RAFAEL YAMASHITA IKEMORI

**Análise da expressão de galectina-3
em células de glioma expostas a
condições hipóxicas e seu papel no
desenvolvimento de tumores *in vivo***

**Tese apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências**

**Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas**

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ikemori, Rafael Yamashita

Análise da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas e seu papel no desenvolvimento de tumores *in vivo* / Rafael Yamashita Ikemori. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Galectina-3 2.Hipóxia 3.Glioma 4.Fator 1 induzível por hipóxia 5.Autofagia 6.Morte celular

USP/FM/DBD-061/14

"We are all atheists about most of the gods that humanity has ever believed in.

Some of us just go one god further."

Richard Dawkins

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Investigação Translacional em Oncologia no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira e no Laboratório de Investigação Médica LIM24 na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo colaborações com o Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguai, o Instituto de Química da Universidade de São Paulo e o Instituto do Câncer do Rio de Janeiro.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Roberto e Elizabeti.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que me acompanharam nesta longa jornada, especialmente meus pais, que me apoiaram nestes longos anos de estudo.

Agradeço meu orientador, professor doutor Roger Chammas, sem o qual este trabalho nunca teria sido realizado.

Aos os meus amigos do grupo de Adesão Celular e Câncer e colaboradores, aos que passaram e aos que ainda estão: Ana Carolina Cardoso, Adalberto Alves, Alexandre Sarmento, Andreia Otake, Ana Flávia Garcia, Camila Machado, Camila Melo, Cristina da Silva, Emerson Soares, Flávia Belarmino, Gabriella Malheiros, Glauber Brito, Guilherme Francisco, Karina Furuzawa, Luciana Dorneles, Luciana Andrade, Luciana Pescatore, Luiza Lourenço, Mariana Ikoma, Moacyr Barreto, Patrícia Costa, Priscila Cirilo, Raimundo Araújo, Renata Saito, Rodrigo Aguiar, Ronny Mitsuoka, Silvia Guedes, Silvina Bustos, Sofia Santos, Tatiane Furuya, Tharcísio Jr.

Aos meus amigos do Instituto Pasteur de Montevideo: Cláudia Schvartzman, Leticia Monin, Mariana Pegazzano, Florencia Festari e Eduardo Osinaga.

Aos colaboradores do Instituto de Química da USP: Nathalie Cella, Mariana Longhi, Mariana e Matheus.

Aos colaboradores do INCA do Rio de Janeiro, Marcelo Alex de Carvalho, João De Séllos, Giuliana de Gregoriis e Renata.

Aos funcionários Maria José, Liliane Paiva, Willame, Jair, Cristina, Ivanete, Luciana Martins, Luis, Adriana Moreira e Ana Lúcia.

A Ana Lúcia Garippo pela assistência e dedicação aos experimentos com microscopia confocal no InCor.

Ao departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP, e Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) onde este projeto foi realizado, além de todos os que ajudaram para que este trabalho acontecesse.

À FAPESP (2009/10857-0) pelo apoio financeiro sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado, ao CNPq e a Capes pelo apoio na colaboração com a UdelaR no intercâmbio Brasil-Uruguai.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1) INTRODUÇÃO	1
2) OBJETIVO GERAL	16
3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4) QUADRO EXPERIMENTAL	18
5) MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1) Cultivo das células	19
5.2) Ensaio de exposição à hipóxia	19
5.3) Extrações protéicas	20
5.4) Demonstração da indução da hipóxia	21
5.5) Imunofluorescência: HIF-1 α e gal-3 – NG97ht	23
5.6) Eletroforese de duas dimensões – NG97ht	24
5.7) Purificação de anticorpos	25
5.8) Detecção de anticorpos reativos através de ELISA e análise por <i>western blot</i> e coloração de proteínas por <i>coomassie blue</i>	27
5.9) Ligação de anticorpos a sefarose	28
5.10) Purificação de gal-3	30
5.11) Análise dos purificados de gal-3	31
5.12) Aplicação das amostras purificadas em gel de acrilamida de uma dimensão	31
5.13) Análise dos peptídeos de gal-3 através de espectrometria de massa	33

5.14) Inibição de NF- κ B – NG97ht	34
5.15) Tratamento com cicloheximida – NG97ht	38
5.16) Avaliação ROS por DHE – NG97ht	39
5.17) Avaliação de vacúolos acídicos através de laranja de acridina – NG97ht	39
5.18) Avaliação da morte celular por Anexina V e iodeto de propídeo na linhagem NG97ht	
5.19) Ensaio com siRNA anti gal-3 – NG97ht	40
5.20) Exposição das células da linhagem NG97ht a carboidratos	41
5.21) Expressão protéica de gal-3 – U251, U87MG e T98G	42
5.22) Indução do RNAm de gal-3 – U251, U87MG e T98G	43
5.23) Ensaio de morte celular – U251, U87MG e T98G	44
5.24) Expressão de gal-3 normóxia e hipóxia – U87MG	44
5.25) Produção de ROS em hipóxia – U87MG e T98G	45
5.26) Avaliação de vacúolos acídicos – T98G e U87MG	45
5.27) Eletroforese de duas dimensões – U87MG	46
5.28) Análise por imunofluorescência da expressão de gal-3 – U87MG e T98G	47
5.29) Transdução de células das linhagens U87MG e T87G	47
5.30) Avaliação da morte celular em células <i>knockdown</i> para gal-3 – U87MG e T98G	48
5.31) Inoculação de células tumorais	49
5.32) Análise da expressão de gal-3 em tumores	51
5.33) Avaliação da taxa de crescimento celular in vitro	52
5.34) Análise estatística	52
6) RESULTADOS	53
6.1) Demonstração da indução de hipóxia	53
6.2) Acúmulo de HIF-1 α nuclear	57
6.3) Distribuição de gal-3 – NG97ht	59
6.4) Necessidade de fatores intermediários na indução de gal-3	66
6.5) Indução de gal-3 dependente de NF- κ B	67
6.6) Aumento das formas de ponto isoelétrico mais básico de gal-3	69

