição de grupos fosfato, por exemplo.

Somente a partir de análises da expressão do RNAm destas células foi possível demonstrar a expressão de galectina-3 a partir do genoma murino nas células da linhagem NG97ht.

Este fato demonstra que apesar de ter se tornado um híbrido, há a caracterização desta linhagem como glioblastoma multiforme através de suas análises histológicas, demonstrado por suas altas taxas de mitose e presença de áreas de pseudopaliçada, fatores derivados de seu fenótipo humano. Entretanto, a presença de galectina-3, expressa em padrão habitual nas áreas de pseudopaliçada é proveniente do genoma murino, caracterizando a cópia fenotípica (fenocópia), onde há a imitação do padrão de produção de galectina-3 do tumor humano original.

### 6.3 Os ligantes de galectina-3 *in vitro* apresentam-se no citoplasma/membrana e concentrados no Complexo de Golgi e *in vivo* em áreas de pseudopaliçada

Os resultados sobre a expressão de ligantes de galectina-3 na linhagem NG97ht demonstraram padrão de expressão predominantemente citoplasmático e na membrana celular,

---

com presença de *hot spots* perinucleares que evidenciam o Complexo de Golgi destas células. Estes dados demonstram o padrão de produção de ligantes nestas células, onde há transcrição gênica e tradução destes compostos que são sinalizados para entrada no retículo endoplasmático rugoso, seguido de alterações pós traducionais no Complexo de Golgi, como adições de resíduos de galactose, por exemplo (VARKI *et al.* 2008). Além disso, estes resultados acompanham dados da literatura, onde não há descrição de ligantes de galectina-3 com resíduos de carboidratos dentro do núcleo das células.

Outro fato destacado por estes resultados é a diferença nas vias de secreção de galectina-3 e seus ligantes. É descrito que apesar da galectina-3 estar presente no núcleo e no citoplasma, ele não possui um peptídeo sinal para inserção no retículo endoplasmático (COOPER & BARONDES, 1999), de forma que sua secreção participa de uma via alternativa pouco conhecida.

Estudos recentes demonstram que proteínas já conhecidas, porém com habilidades não relacionadas a mecanismos de secreção, estão relacionadas com esta via alternativa, como a caspase-1, além de outras moléculas, como a Proteína Periférica do Golgi (GRASP) (NICKEL *et al.* 2009). Este mecanismo alternativo pode ter evoluído de forma a compartimentalizar a galectina-3 e seus ligantes, evitando seu encontro prematuro dentro da célula, o que poderia causar agregação e mau enovelamento de proteínas, além de induzir sinais autócrinos pela ligação com receptores.

Além da análise de ligantes *in vitro*, os ensaios realizados para detecção de ligantes de galectina-3 em cortes histológicos de tumores provenientes da inoculação das células da linhagem NG97ht em camundongos atímicos demonstraram ligantes de galectina-3 principalmente em grupos celulares constituintes da camada de pseudopaliçada, tanto na matriz extracelular quanto no citoplasma destas células, provavelmente tanto tumorais quanto de células

---

infiltradas, além de células endoteliais, porém as conseqüências desta expressão ainda não estão bem definidas e mais estudos são necessários para o entendimento de suas funções.

#### 6.4 O controle da expressão de galectina-3 nos tumores derivados da linhagem NG97ht não é realizado pela sua metilação do promotor

Os dados referentes à metilação do promotor de galectina-3 *in vitro* e em áreas de pseudopaliçada *in vivo*, positivas para galectina-3, e em áreas tumorais adjacentes que não expressam esta proteína, revelaram que o controle de expressão não é realizado pela metilação de seu promotor.

Dados da literatura são escassos sobre a modulação da produção de galectina-3, sendo os estudos sobre a metilação de seu promotor os mais estudados (RUEBEL *et al.* 2005, AHMED *et al.* 2007, TEIXEIRA *et al.* 2006), porém estes resultados não foram confirmados por estes experimentos.

Devido à complexidade de ações da galectina-3 e seus possíveis sítios de ligação com fatores de transcrição (KADROFSKE *et al.* 1998), mais estudos são necessários para o completo entendimento dos mecanismos de regulação desta proteína, além de suas possíveis funções nos diferentes tipos tumorais.

O padrão de expressão de galectina-3 nesta linhagem NG97ht e em seus tumores derivados de sua inoculação em camundongos *nude* é um fato intrigante. *In vitro*, a galectina-3 é expressa largamente em todas as células, embora suas funções não sejam bem definidas, porém, *in vivo* há regulação negativa de sua expressão. Estes dados podem indicar que (i) quando estas células são expostas ao microambiente *in vivo*, há perda de sinais indutores da expressão de galectina-3, levando à diminuição da expressão desta proteína, ou (ii) que a galectina-3 possa ter

ação deletéria para estas células no ambiente *in vivo*, e para o crescimento tumoral, esta proteína tem que ser regulada negativamente.

Em ambientes limites, como áreas necróticas, é possível que a hipóxia/depleção de nutrientes levem à expressão *de novo* de galectina-3. Caso a hipótese de que a galectina-3 *in vivo* tenha ações deletérias, nestes ambientes necróticos talvez haja uma compensação de propriedades positivas sobre as propriedades negativas da galectina-3.

#### 6.5 Ensaio em hipóxia mimética em $\text{CoCl}_2$ 100 $\mu\text{M}$ e em câmara de hipóxia

- *6.5.1 Aumento da expressão de galectina-3 em  $\text{CoCl}_2$  e em câmara de hipóxia*

Os dados apresentados demonstram o aumento da produção do RNAm de galectina-3 em células da linhagem de glioma NG97ht frente à hipóxia mimética e em câmara de hipóxia em meio completo com 13% de SFB após 24 horas de exposição a estes dois ambientes. O aumento da transcrição de galectina-3 frente à hipóxia não é um fato inédito na literatura, onde são descritos dois estudos envolvendo genes diferencialmente expressos em normóxia e hipóxia.