6.7) Detecção de duas isoformas diferentes de gal-3	72
6.8) Aumento da e vacúolos acídicos em hipóxia – NG97ht	73
6.9) A morte induzida por privação de oxigênio e nutrientes apresenta caráter necrótico – NG97ht	75
6.10) Avaliação do <i>knockdown</i> do RNAm de gal-3 – NG97ht	77
6.11) A participação da gal-3 extracelular – NG97ht	79
6.12) Expressão protéica de gal-3 – U251, U87MG e T98G	81
6.13) Avaliação da indução de gal-3 por q-RT-PCR – U251, U87MG e T98G	83
6.14) Avaliação das taxas de morte celular – U251, U87MG e T98G	85
6.15) Expressão de gal-3 em privação de oxigênio e nutrientes – U87MG	87
6.16) Avaliação da localização subcelular de gal-3 – T98G e U87MG	88
6.17) Gal-3 apresenta alterações pós-traducionais – U87MG	97
6.18) Aumento de ROS e vacúolos acídicos – U87MG e T98G	99
6.19) Transdução das células das linhagens T98G e U87MG	101
6.20) Avaliação da morte em células com <i>knockdown</i> de gal-3 – U87MG e T98G	103
6.21) Inoculação de células shRNA para gal-3 em camundongos <i>nude</i>	105
6.22) Análise histológica de tumores	108
7) DISCUSSÃO	111
7.1) Marcação para hipóxia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	111
7.2) Correlação entre morte celular e produção de espécies reativas e vacúolos acídicos em células da linhagem NG97ht, U87MG e T98G	112
7.3) A indução da morte por necrose em hipóxia e privação de nutrientes	114
7.4) A indução gênica de gal-3: HIF-1 α , NF- κ B e fatores intermediários	115
7.5) Colocalização subcelular de gal-3 com mitocôndrias e seu papel na proteção contra a morte celular	118

7.6) Modificações pós-traducionais de gal-3 em cloreto cobaltoso e hipóxia _____	120
7.7) Possível indução da morte pela gal-3 extracelular _____	122
7.8) Expansão da função de gal-3 na inibição da morte celular induzida pela privação de oxigênio e nutrientes _____	124
7.9) O papel da galectina-3 no desenvolvimento tumoral _____	125
 8) SUMÁRIO DE RESULTADOS _____	129
 9) CONCLUSÃO _____	130
 10) APÊNDICE _____	132
 11) REFERÊNCIAS _____	133
 12) ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

AP: *Activator protein*

ATP: Trifosfato de adenosina

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: Albumina do soro bovino

β1-4: Galb1-4GlcNAcb

β3: Galb1-3GlcNAcb

cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina

cDNA: DNA complementar ao RNAm

CRD: Domínio de reconhecimento de carboidratos (*carbohydrate recognition domain*)

CT: Cycle threshold

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

DHE: Diidroetidina

DHMEQ: *Dehydroxymethylepoxyquinomicin*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPEC: Dietilpirocarbonato

DTT: Dietil treitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Fig: Figura

Gal-3: Galectina-3

GBM: Glioblastoma multiforme

h: Hora

HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico

HIF-1: Fator Induzido por Hipóxia (*hypoxia inducible factor*)

IκB: Proteína inibidora de NF-κB

IKK: Proteína quinase fosforiladora de IκB

kDa: kilo Daltons

mmHg: Milímetros de mercúrio

NF-κB: Fator nuclear κB

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão fosfato salino

pO₂: Pressão de oxigênio

PHD: Prolil hidroxilase

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

PVDF: *Hydrophobic polyvinylidene difluoride*

qRT-PCR: PCR quantitativo em tempo real

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPM: Rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RNA_m: RNA mensageiro

RPLP0: Proteína acídica ribossomal P0 60S

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SEM: Erro padrão da média

SFB: Soro fetal bovino

shRNA: RNA de interferência em grampo

siRNA: Pequeno RNA de interferência

SNC: Sistema Nervoso Central

SPF: *Specific pathogen free*

SP1: *Specificity protein 1*

TFRC: Receptor de transferrina

TNF: Fator de necrose tumoral

Tris: *(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride*

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Ikemori, R. Y. Análise da expressão de galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas e seu papel no desenvolvimento de tumores *in vivo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