Greijer e colaboradores (2005) descrevem uma compilação de genes afetados pela indução da hipóxia e genes afetados, direta ou indiretamente, por HIF-1 $\alpha$  em uma linhagem de fibroblastos 3T3 expostos a 1% de oxigênio. É demonstrado que a maior parte dos genes regulados positivamente, 89%, é influenciada por HIF, quando comparado com células *knockout* para HIF-1 $\alpha$ , entre eles, galectina-3, e foi visto que o RNAm desta proteína tem um aumento de 2,3 vezes em relação à normóxia.

Em outros estudos, Olbryt e colaboradores (2006) descrevem também a ação da hipóxia, porém em células de melanoma murino B16(F10), além de comparar as ações da hipóxia, 1% de oxigênio, com a hipóxia mimética em cloreto cobaltoso. Foram demonstrados diversos genes

regulados positivamente e negativamente nestes dois tratamentos, incluindo no primeiro grupo o gene da galectina-3, com um aumento de 19,41 vezes em hipóxia em comparação à normóxia.

Apesar de estes estudos criarem condições de hipóxia *in vitro*, não houve mimetização completa do microambiente tumoral, haja vista que as condições de oferta de nutrientes continuaram altas, com exposição de 15% a 10% de SFB para Greijer (2005) e Olbryt (2006) e colaboradores, respectivamente. Deste modo, não há mimetização do microambiente tumoral necrótico, onde as células são expostas a baixas concentrações de oxigênio e nutrientes.

Os resultados apresentados neste trabalho apontam que a privação de soro fetal bovino pode vir a atuar como um fator importante na indução da galectina-3. É visto que a privação de nutrientes pode ser um indutor de estresse celular e metabólico (CHEN *et al.* 2009), e como a galectina-3 é uma proteína relacionada à proteção contra estresse celular, ele pode ter peso importante na indução de galectina-3.

Estes ensaios realizados com a linhagem NG97ht demonstram que em hipóxia e grande disposição de nutrientes, há aumento tardio de galectina-3 ao fim de 24 horas de exposição, porém com menor oferta de nutrientes, aparentemente a indução de galectina-3 é mais precoce, demonstrando aumentos a partir de 3 e 6 horas de exposição, ainda que não sejam estatisticamente significativos.

- *6.5.2 Ensaios de migração celular em câmara de transwell demonstram aumento de migração frente à exposição ao cloreto cobaltoso*

As taxas de migração celular demonstraram que quando estas células são sensibilizadas por fibronectina em câmaras de *transwell* e tratadas em hipóxia mimética em  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$ , há tendência de aumento das taxas de migração após 3h de exposição, porém sem diferenças

estatísticas. Mas após 24h de exposição ao cloreto cobaltoso, há diferenças significativas tanto quando comparadas com células em normóxia ou em câmara de hipóxia, além de demonstrar uma tendência de diminuição da migração de células em hipóxia nos experimentos realizados.

A partir da análise destes ensaios de migração e produção de RNA mensageiro de galectina-3, é possível correlacionar uma maior produção de galectina-3 com o aumento dos níveis de migração celular em *transwell* em células tratadas por  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$ , porém este aumento da produção não é acompanhado por maiores taxas de migração em células em câmara de hipóxia.

É possível que apesar do tratamento com  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  não induzir morte, ele pode causar níveis de estresse celulares capazes de induzir a migração. Em relação ao tratamento em câmara de hipóxia, é possível que não ocorra estresse celular devido à falta de oxigênio, visto que não há diferenças nas taxas de morte celular em hipóxia após 24h de exposição em condições de privação de soro fetal bovino. Estes dados demonstram que estas células estão bem adaptadas e esta condição acaba não se tornando um estímulo migratório, ao menos no tempo analisado de 24 horas.

A qualidade da estimulação proveniente da sensibilização por fibronectina também pode ser um fator atenuante para a migração em câmara de hipóxia. É visto que o microambiente tumoral em que são desenvolvidas as células da camada de pseudopaliçada é muito mais complexo. A hipóxia e a fibronectina são apenas dois elementos de uma variada gama existente neste ambiente e outros estudos envolvendo o ambiente de hipóxia, concomitantemente com indutores de estresse e morte celular, podem demonstrar diferentes taxas de migração.

De modo geral, dados da literatura indicam maiores taxas de migração celular quando há exposição à hipóxia, além da importância do HIF na modulação destas características (BRAT *et*

al. 2004; FUJIWARA *et al.* 2007), porém nossos dados não puderam corroborar com estes relatos.

- 6.5.3 *Células da linhagem NG97ht são resistentes à morte frente à hipóxia, porém apresentam altas taxas de morte celular em hipóxia e privação de nutrientes*

Os dados referentes às taxas de morte celular em normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em hipóxia em meio completo com 13% de SFB por até 72 horas demonstram que estas células da linhagem NG97ht são resistentes à morte induzida pela privação de oxigênio, provavelmente devido à altas taxas de glicólise anaeróbia.

Estudos da década de 1920 realizados por Otto Warburg relataram que tumores, mesmo em normóxia, possuem altas taxas de glicólise (WARBURG 1956), fenômeno descrito até hoje em diferentes tipos tumorais, sendo denominado de Efeito Warburg ou simplesmente de glicólise aeróbia. Neste tipo de comportamento celular, tumores produzem energia a partir da quebra da glicose, transformando-a em piruvato e posteriormente, através da enzima lactato desidrogenase, em lactato, produzindo 2 moléculas de ATP. Porém este processo é muito menos eficiente do que a fosforilação oxidativa, a qual, no fim de sua reação, produz 36 moléculas de ATP (ALBERTS *et al.* 2002).

Este fenômeno é amplamente estudado, e diversas teorias tentam explicar porque uma célula tumoral ativa vias metabólicas ineficientes para produção de energia, enquanto poderia produzir uma quantidade maior se utilizasse o oxigênio disponível em seu microambiente.

Gatenby & Gillies (2004) descrevem este fenômeno como uma adaptação a variações da disponibilidade de oxigênio dentro do tumor, que poderiam levar à estabilização de HIF-1 $\alpha$  e um estado permanente de glicólise aeróbia. Este estado induziria um microambiente ácido, levando a

adaptações das células tumorais para um fenótipo resistente à acidose, favorecendo o crescimento celular. Além disso, a criação de um ambiente ácido no estroma induziria morte de células normais, possibilitando a migração e invasão destas células neoplásicas.

Quanto aos ensaios de morte celular com privação de soro fetal bovino em normóxia, cloreto cobaltoso e hipóxia por 24, 48 e 72 horas, demonstrou-se incremento das taxas de morte celular em comparação com a exposição à normóxia após 48 e 72h, tanto em cloreto cobaltoso e hipóxia. Steinbach e colaboradores (2003) descrevem estudos realizados com linhagens de glioma LN-229, U87MG e LN-18, analisando vias de indução de morte e alterações fenotípicas frente à exposição à hipóxia concomitante à privação de glicose. Seus estudos demonstraram que a hipóxia *per si* talvez não seja capaz de induzir morte celular, porém a privação de glicose seja um fator chave na indução da morte celular e os dados obtidos por nossos experimentos corroboram com esta teoria.

Estes mesmos autores sugerem o desacoplamento da via intrínseca de indução de morte celular, onde a liberação de citocromo-C da mitocôndria não induz a clivagem das caspases devido à depleção de ATP, necessária para funcionamento do complexo apoptossomo. Deste modo, a privação de oxigênio e nutrientes não leva à apoptose, mas à morte por necrose pela desregulação mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (REED, 1997).

- *6.5.4 Galectina-3 protege as células da linhagem NG97ht da morte frente à privação de oxigênio e nutrientes in vitro, indicando sua possível função no microambiente de pseudopaliçada*

A partir dos resultados revelados pelos testes envolvendo a exposição à normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e hipóxia em meio completo e privado de soro fetal bovino frente ao tratamento com

---

siRNA controle e anti-galectina-3, foi possível demonstrar que a galectina-3 protege estas células da linhagem NG97ht em hipóxia e privação de nutrientes.

Estes dados demonstram um dos principais papéis da galectina-3, atuando como fator antiapoptótico. Porém os mecanismos pelo qual a galectina-3 protege as células da linhagem NG97ht da morte ainda não estão esclarecidos.

Existem quatro possíveis vias de proteção contra a morte a partir dos possíveis efeitos da hipóxia e privação de nutrientes nestas células, sendo três delas relacionadas as espécies reativas de oxigênio.

- (i) A galectina-3 atuaria como fator de homeostasia da membrana mitocondrial, mediada por sinexina, impedindo a saída de citocromo-C para o citoplasma (YU *et al.* 2002; FUKUMORI *et al.* 2006), juntamente com outras moléculas como o Bcl-2 (AKAHANI *et al.* 1997), evitando a ativação da via das caspases e morte celular.
- (ii) A galectina-3 também poderia atuar na proteção contra espécies reativas de oxigênio através da ativação de genes como a glutathione-S-transferase (MAZUREK *et al.* 2005), cofator importante da decomposição enzimática de peroxidases intracelulares pela enzima glutathione peroxidase (SCOTT *et al.* 1980).
- (iii) A galectina-3 poderia ligar-se à F(1)F(0)-ATP sintase mitocondrial (KIM *et al.* 2008), diminuindo a produção de ATP nestas células e conseqüentemente a levando à menor produção de espécies reativas de oxigênio.
- (iv) Por último, a galectina-3 poderia agir como alvo direto de espécies reativas de oxigênio, tamponando o ambiente intracelular, servindo como agente antioxidante.

Outros resultados extraídos deste experimento também indicam, apesar de não ter sido uma diferença estatisticamente significativa, que a galectina-3 pode proteger as células da morte em normóxia em privação de soro fetal bovino, onde há desregulação mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

Foi visto também que apesar de haver aumento de galectina-3 em hipóxia em meio completo com soro fetal bovino, ele talvez não atue na proteção contra a morte celular, visto que as taxas de morte não são alteradas em comparação com a normóxia. No ambiente tumoral, as vias de recebimento de oxigênio e nutrientes são realizadas pelos vasos sangüíneos. É possível que *in vitro* a célula identifique a hipóxia como depleção destes dois fatores, uma vez que a falta de oxigênio implica em uma diminuição de nutrientes dentro do tumor, e acabe induzindo a produção de galectina-3.

Estes dados analisados conjuntamente com dados relativos à expressão de galectina-3 em áreas de pseudopaliçada podem indicar a função desta proteína no microambiente tumoral, uma vez que ele foi mimetizado *in vitro*. É visto que devido ao crescimento tumoral exacerbado, há o desenvolvimento de regiões tumorais deficientes em oxigênio e nutrientes, dando origem a áreas necróticas. Neste ambiente, células começariam a expressar galectina-3 *de novo* para proteção contra a morte celular, conferindo habilidades adaptativas, e como é postulado por Brat e colaboradores (2004b), migrariam para fora destas áreas, dando origem a camada de pseudopaliçada, a qual é positiva para galectina-3 (NEDER *et al.* 2004) e comumente presente em glioblastomas.