A galectina-3 (gal-3) pertence a uma família de proteínas com domínios de ligação a β -galactosídeos e está relacionada com diversos aspectos tumorais, como proliferação e adesão celular, angiogênese e proteção contra morte celular. Estudos mostram sua relação com o fenômeno da hipóxia, característica de diversos tumores sólidos que apresentam altas taxas de proliferação celular. A adaptação à hipóxia é mediada principalmente pelo Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1), a qual atua na indução de diversos genes de sobrevivência em ambientes com baixas concentrações de oxigênio. Além de HIF, outros fatores são importantes nesse processo, como NF- κ B, por exemplo, sendo um fator de transcrição responsivo a diversos estresses celulares, entre eles, a hipóxia. Alguns modelos tumorais apresentam-se ideais para o estudo dos efeitos da hipóxia no microambiente tumoral, como os glioblastomas. Estes são tumores do sistema nervoso central com altas taxas de letalidade, são refratários aos principais métodos de tratamento por sua plasticidade, crescimento infiltrativo e heterogeneidade. Histologicamente, estes tumores apresentam atipia nuclear, altas taxas de mitose e áreas de pseudopaliçada. Postula-se que estas áreas sejam compostas por células migrantes de ambientes necróticos, os quais são também hipóxicos devido a

sua distância de vasos sanguíneos e é demonstrado que estas células expressam tanto HIF-1 α quanto gal-3. Ensaios *in vitro* realizados por nosso grupo demonstraram que a gal-3 é positivamente regulada pela hipóxia em uma linhagem de glioma híbrido, NG97ht, além de demonstrar que esta proteína é um fator chave na proteção destas células contra a morte celular induzida pela privação de oxigênio e nutrientes, mimetizando condições necróticas de pseudopaliçada *in vivo*, destacando-se as habilidades anti-apoptóticas desta proteína. Embora uma de suas possíveis funções tenha sido elucidada, os mecanismos de atuação e de indução da gal-3 ainda são obscuros. Deste modo, este projeto visa explorar os papéis pró-tumorais da gal-3, podendo torná-la um possível alvo em terapias anti-neoplásicas, entendendo melhor seus mecanismos de proteção contra a morte celular e controle de expressão em ambientes hipóxicos, além de estudar suas possíveis funções *in vivo* no desenvolvimento de tumores, e também estendendo seus estudos para outras linhagens de glioblastoma. Nossos resultados demonstraram que a gal-3 está co-localizada com mitocôndrias nestas linhagens de glioma, podendo sofrer alterações pós-traducionais em hipóxia, como a fosforilação e que houve acúmulo de HIF-1 α nuclear nestas células em hipóxia. Vimos também que a gal-3 na linhagem NG97ht apresentou-se proveniente de dois alelos diferentes e que fatores intermediários deveriam ser expressos previamente pela célula antes da indução de gal-3 em hipóxia. Também demonstramos que houve dependência de NF- κ B na indução transcricional de gal-3 nestas condições. Estes experimentos também demonstraram que a exposição de células à hipóxia e privação de nutrientes é capaz de induzir tanto espécies reativas de oxigênio como o aumento da

autofagia nestas células, fatores importantes na indução da morte celular, além de demonstrar que na linhagem NG97ht a indução da morte nestas condições ocorreu por necrose, sem apresentar apoptose celular. Expandimos esta teoria da participação da gal-3 como molécula protetora contra a morte em hipóxia e privação de nutrientes para outra linhagem de glioma humano, a T98G. E finalmente, demonstramos que a diminuição da expressão de gal-3 em células tumorais da linhagem U87MG levou a diminuição das taxas de estabelecimento e crescimento tumoral *in vivo*.

Descritores: galectina-3, hipóxia, glioma, fator 1 induzível por hipóxia, autofagia, morte celular.

ABSTRACT

Ikemori, R. Y. Analysis of galectin-3 expression in glioma cells exposed to hypoxic conditions and its role in tumor development *in vivo* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2014.

Galectin-3 (gal-3) belongs to a family of proteins with β -galactoside binding domains and is related to various tumoral aspects, such as cell proliferation and adhesion, angiogenesis and protection against cell death. Studies show its relationship with the hypoxia phenomenon, a characteristic of many solid tumors that have high cell proliferation rates. The adaptation to hypoxia is mainly mediated by Hypoxia Induced Factor (HIF-1), which acts in the induction of several survival genes in environments with low oxygen concentrations. In addition to HIF, other factors are important in this process, such as NF- κ B, for example, which is a transcription factor responsive to various cellular stresses, including hypoxia. Some tumor models are ideal for studying the effects of hypoxia in the tumor microenvironment, e.g. glioblastomas. These central nervous system tumors with high mortality rates are refractory to the main treatment methods due to their plasticity, heterogeneity and infiltrative growth. Histologically, these tumors exhibit nuclear atypia, high mitotic rates and pseudopalisading areas. It is postulated that these areas are composed of migrating cells out of necrotic microenvironments, which are also hypoxic due to their distance from the blood vessels and it is shown that these cells express both HIF-1 α and gal-3. *In vitro* assays performed by our group demonstrated that gal-3 is positively regulated by hypoxia in a hybrid

glioma cell line, NG97ht, and demonstrated that this protein is a key factor in protecting these cells against cell death induced by oxygen and nutrient deprivation conditions mimicking necrotic pseudopalisading areas *in vivo*, highlighting the pro-survival abilities of this protein. Although one of its possible functions has been elucidated, gal-3 mechanisms of action and induction are still unclear. Thus, this project aims to explore the gal-3 pro-tumoral effects, which may make it a possible target for anti-neoplastic therapies, better understanding the mechanisms of protection against cell death and expression in hypoxic environments, and also study its possible functions *in vivo*, extending these studies to other glioma cell lines. Our results demonstrated that gal-3 is located within the mitochondria in these glioma cell lines and may undergo post-translational modifications in hypoxia, such as phosphorylation and that there is accumulation of nuclear HIF-1 α in these cells under hypoxia. We have also seen that gal-3 in the NG97ht cell line presents two different alleles and that intermediate factors must be expressed previously by the cell before gal-3 induction in hypoxia. We also demonstrated that there is dependence on the NF- κ B transcriptional factor for the gal-3 induction under these conditions. These experiments also demonstrated that exposure of cells to hypoxia and nutrient deprivation is capable of inducing reactive oxygen species and increased autophagy in these cells, which are important factors in the induction of cell death. In addition, we demonstrated that the induction of the NG97ht cell death in these conditions is due to necrosis. We expanded this theory of the participation of gal-3 as a protective molecule against cell death in hypoxia and nutrient deprivation to another human glioma cell line, T98G. And finally, we

demonstrated that decreased expression of gal-3 in the U87MG glioma cell line leads to lower tumor establishment rates and decreased growth *in vivo*.

Descriptors: galectin-3, hypoxia, glioma, hypoxia inducible factor 1, autophagy, cell death.

1) INTRODUÇÃO

A glicobiologia é o ramo da ciência responsável pelo estudo dos carboidratos, desde sua estrutura e função, passando também por sua biossíntese. Entretanto, a glicobiologia também analisa outros aspectos, como as proteínas responsáveis pela ligação nestes carboidratos. Entre as diversas proteínas com domínios de ligação a carboidratos, temos as galectinas, as quais são lectinas com domínios de reconhecimento de β -galactosídeos.

Atualmente existem descritas 15 tipos de galectinas em mamíferos, sendo classificadas em três grupos distintos: protótipos, químera e com repetições em *tandem* (HIRABAYASHI *et al.* 1993; ELOLA *et al.* 2007; LIU *et al.* 2005). Galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15 são do tipo protótipo e possuem um domínio de ligação a β -galactosídeos; galectinas 4, 6, 8, 9 e 12 são do tipo de repetição em *tandem* e possuem dois domínios de ligação a β -galactosídeos, e por último a galectina-3 (gal-3), a única pertencente ao grupo químera.

Todas as galectinas possuem uma sequência 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.

Entre todas as galectinas, a gal-3 é a mais estudada devido a suas diversas funções e inúmeros impactos na biologia celular. A gal-3 apresenta de 29 a 35kDa e uma extensa região N-terminal, a qual está conectada a sua

região C-terminal por uma longa repetição de glicina, prolina e tirosina. Em sua região C-terminal é encontrado o domínio de reconhecimento de carboidratos (*carbohydrate recognition domain*, CRD). Este domínio contém uma região conservada NWGR (asparagina, triptofano, glicina e arginina), a qual é presente também no domínio BH1 da proteína Bcl-2, sendo responsável por sua ação anti-apoptótica, além de estar envolvida na multimerização da gal-3 através de seu CRD (YANG *et al.* 1996).

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 têm 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 e angiogênese *in vivo* e diminuição da indução da apoptose, demonstrando alguns papéis opostos quando comparado com suas ações no núcleo (CALIFICE *et al.* 2004).

Extracelularmente, a gal-3 pode atuar como molécula de adesão interferindo em interações célula-célula (VILLA-VERDE *et al.* 2007), matriz-células (KIM *et al.* 2009) e também participar na indução da apoptose pela ligação com $\beta 1$ integrinas sem adição de ácido siálico na superfície de células de carcinoma de cólon (ZHUO *et al.* 2008).

Ao menos em parte, a compartimentalização subcelular de gal-3 parece dependente de alterações pós-traducionais, como a fosforilação (YOSHII *et al.* 2002; MAZUREK *et al.* 2005). Mazurek e colaboradores (MAZUREK *et al.* 2005) descrevem que a gal-3 fosforilada é responsável por diversas propriedades celulares em células de linhagem epitelial de mama, BT-549, levando a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e a apoptose.

A gal-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, diferenciação celular e angiogênese (YOSHII *et al.* 2002; BARONDES *et al.* 1994; NANGIA-MAKKER *et al.* 2000, Markowska *et al.* 2011; Piccolo *et al.* 2013), promovendo às células resistência a espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (MOON *et al.* 2001), atuando como fator antiapoptótico contra diversos estímulos, 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).

Alguns estudos têm relacionado a expressão de gal-3 durante a hipóxia, um fenômeno comum em tumores sólidos (Greijer *et al.* 2005; Hu *et al.* 2007; Olbryt *et al.* 2006, ZENG *et al.* 2007). A hipóxia ocorre quando as células são privadas de oxigênio devido a vaso-oclusão ou angiogênese deficiente, causando também privação de nutrientes, levando consequentemente a necrose tecidual (Brat and Van Meir, 2004).

Um dos principais mecanismos de adaptação a hipóxia consiste no acúmulo de HIF-1 em baixas concentrações de oxigênio. Powis & Kirkpatrick (2004) descrevem HIF-1 como um heterodímero que consiste de uma subunidade α e uma β pertencentes a uma superfamília de fatores de transcrição eucarióticos.