Além de participar da proteção contra a morte celular, também é possível que a galectina-3 atue em ambientes de borda, como áreas de pseudopaliçada a 150 a 200µm de distância de vasos sangüíneos, onde há períodos cíclicos de hipóxia, com indução de glicólise anaeróbia, e

---

posterior utilização do oxigênio acumulado, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (GATENBY *et al.* 2007).

- *6.5.5 Galectina-3 atua diminuindo células em fase G0/G1 e aumentando células em fase S/G2/M na linhagem NG97ht*

Os dados encontrados nestes experimentos indicam a participação da galectina-3 na indução da proliferação celular nesta linhagem NG97ht, a partir do aumento de células em fase S/G2/M, porém os dados da literatura demonstram heterogeneidade de resultados em relação a alterações de ciclo celular e progressão tumoral envolvendo a galectina-3, sugerindo que sua ação depende de cada tipo celular.

Mazurek e colaboradores (2005) demonstraram que uma linhagem de células epiteliais de mama não tumorigênica, BT-549, quando sofreu introdução do gene selvagem de galectina-3, apresentou tumorigenicidade e potencial metastático em camundongos *nude*, com aumento da porcentagem de células em fase G2/M e diminuição de células em G0/G1. Deste modo, a galectina-3, neste modelo, induziu proliferação celular. Estes mesmos estudos indicaram que esta indução da proliferação celular ocorreu devido à galectina-3 fosforilada, pois a linhagem BT-549 transfectada com uma galectina-3 fosfomutante apresentou taxas diminuídas de mitose, com parada de ciclo celular em fase G0/G1.

Além destes pesquisadores, Wang e colaboradores (2009) descrevem que em uma linhagem de câncer de próstata humana, PC3, o *knockdown* de galectina-3 através da técnica de RNA de interferência aumentou a porcentagem de células em G0/G1, indicando parada de ciclo celular, demonstrando também que a galectina-3 atue induzindo a progressão tumoral.

Em comparação com outros estudos, Ellerhorst e colaboradores (2002) demonstraram efeitos opostos, onde a transfecção do gene de galectina-3 para uma outra linhagem de câncer de

---

próstata LNCaP, que não produz esta proteína, induziu diminuição das taxas de proliferação celular *in vitro*, além de que para o desenvolvimento de tumores em camundongos *nude*, foi necessária a regulação negativa desta proteína, demonstrando que aparentemente, nestas células, a expressão de galectina-3 tem efeitos deletérios.

- 6.5.6 *A privação de soro fetal bovino in vitro leva à diminuição da adição de resíduos de ácido siálico, porém sem aumentar a susceptibilidade à morte pela galectina-3 extracelular*

A diminuição da adição de resíduos de ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 a resíduos de galactose nestas células da linhagem NG97ht expostas a baixas concentrações de soro fetal bovino pode ser explicada por uma observação realizada em tecidos tumorais e fetais.

Os ácidos siálicos são estruturas normalmente encontradas em posições terminais de cadeias de oligossacarídeos N-ligados (ligação covalente a resíduos de asparagina), O-ligados (ligação a grupos hidroxila de aminoácidos serina, treonina, tirosina ou hidroxilisina) ou glicosfingolípídeos (VARKI *et al.* 2008). E em mamíferos, o ácido siálico normalmente presente nas células é o ácido N-glicolil-neuramínico (Neu-5Gc), com exceção dos humanos, os quais tiveram perda da síntese deste componente durante a evolução e apresentam o ácido N-acetil-neuramínico (Neu-5Ac) (BRINKMAN-VAN DER LINDEN *et al.* 2000).

Porém, alguns casos demonstram que o Neu-5Gc pode ser um antígeno onco-fetal em humanos, além de ser raramente expresso em outros tecidos. Este fato seria explicado pela incorporação de Neu-5Gc a partir da ingestão de carne vermelha, sendo este componente incorporado por células em altas taxas de divisão celular.

Tangvoranuntakul e colaboradores (2003) sugerem que esta captação é realizada pela pinocitose de Neu-5Gc, o qual alcançaria o sistema endossomal/lisossomal e posteriormente entraria no Complexo de Golgi, sendo alvo de sialiltransferases que catalisariam a sua transferência para glicoconjugados recém sintetizados. Células normais com menores taxas de divisão teriam produção normal de Neu-5Ac, e por competição com Neu-5Gc, seriam incorporados mais rapidamente.

No caso de tumores e possivelmente nesta linhagem NG97ht, a produção normal de ácido siálico não é capaz de acompanhar as altas taxas mitóticas, levando à diminuição da expressão de ácido siálico por estas células em privação de soro fetal bovino. Ao mesmo tempo em que a ligação de resíduos de ácido siálico diminui, há maior exposição de elementos subterminais da cadeia de carboidratos, como por exemplo, a galactose, evidenciada por nossos resultados.

Embora tenham ocorrido menores taxas de adição de ácido siálico, não foi demonstrado que há diferença na indução da morte quando estas células foram incubadas em normóxia,  $\text{CoCl}_2$  100 $\mu\text{M}$  e em hipóxia em privação de soro fetal bovino na presença de lactose ou sacarose, apontando para duas hipóteses. (i) A galectina-3 nestas células da linhagem NG97ht não é secretada, portanto não se liga a receptores de membrana, ou que (ii) a galectina-3 extracelular não é capaz de induzir a via de morte celular, ou pela perda desta via ou proteção pela própria galectina-3 intracelular.

- 6.5.7 O cloreto cobaltoso como agente mimetizador da hipóxia

Devido a alguns resultados contraditórios durante os ensaios em hipóxia mimética e em câmara de hipóxia, seria questionável o uso do cloreto cobaltoso. Olbryt e colaboradores (2006) descrevem, através de experimento utilizando *microarrays*, 203 transcritos comuns aos dois

tratamentos, sendo a expressão gênica de 414 genes exclusivos da hipóxia real, enquanto outros 219 exclusivos da hipóxia mimética em células de melanoma. Entre os grupos de genes induzidos pela hipóxia real estão os relacionados com glicólise, migração, adesão e atividade de MAP quinases, além da galectina-3, o qual possuiu o maior incremento de expressão entre todos os genes analisados tanto em hipóxia real quanto em hipóxia mimética.