HIF-1 α é descrita como uma proteína produzida constitutivamente e cujo acúmulo é estimulado pela hipóxia de células tanto normais quanto tumorais quando há uma distância maior do que 180 μ m do vaso. Neste caso, há seu acúmulo em ambientes privados de oxigênio a partir de uma concentração de 5% (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.

Em sua via de degradação induzida por concentrações normais de oxigênio, a proteína HIF-1 α 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. Esta sinalização promove reconhecimento pela proteína de von Hippel-Lindau, que se liga diretamente ao HIF-1 α , recrutando o complexo ubiquitinante para degradação da proteína pela via do proteassoma 26S (MAXWELL *et al.* 2001).

HIF-1 α 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).

Além disso, 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 α são mais agressivos e pró-angiogênicos (ZAGZAG *et al.* 2000; TALKS *et al.* 2000).

Além de HIF-1 α , outro fator importante na regulação de genes durante a hipóxia é o Fator Nuclear κ B (NF- κ B). O NF- κ B é uma família de fatores transcricionais composto por p65, RelB, RelC, p50 e p52, os quais possuem um domínio de homologia conservado Rel (RHD), podendo se apresentar em heterodímeros e homodímeros. Estes complexos estão geralmente sequestrados no citoplasma pela interação com proteínas inibidoras de NF- κ B (I κ B) (CORMAC *et al.* 2009), as quais contêm múltiplas cópias de uma sequência chamada de repetições de anquirina que são responsáveis pela ocultação dos sinais de localização nuclear de NF- κ B, mantendo-o inativo no citoplasma.

Para que haja ativação de NF- κ B, é necessário que os inibidores sejam fosforilados pela quinase IKK, a qual é composta pelas subunidades IKK α e IKK β e um regulador chamado NEMO (modulador essencial de NF- κ B) ou IKK γ . Uma vez fosforilado, I κ B é degradado pelo proteassoma, liberando NF- κ B para sua atuação na indução da transcrição de genes no núcleo da célula, como o próprio I κ B α , criando um *feedback* negativo na regulação gênica de NF- κ B.

Quando ativado, NF- κ B é responsável pela regulação de um grande número de genes ligados a processos imunológicos, inflamatórios e apoptóticos, porém os mecanismos pelos quais NF- κ B é regulado pela hipóxia ainda não estão inteiramente esclarecidos, embora estudos apontem para a regulação através do complexo IKK, o qual está induzido em hipóxia (CUMMINS *et al.* 2006; RIUS *et al.* 2008).

Além disso, também é possível que as vias de ativação de NF- κ B e HIF-1 α estejam relacionadas, uma vez que componentes da via de NF- κ B que contém repetições de anquirina também podem ser alvo de hidroxilações (COCKMAN *et al.* 2006), porém existem outros candidatos, como componentes do complexo IKK α e IKK β , ambos contendo sequências análogas a motivos de HIF que são alvo de hidroxilação (CUMMINS *et al.* 2006).

Ademais, existe um *cross-talk* da regulação de HIF e NF- κ B, onde estudos demonstram que mediadores inflamatórios são capazes de aumentar o RNA mensageiro (RNAm) de HIF-1 α através de mecanismos dependentes de NF- κ B, além de ser necessário um nível basal de NF- κ B para a expressão constitutiva de HIF-1 α (RIUS *et al.* 2008). Deste modo, estes dois fatores de transcrição, HIF-1 α e NF- κ B, estão intrinsecamente relacionados à hipóxia e à adaptação das células, tanto normais quanto tumorais, nestas condições.

Alguns modelos tumorais apresentam-se ideais para o estudo da hipóxia, e consequentemente a necrose tumoral, como o glioblastoma multiforme (GBM). Este tumor pertence ao grupo dos gliomas, os quais são neoplasias cerebrais malignas responsáveis por 50% dos tumores originados no Sistema Nervoso Central (SNC). Estes tumores são derivados de precursores gliais, possuindo grande habilidade mitótica, podendo explicar seu

potencial transformante (OZOG *et al.* 2002), como astrócitos, oligodendrócitos e endimócitos, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (LOUIS *et al.* 2007). Quando sofrem transformação, dão origem respectivamente a astrocitomas, oligodendrogliomas e endimomas (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 GBM (grau IV) (Fig. 1).

Figura 1 – Os astrocitomas são provenientes de células astrocíticas e são divididos em quatro graus de acordo com a OMS. O astrocitoma pilocítico (grau I) possui o grau mais leve, não é invasivo e seu tecido é similar ao tecido cerebral normal. O astrocitoma infiltrativo (grau II) possui atipia nuclear e menor tempo de sobrevivência. O astrocitoma anaplásico (grau III) possui atipia nuclear e altas taxas de mitose, levando invariavelmente a progressão para o estágio mais avançado, o glioblastoma multiforme (grau IV) (secundário). Este possui as características previamente descritas adicionada de áreas necróticas com pseudopalisadação, podendo também surgir sem a detecção prévia de seus graus

precedentes, sendo denominado *de novo* ou primário. Adaptado de Brat & Mapstone (2003).

Entre eles, o GBM é o que possui o pior prognóstico por ser muito agressivo e maligno (MAHER *et al.* 2001; CHOI *et al.* 2002; KONNIKOVA *et al.* 2003, HOLLAND 2000). 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).

Ao nível tecidual, o GBM é caracterizado por atipia nuclear, altas taxas proliferativas e presença de áreas necróticas. Uma de suas características particulares é a presença de pseudopaliçada (Fig. 2), descrita como áreas hipercelulares organizadas ao redor de ambientes necróticos. Estas áreas são provavelmente compostas por células que estão migrando ativamente para fora de focos necróticos/hipóxicos (BRAT *et al.* 2004; BRAT & VAN MEIR 2004; RONG *et al.* 2006). Estas células da pseudopaliçada apresentam-se de 5 a 50% menos proliferativas e de 6 a 20 vezes mais propensas a apoptose do que as células adjacentes.

Figura 2 – 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.* 2004).

Algumas moléculas estão altamente envolvidas com a biologia das áreas de pseudopaliçada, como o fator Induzido por Hipóxia (HIF-1a) (BRAT *et al.* 2004; SONDERGAARD *et al.* 2002) e a gal-3, a qual foi encontrada expressa especificamente nestas células da pseudopaliçada (NEDER *et al.* 2004) e tem sido largamente estudada em tumores do SNC (STRIK *et al.* 2001; LEMERCIER *et al.* 2009; GORDOWER *et al.* 1999; BRESALIER *et al.* 1997).

Além disso, a gal-3 é descrita como provável biomarcador para tumores cerebrais (PARK *et al.* 2008), sendo expressa largamente em áreas de pseudopaliçada (NEDER *et al.* 2004). 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 de glioma da linhagem NG97ht em camundongos *nude*, sendo expressa ao longo de todas as células ao redor das áreas necróticas, porém não em suas outras áreas tumorais (Fig. 3).

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

Em nossos experimentos *in vitro* nos quais estas células foram expostas a situações de normóxia (20% O₂) e hipóxia (O₂ < 1%) em altas (13%) e baixas (1%) concentrações de soro fetal bovino (SFB), mimetizando um ambiente necrótico tumoral com privação de oxigênio e nutrientes, foi demonstrado aumento da produção de RNAm (Fig. 4) e da proteína (Fig. 5) de gal-3 após

48h de exposição à hipóxia, além de detectarmos altas taxas de morte celular em baixas concentrações de SFB (dados não mostrados).

Figura 4 – Análise da produção relativa do RNAm de galectina-3 em meio completo com 13% (esquerda) ou 1% (direita) de soro fetal bovino (SFB) em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM ou hipóxia. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Cloreto cobaltoso (CoCl₂), composto químico utilizado para mimetizar a hipóxia através da estabilização de HIF-1 α .

Figura 5 – *Western blot* para galectina-3 em extratos de células da linhagem de glioma NG97ht expostas às condições de normóxia, CoCl₂ 100 µM ou hipóxia por 48 horas e em meio completo com 13% ou privado com 1% de soro fetal bovino (SFB). Aumento da produção de gal-3 em células expostas ao CoCl₂ e à hipóxia em comparação com células em normóxia.

Para avaliar o efeito da gal-3 nestes ambientes, realizou-se seu *knockdown* pela técnica de RNA de interferência e demonstrou-se incremento das taxas de morte celular em células privadas de oxigênio e nutrientes em

comparação com células tratadas com siRNA controle após 48 horas de exposição (Fig. 6). Estes dados demonstram que a gal-3 atua como fator chave na proteção contra a morte celular frente à privação de oxigênio e nutrientes.

Avaliação da morte celular após 48h de exposição - 13% SFB

Avaliação da morte celular após 48 de exposição - 1% SFB

Figura 6 – Avaliação da morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100μM ou hipóxia, em meio completo (13%) ou privado (1%) de soro fetal bovino (SFB) e tratadas com siRNA anti galectina-3 (gal-3) ou siRNA controle. (A) Não há alterações nas taxas de morte celular nos tratamentos com siRNA anti gal-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 gal-3 em comparação com células tratadas com siRNA controle em células expostas ao CoCl₂ 100 μM ou em câmara de hipóxia em meio privado (1%) de soro fetal bovino. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, ***p<0,001.

Estes dados demonstram um dos principais papéis da gal-3, atuando como fator anti-apoptótico. Porém os mecanismos pelos quais a gal-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 a espécies reativas de oxigênio (ROS):

- (i) A gal-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 gal-3 poderia atuar na proteção contra ROS através da ativação de genes como a glutathione-S-transferase (MAZUREK *et al.* 2005), co-fator importante da decomposição enzimática de peróxidos intracelulares pela enzima glutathione peroxidase (SCOTT *et al.* 1980).
- (iii) A gal-3 poderia ligar-se à F(1)F(0)-ATP sintase mitocondrial (KIM *et al.* 2008), diminuindo a produção de ATP nestas células e consequentemente a levando à menor produção de ROS.
- (iv) Por último, a gal-3 poderia agir como alvo direto de ROS, tamponando o ambiente intracelular, servindo como agente antioxidante.

Devido à mimetização *in vitro* do microambiente necrótico tumoral, também é possível que esta seja sua função *in vivo*, onde células de áreas necróticas começam a expressar gal-3 *de novo* para proteção contra morte celular, ao mesmo tempo em que migram para fora destas áreas, originando as regiões de pseudopaliçada encontradas em glioblastomas.

Além destes possíveis papéis na proteção contra a morte celular, uma outra área de interesse é o controle transcricional da gal-3, que ainda é pouco conhecido. É visto que a região promotora do gene de gal-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 e 2 sítios do tipo NF- κ B, entre outros (KADROFSKE *et al.* 1998). Além destes elementos descritos, é visto que o promotor de gal-3 possui diversas Ilhas CpG, as quais podem sofrer regulação através de sua metilação, porém nossos estudos demonstraram que o controle da transcrição de gal-3 nestas células de glioma da linhagem NG97ht não está relacionado à metilação de seu promotor.