Estas diferenças descritas sobre as expressões gênicas podem explicar as diferentes taxas de migração celular, porém seria esperado que em câmara de hipóxia houvesse maior migração, já que sua atuação em genes de migração e adesão celular é maior do que quando há exposição ao  $\text{CoCl}_2$ .

Além disso, nossos ensaios apresentados também demonstraram toxicidade celular dependente de tempo e alterações de ciclo celular durante a exposição ao cloreto cobaltoso em comparação com células em normóxia.

É possível que a utilização do cloreto cobaltoso não seja um instrumento indicado para a análise de fatores microambientais como a hipóxia e migração celular, e sim um fator para análise específica da ativação de HIF-1 $\alpha$ .

# CONCLUSÕES

## 7. Conclusões

- Apesar de a linhagem NG97 ter se tornado um híbrido, a análise histopatológica dos tumores gerados pelo seu implante em animais imunodeficientes mostra que esta linhagem guarda as características de um glioblastoma. Além disso, demonstrou-se uma via de integração celular entre os dois genomas da linhagem. Estes dados demonstram uma grande conservação evolutiva, visto que o fenótipo maligno é humano e a expressão de galectina-3 em áreas de pseudopaliçada é proveniente do genoma murino (fenômeno conhecido como fenocópia);
- A análise dos ligantes *in vitro* demonstra vias de secreção diferenciadas entre a galectina-3 (via não-clássica) e seus ligantes (via clássica), evitando o encontro prematuro da galectina-3 com seus ligantes dentro da célula;
- O controle da expressão de galectina-3, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, não é realizado pela metilação de seu promotor;
- A galectina-3 tem sua expressão aumentada em situação de hipóxia e atua como protetor contra a morte celular *in vitro* frente à hipóxia e privação de nutrientes nesta linhagem NG97ht;
- Devido à mimetização de seu ambiente *in vivo*, podemos concluir que a galectina-3 também atua como fator de resistência contra a morte em áreas necróticas e hipóxicas dentro do tumor, como as zonas de pseudopaliçada comumente presentes em glioblastomas.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## **8. Referências Bibliográficas**

- 1. AGRWAL, N.; SUN, Q.; WANG, S. Y.; WANG, J. L.** Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem.* 268(20):14932-9, 1993.
- 2. AHMED, H.; BANERJEE, P. P.; VASTA, G. R.** Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 358(1):241-6, 2007.
- 3. AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H. R. & RAZ, A.** Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.*, 57: 5272, 1997.
- 4. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** *Molecular Biology of the cell.* 4<sup>th</sup> edition, 2002.
- 5. AUZUBEL, F. M.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. & STRHUL, K.** *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd edition, 1995.
- 6. BARONDES, S. H.; COOPER, D. N.; GITT, M. A. & LEFFLER, H.** Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 269: 20807-20810, 1994.

7. **BRAT, D. J. & VAN-MEIR, E. G.** Vaso-occlusive and pro thrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis and accelerated growth in glioblastoma. Laboratory investigation. Vol 84, 397-405, 2004a.
  
8. **BRAT, D. J.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. C.; HUNTER, S. B.; PECOT, M.; COHEN, C.; HAMMOND, E. H.; DEVI, S. N.; KAUR, B. & VAN MEIR, E. G.** Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. Can Res, 64: 920-927, 2004b.
  
9. **BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C.; SJOBERG, E. R.; JUNEJA, L. R.; CROCKER, P. R.; VARKI, N.; VARKI, A.** Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. J Biol Chem. 275(12):8633-40, 2000.
  
10. **CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; BRACKE, M.; VAN DEN BRÛLE, F.** Dual activities of gal-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear gal-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectina-3. Oncogene, 23: 7526-7536, 2004.
  
11. **Cancer Research UK ([www.cancerhelp.org.uk](http://www.cancerhelp.org.uk))**
  
12. **CHEN, N.; KARANTZA-WADSWORTH, V.** Role and regulation of autophagy in cancer. Biochim Biophys Acta. 2009

13. **CHOI, C.; KUTSCH, O.; PARK, J; ZHOU, T.; SEOL, D-W & BENVENISTE, E. N.** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells. *Molecular and Cellular Biology*, vol 22, no 3:724-736, 2002.
  
14. **COOPER, N. W. & BARONDES, S. H.** God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology*, vol 9, no 10: 979-984. 1999.
  
15. **COWLES, E. A.; AGRWAL, N.; ANDERSON, R. L.; WANG, J. L.** Carbohydrate binding protein protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative, *J. Biol. Chem.* 265, 17706–17712, 1990.
  
16. **DAGHER, S. F.; WANG, J. L. & PATTERSON, R. J.** Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1213-1217, 1995.
  
17. **DAVIDSON, P. J.; DAVIS, M.J.; PATTERSON, R. J.; RIPOCHE, M. A.; POIRIER, F.; WANG, J. L.** Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glicobiology*, vol. 12: 329-337, 2002.
  
18. **DE MELO, F. H. M.; BUTERA, D.; MEDEIROS, R. S.; ANDRADE, L. N. S.; NONOGAKI, S.; SOARES, F. A.; ALVAREZ, R. A.; DA SILVA, A. M. M.; CHAMMAS, R.** Biological Applications of a Chimeric Probe for the Assessment of Galectin-3 Ligands. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol 55 (10)- 1015-1026, 2007.