Estudos recentes têm demonstrado que a expressão de gal-3 também está condicionada a um fator de transcrição que foi primeiramente identificado durante a diferenciação de condrócitos e tecidos esqueléticos, o RUNX-2 (STOCK *et al.* 2003; HIRAO *et al.* 2006). Vladimirova e colaboradores (2008) realizaram um extenso estudo com as principais linhagens de glioblastoma utilizadas em pesquisas, como as linhagens U251, U373 e A271, e foi demonstrado que o RUNX-2 está relacionado diretamente com a expressão de gal-3 nestas células.

Além disso, é visto que a hipóxia, mais necessariamente HIF-1 α , pode regular positivamente a expressão de RUNX-2 em osteoblastos (LIU *et al.* 2007), porém não existem dados demonstrando correlações diretas entre HIF-1 α , RUNX-2 e gal-3, ou se somente HIF-1 α seria capaz de induzir diretamente a expressão de gal-3.

Apesar da expressão de gal-3 estar relacionada com RUNX-2, também é descrita a existência de tumores que expressam gal-3 e que não demonstram a expressão de RUNX-2 (VLADIMIROVA *et al.* 2008), podendo indicar que existem outros elementos que podem agir de forma multifatorial na indução de gal-3, como o NF- κ B, por exemplo.

2) OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo explorar os papéis pró-tumorais da gal-3 na linhagem de glioma NG97ht, visando torná-la um possível alvo em terapias anti-neoplásicas, entendendo melhor seus mecanismos de expressão em ambientes hipóxicos, além de expandir seu estudo para outras linhagens de glioma, como a T98G, U87MG e U251. Também objetivamos estudar as possíveis funções da gal-3 *in vivo* no desenvolvimento de tumores inoculados em camundongos *nude*.

3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se a indução de expressão de gal-3 em hipóxia é realizada direta/indiretamente por HIF-1 α , avaliando possíveis moléculas intermediárias, como NF- κ B, na linhagem NG97ht;
- Expandir o estudo do papel da gal-3 em outros gliomas, como a linhagem U251, U87MG e T98G, analisando possíveis modulações de expressão desta proteína em ambientes de hipóxia e privação de nutrientes. Também estudamos o efeito do *knockdown* de gal-3 em suas taxas de morte celular nestas mesmas condições, também as correlacionando com o ambiente de pseudopaliçada;
- Analisar possíveis alterações pós-traducionais de gal-3 nestas células de glioma expostas a condições hipóxicas;
- Avaliar a localização celular de gal-3 nestas linhagens de glioma expostas à hipóxia através de microscopia confocal, analisando seu

possível mecanismo de ação a partir de sua compartimentalização celular, como colocalização mitocondrial, por exemplo;

- Analisar as taxas de produção de ROS e vacúolos acídicos nestas linhagens de glioma expostas à hipóxia e privação de nutrientes, avaliando seu possível papel na indução da morte celular;
- Realizar testes de inibição estável de gal-3 em células de linhagens de glioma, inoculando estas células em camundongos *nude* e avaliando possíveis alterações no seu crescimento tumoral.

4) QUADRO EXPERIMENTAL

5) MATERIAL E MÉTODOS

5.1) Cultivo das células

Para a manutenção das células da linhagem NG97ht, elas foram cultivadas em RPMI 1640 e suplementado com 10% de SFB, 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e 24 mM de bicarbonato de sódio em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂ e o repique destas culturas utilizou Tripsina-EDTA (0,05%). Para as células das linhagens U251, U87MG e T98G, a manutenção das células foi realizada em meio DMEM de baixa glicose nas mesmas condições anteriores, com 9,22 mM de HEPES e 44 mM de bicarbonato de sódio.

5.2) Ensaios de exposição à hipóxia mimética através de CoCl₂ 100 µM ou em câmara de hipóxia

Os ensaios foram realizados através de dois métodos distintos: hipóxia mimética através de CoCl₂ 100 µM, exclusivo para a linhagem NG97ht, e em hipóxia (pO₂<1%) através de uma câmara de hipóxia (Billupus-rothenberg – Modular Incubator Chamber, Del Mar, Califórnia, EUA). Nestas câmaras, injetamos um volume de 20 litros de gás por minuto, sendo 19 litros de nitrogênio e 1 litro de CO₂, durante 5 minutos. Ao fim deste período, as câmaras eram seladas através de presilhas e a concentração de oxigênio monitorada em tempo real através de um detector de oxigênio (PAC 3000, Dräger, Alemanha).

A utilização do CoCl₂ como agente químico indutor da hipóxia tem como base suas propriedades descritas na estabilização do HIF-1 α pela inibição de sua ligação com a proteína de Von Hippel-Lindau, agente que induz a

degradação do HIF-1 α 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.

5.3) Extrações proteicas

A extração proteica ocorreu através de um tampão composto de duas soluções diferentes. A primeira solução, tampão A (10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% triton x-100, 1 mM PMSF, 2 μ g/mL de aprotinina, 1 mM Na₃VO₄) foi utilizada para extração de proteínas citoplasmáticas, e o tampão B (50 mM Hepes pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μ g/mL de aprotinina, 1 mM Na₃VO₄) para extração de proteínas nucleares.

Primeiramente, as células utilizadas nos experimentos tiveram seu meio de cultura retirado e foram lavadas em PBS gelado. Logo depois foram adicionados 4 volumes de tampão A, sendo as células soltas através de um *cell scraper* e homogeneizadas através de repipetagem. Estas células lisadas foram incubadas por 15 minutos a 4°C e depois centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e ao *pellet* foi adicionado 1 volume de tampão B. Este *pellet* foi ressuspendido por repipetagem e incubado por 15 minutos a 4°C e depois centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante de proteínas nucleares foi retirado e adicionado ao sobrenadante de proteínas citoplasmáticas anterior.

Alternativamente, outro método de extração proteica foi também utilizado. Descrito por Parry *et al.* (1985), as células foram extraídas em tampão

detergente contendo deoxicolato de sódio (10 mM Tris pH 7,4, 1% triton x-100, 1% deoxicolato de sódio, 1 mM PMSF, 2 µg/mL de aprotinina, 1 mM Na₃VO₄) por 15 minutos a 4°C e centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos. Após esta extração, o sobrenadante foi classificado como de fração total e o *pellet* contendo proteínas de matriz extracelular foi descartado.

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) de acordo com o manual do fabricante. Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas (BioRad) utilizando-se filtros de 592nm.

5.4) Indução da hipóxia *in vitro* e *in vivo* através de pimonidazole – linhagem NG97ht

Células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm (3x10⁴ células) e expostas por 2h à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em privação de SFB e tratadas com pimonidazole 200 µM (Chemicon International, Hypoxyprobe™-1 Kit for the Detection of Tissue Hypoxia).

O cloridrato de pimonidazole é um composto capaz de sofrer redução em ambientes hipóxicos, formando adutos a partir da reação com grupos tiol de proteínas, peptídeos e aminoácidos (CHACON *et al.* 1988; RALEIGH *et al.* 1985; RALEIGH *et al.* 1990; VARGHESE *et al.* 1983), sendo posteriormente reconhecida através de anticorpos específicos para estes adutos.

Ao fim deste período, as células foram fixadas em paraformaldeído 1%, permeabilizadas através de uma solução de triton x-100 0,2% em PBS, bloqueadas com PBS-BSA 5% e incubadas com anticorpo primário anti-adutos

de pimonidazole, sendo o anticorpo secundário Alexa 488 anti-camundongo. A marcação de núcleos foi realizada através de DAPI.

Para a marcação de áreas de hipóxia *in vivo*, animais atômicos (nu/nu) da linhagem C3H, entre 6 e 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da FMUSP e mantidos no Biotério de Experimentação 4 em condições “*Specific Pathogen Free*” (SPF), com água e rações estéreis fornecidas *ad libitum*, sob temperatura constante de 20°C a 25°C. Células da linhagem NG97ht (1×10^6 células/animal) foram injetadas subcutaneamente no dorso destes animais e seu crescimento foi avaliado por cerca de 20 dias. Ao fim deste período, uma solução de pimonidazole em PBS foi injetada intraperitonealmente nos camundongos, em uma concentração de 1,5 mg/25 g de peso de camundongo, como descrito pelo fabricante. Após 60 minutos, os animais eram anestesiados com uma solução de Xilasina 2% (Sedafarm®) e Cloridrato de Cetamina (Vetaset®) na proporção 1:3 (v/v) de quetamina e xilazina, tiveram seus tumores retirados e foram sacrificados através de deslocamento cervical. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (protocolo de pesquisa nº 0993/09).

As massas tumorais foram fixadas em tampão formalina 3,7% por 24h, 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 montadas em resina Permunt e analisadas em microscópio de luz.

Os tumores que apresentavam áreas de pseudopaliçada foram escolhidos para análise imunoistoquímica para adutos de pimonidazole em áreas de pseudopaliçada seguindo o protocolo de acordo com o fabricante.

5.5) Análise por imunofluorescência da expressão de HIF-1 α e gal-3

Cerca de 1×10^4 células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm e expostas a normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em meio completo ou privado de SFB por 48h, como previamente descrito em 5.2. Após este período, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído pH 7,4 por 30 minutos e permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 em PBS. Após o bloqueio com 5% de BSA em PBS, as células foram incubadas com um anticorpo de coelho anti HIF-1 α (GTX 30124) 1:100 ou sobrenadante de cultura do hibridoma M3/38, o qual produz o anticorpo de rato anti-gal-3, *overnight* a 4°C, sendo depois incubada com um anticorpo Alexa 488 cabra anti-coelho ou cabra anti-rato 1:300 por 2h a temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com DAPI e nas células analisadas para expressão de gal-3, também analisamos suas mitocôndrias através de Mitotracker[®] 1:4000 marcado ao fim do experimento por 45 minutos. A análise foi realizada através do microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

5.6) Eletroforese de duas dimensões: análise de alterações pós traducionais de gal-3 na linhagem NG97ht

As células foram plaqueadas em placas redondas de 100 mm ($3,5 \times 10^5$ células, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight* e expostas a normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em privação de SFB por 48h, como descrito no item 5.2. Após esta exposição, as proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo desenvolvido por Parry *et al.* (1985) previamente descrito no item 5.3.