19. **DEBRAY, C.; VEREECKEN, P.; BELOT, N.; TEILLARD, P.; BRION, J. P.; PANDOLFO, M.; POCHET, R.** Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. *Biochemical and Biophysical research Communications* 325, 1393-1398, 2004.
20. **DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M.** Galectin-3: An open ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:616-635, 2006.
21. **ELAD-SFADIA, G.; HAKLAI, R.; BALAN, E.; KLOOG, Y.** Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity, *J. Biol. Chem.* 279, 34922–34930, 2004.
22. **ELLERHORST, J. A.; STEPHENS, L. C.; NGUYEN, T.; XU, X-C.** Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line Incap. *The prostate* 50:64-70, 2002.
23. **ELOLA, M. T.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; TRONCOSO, M. F.; VASTA, G. R.; RABINOVISH, G. A.** *Cell Mol Life*, 64, 1679-1700, 2007.
24. **FUJIWARA, S.; NAKAGAWAK.; HARADA. H.; NAGATO, S.; FURUKAWA, K.; TERAOKA, M.; SENO, T.; OKA, K.; IWATA, S.; OHNISHI, T.** Silencing hypoxia-inducible factor-1· inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 30: 793-802, 2007.

25. **FUKUMORI, T.; OKA, N.; TAKENAKA, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; ELSAMMAN, E.; KASAI, T.; SHONO, M.; KANAYAMA, H. O.; ELLERHORST, J.; LOTAN, R.; RAZ, A.** Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res.* 5;66(6):3114-9, 2006.
26. **GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J.** Why do cancers have high aerobic glycolisys. *Nature Reviews Cancer*, 4- 891:899, 2004.
27. **GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J.** Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(7-8):1358-66, 2007.
28. **GOLDENBERG, D. et al.** Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*: 130 (1), 39-44, 2004.
29. **GREIJER, A. E.; VAN DER GROEP, P.; KEMMING, D.; SHVARTS, A.; SEMENZA, G. L.; MEIJER, G. A.; VAN DE WIEL, M. A.; BELIEN, J. A.; VAN DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E.** Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*, 3-291:304, 2005.
30. **GRIPPO, M. C.; PENTEADO, P. F.; CARELLI, E. F.; CRUZ-HOFLING, M. A.; VERINAUD, L.** Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. *Cell Mol Neurobiol*, 21(4): 421-428, 2001.
31. **HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A.** Hallmarks of Cancer. *Cell*, vol 100, 57-70, 2000.
-

32. **HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.** The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution, *Glycobiology* 3, 297–304, 1993.
33. **HOLLAND, E. C.** Glioblastoma multiforme: The terminator. *PNAS*, 6242-6244, 2000.
34. **JONES, M.; MCLOUGHLIN, V.; CONNOLLY, J. G.; FARQUHAR, C. F.; MACGREGOR, I. R.; HEAD, M. W.** Production and Characterization of a Panel of Monoclonal Antibodies against Native Human Cellular Prion Protein. *Hybridoma (Larchmt)*. 28(1):13-20, 2009.
35. **KADROFSKE, M. M.; OPENO, K. P.; WANG, J. L.** The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys*, 249, 7-20, 1998.
36. **KANAYA, K & KAMITANI, T.** pVHL-independent ubiquitination of HIF1 and its stabilization by cobalt ion. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 750-755, 2003.
37. **KIM, D. W.; KIM, K. H.; YOO, B. C.; HONG, S. H.; LIM, Y. C.; SHIN, Y. K.; PARK, J. G.** Identification of mitochondrial F(1)F(0)-ATP synthase interacting with galectin-3 in colon cancer cells. *Cancer Sci.* 99(10):1884-91, 2008.

38. **KONNIKOVA, L.; KOTECKI, M.; KRUGER, M. M.; COCHRAN, B. H.** Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells; *BMC Cancer*; 3:23-32, 2003.
39. **KUKLINSKI, S.; PESHEVA, P.; HEIMANN, C.; URSHEL, S.; GLOOR, S.; GRAEBER, S.; HERZOG, V.; PIETSCH, T.; WIESTLER, O. D.; PROBSTMEIER, R.** Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, no 50: 45-57, 2003.
40. **KUWABARA, I.; LIU, F-T.** Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin, *J. Immunol.* 156, 3939–3944, 1996.
41. **LAHM, H.; ANDRÉ, S.; HOEFLICH, A.; FISCHER, J. R.; SORDAT, B.; KALTNER, H.; WOLF, E.; GABIUS, H. J.** Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 127(6): 375-86, 2001.
42. **LAING, J. G.; WANG, J. L.** Identification of carbohydrate binding protein, *Biochemistry* 27, 5329–5334, 1988.
43. **LANDO, D.; PEET, D. J.; GORMAN, J. J.; WHELAN, D. A.; WHITELAW, M. L.; BRUICK, R. K.** FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme the regulates the transcriptional activity of hipoxya-inducible factor. *Genes Dev.*, 16: 1466-1471, 2002.

44. **LEGLER, J. M.; RIES, L. A. G.; SMITH, M. A. WARREN, J. L.; HEINEMAN, E. F.; KAPLAN, R. S. & LINET, M. S.** Brain and other central system cancers: Recent trends in incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no 16: 1382-1390, 1999.
45. **LIN, H. M.; PESTELL, R. G.; RAZ, A. & KIM, H. R.** Galectin-3 enhances cyclin D (1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*, 21:8001-8010, 2002.
46. **LIU, F. T.; RABINOVISH, G. A.** *Nat Rev Cancer*, 5: 29-41, 2005.
47. **MACHADO, C. M.; SCHENKA, A.; VASSALLO, J.; TAMASHIRO, W. M.; GONÇALVES, E. M.; GENARI, S. C.; VERINAUD, L.** Morphological characterization of a human glioma cell line. *Cancer Cell Int.* 10;5(1):13, 2005.
48. **MACHADO, C. M. L.; IKEMORI, R. Y.; ZORZETO, T. Q.; NOGUEIRA, A. C. M. A.; BARBOSA, S. D. S.; SAVINO, W.; SCHENKA, A. A.; VASSALLO, J.; HEINRICH, J. K.; BOETCHER-LUIZ, F. AND VERINAUD, L.** Characterization of cells recovered from the xenotransplanted NG97 human-derived glioma cell line subcultured in a long-term *in vitro*. *BMC Cancer*, 8: 291, 2008.
49. **MAHER, E. A. et al.** Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*, 15: 1311-1333, 2001.
-

50. **MASSON, P. J.** Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. *J. Tech. Methods*, 12: 75-90, 1929.
51. **MATARRESE, P.; TINARI, N.; SEMERARO, M.L.; NATOLI, C.; IACOBELLI, S. AND MALORNI, W.** Galectin-3 over expression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.* 473, 311–315, 2000a.
52. **MATARRESE, P.; FUSCO, O.; TINARI, N.; NATOLI, C.; LIU F.-T.; SEMERARO, M.L.; MALORNI, W. AND IACOBELLI, S.** Galectin-3 over expression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer* 85, 545–554, 2000b.
53. **MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W. & RATCLIFFE, P. J.** The pVHL-HIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Bio*, 76: 502-365, 2001.
54. **MAZUREK, N.; CONKLIN, J.; BYRD, J. C.; RAZ, A.; BRESALIER, R. S.** Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands, *J. Biol. Chem.* 275, 36311–36315, 2000.
55. **MENON, R. P.; STROM, M.; HUGHES, R. C.** Interaction of a novel cysteine and histidine-rich cytoplasmic protein with galectin-3 in a carbohydrate independent manner, *FEBS Lett.* 470, 227–231, 2000.

56. **MOON, B-K.; LEE, Y. J.; BATTLE, P.; JESSUP, J. M.; RAZ, A. & KIM, H-R. C.**  
Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: Implication of galectin-3 function during metastasis. *American Journal of Pathology*, vol. 159, no 3: 1055-1060, 2001.
57. **NAKAHARA, S.; OKA, N.; WANG, Y.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; RAZ, A.**  
Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Res.* 66(20):9995-10006, 2006.
58. **NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K. J. & RAZ, A.** Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *American Journal of Pathology*, vol 156, no 3:899-909, 2000.
59. **NEDER, L.; MARIE, S. K.; CARLOTTI, C. G. JR.; GABBAI, A. A.; ROSEMBERG, S.; MALHEIROS, S. M.; SIQUEIRA, R. P.; OBA-SHINJO, S. M.; UNO, M.; AGUIAR, P. H.; MIURA, F.; CHAMMAS, R.; COLLI, B. O.; SILVA, W. A. JR.; ZAGO, M. A.**  
Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol.* Oct;14(4):399-405, 2004.
60. **NICKEL W, RABOUILLE C.** Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(2):148-55, 2009

61. **OCHIENG, J.; LEITE-BROWNING, M. L.; WARFIELD, P.** Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 788–791, 1998.
62. **OHGAKI, H.; DESSEN, P.; JOURDE, B.; HORSTMANN, S.; NISHIKAWA, T.; DI PATRE, P. L.; BURKHARD, C.; SCHÜLER, D.; PROBST-HENSCH, N. M.; MAIORKA, P. C.; BAEZA, N.; PISANI, P.; YONEKAWA, Y.; YASARGIL, M. G.; LÜTOLF, U. M.; KLEIHUES, P.** Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *CANCER RESEARCH* 64, 6892–6899, October 1, 2004.
63. **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 Expression*, vol.13 191-203, 2006.
64. **OZOG, M. A.; BECHBERGER, J. F. & NAUS, C. C.** Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFR $\alpha$ ) increases connexin 43 expression and suppresses growth of C6 glioma cells. *Cancer Res*, 62(12):3544-3548, 2002.
65. **PAPETTI, M & HERMAN, I. M.** Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282: 947-970, 2002.
66. **PARK, S. H.; MIN, H. S.; KIM, B.; MYUNG, J.; PAEK, S. H.** Galectin-3: a useful biomarker for differential diagnosis of brain tumors. *Neuropathology.* 2008 Oct;28(5):497-506. 2008.

67. **PARON, I; SCALONI, A.; PINES, A.; BACHI, A.; LIU, F.-T; PUPPIN, C.; PANDOLFI, M.; LEDDA, L.; DI LORETO, C.; DAMANTE, G.; TELL, G.** Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 545–553, 2003.
68. **PFAFFL, M. W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007, 2001.
69. **POWIS, G. & KIRKPATRICK, L.** Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Molecular Cancer Therapeutics*, 647-654, 2004.
70. **RAO, J. S.** Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews Cancer.* Vol 3, 489-501, 2003.
71. **REED, J. C.** Cytochrome C: can't live with it—can't live without it. *Cell* 91: 559–562, 1997.
72. **ROSKANS, J.; RODGERS, L.** *Lab Ref*, 2002.
73. **ROSZMAN, T. ; ELLIOT, L & BROOKS, W.** Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunology Today*, vol. 12, no 10 :370-374, 1991.
74. **RUEBEL, K. H. et al.** Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors. *Cancer Res.*, 65: 1136-1140, 2005.

75. **SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W.** Molecular Cloning – a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
76. **SATELLI, A.; RAO, P. S.; GUPTA, P. K.; LOCKMAN, P. R.; SRIVENUGOPAL, K. S.; RAO, U. S.** Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncology Reports* 19: 587-594, 2008.
77. **SATHISHA, U. V.; JAYARAM, S.; NAYAKA, M. A. S.; DHARMESH, S. M.** Inhibition of Galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconj J. Nov*;24(8):497-507, 2007.
78. **SATO, S.; HUGHES, R. C.** Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol Chem*, 267: 6983-6990, 1992.
79. **SCOTT, E.; WRIGHT, R.** Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes. *Am J Hum Genet*, 32:115–7, 1980.
80. **SEMENZA, G. L.** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer*, 3: 721-732, 2003.
81. **SHEEHAN, D. C. & HRAPCHAK, B. B.:** Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition; Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, 1987.
-

82. **SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; TSUTSUMI, S.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; RAZ, A.** Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin, *Cancer Res.* 64, 6363–6367, 2004.
83. **SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; TSUTSUMI, S.; OKADA, K.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; KUWANO, H.; RAZ, A.** Implication of galectin-3 in Wnt signaling, *Cancer Res.* 65, 3535–3537. 2005.
84. **SONDERGAARD, K. L.; HILTON, D. A.; PENNEY, M.; OLLERENSHAW, M.; DEMAINE, A. G.** Expression of HIF1- $\alpha$  in tumors of patients with glioblastoma. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 28, 210-217, 2002.
85. **SONG, Y. K.; BILIAR, T. R. & LEE, Y. J.** Role of galectin-3 in breast cancer metastasis. *American Journal of Pathology*, vol. 160, no 3: 1069-1075, 2002.
86. **STEINBACH, J. P.; WOLBURG, H.; KLUMPP, A.; PROBST, H.; WELLER, M.** Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ.* 10(7):823-32, 2003.
87. **SUZUKI, O. & ABE, M.** Cell surface N-glycosilation and sialylation regulate galectina-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma. *Onc Reports*, 19: 743-748, 2008.

88. **TALKS, K. L.; TURLEY, H.; GATTER, K. C.; MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; HARRIS, A. L.** The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* Aug;157(2):411-21, 2000.
89. **TANGVORANUNTAKUL, P.; GAGNEUX, P.; DIAZ, S.; BARDOR, M.; VARKI, N.; VARKI, A.; MUCHMORE, E.** Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;100(21):12045-50, 2003.
90. **TEIXEIRA, V. R.; DA COSTA, M.; COSTA, F. F.; CAMARGO, A. A. & CHAMMAS, R.** Galectin-3 gene is silenced by methylation along melanoma progression. *AACR Meeting Abstracts*, 378, 2006.
91. **THOMPSON, SAMUEL W.** Selected Histochemical and Histopathological Methods, Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1966.
92. **VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E.** Essentials Of Glycobiology, 2<sup>nd</sup> edition, 2008.
93. **WANG, H. S.; NIEWCZAS, V.; NAZARETH, H. R.; HAMERTON J. L.** Cytogenetic characteristics of 26 polyethylene glycol-induced human-hamster hybrid cell lines. *Cytogenet Cell Genet*;24:233-244, 1979.

94. **WANG, L.; INOHARA, H.; PIENTA, K. J.; RAZ, A.** Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 292–303, 1995.
95. **WANG, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L.; BALAN, V.; HOGAN, V.; PIENTA, K. J.; RAZ, A.** Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *The American Journal of Pathology*, vol 174, n 4, 2009.
96. **WARBURG, O.** On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270, 1956.
97. **WECHSLER-REYA, R. & SCOTT, M. P.** The development biology of brain tumors. *Annu Rev Neusci*, 24:385-428, 2001.
98. **WENGER, R. H. & GASSMANN, M.** Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-I. *Biol. Chem.*, 378: 609–616, 1997.
99. **YANG, R. Y.; HSU, D.K.; LIU, F.-T.** Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6737– 6742, 1996.
100. **YOSHII, T; FUKUMORI, T.; HONJO, Y.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; RAZ, A.** Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of Biology Chemistry*, vol. 277, no 9: 6852-6857, 2002.

101. **YU, F.; FINLEY, R. L. JR.; RAZ, A.; KIM, H. R.** Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 3;277(18):15819-27, 2002.
102. **YUAN, Y.; HILLIARD, G.; FERGUSON, T. & MILLHORN, D. E.** Cobalts inhibit the interaction between hypoxia inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia inducible factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 278: 15911-15916, 2003.
103. **ZAGZAG, D.; ZHONG, H.; SCALZETTI, J.; LAUGHNER, E.; SIMONS, J. & SEMENZA, G.** Expression of HIF- $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion and progression. *Cancer*; 88: 2006-2018, 2000.
104. **ZENG, Y.** *J Bone Miner Res*, jun 25, 2007.
105. **ZHU, Y; PARADA, L. F.** The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews*, vol. 2, 616:626, 2002.
106. **ZHUO, Y.; CHAMMAS, R.; BELLIS, S. L.** Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3 induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2008.

# **ANEXOS**

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada “Análise de possíveis mecanismos e consequências funcionais da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas à condições hipóxicas”

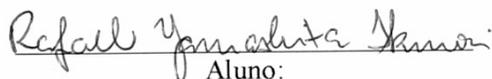
( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_;

(  ) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1151-1);

( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.  
Especificar: \_\_\_\_\_

  
Aluno:

  
Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

  
Nome:

Função:

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEAI/IB - UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

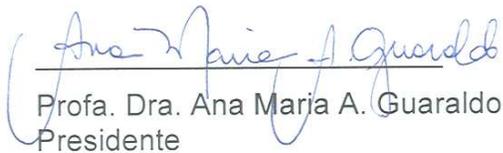
CERTIFICADO

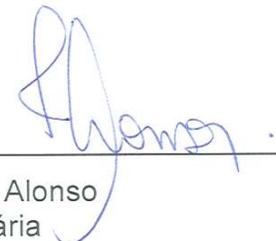
Certificamos que o Protocolo nº 1151-1, sobre "Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da superexpressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Liana Verinaud / Rafael Y. Ikemori, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1151-1, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 29, 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva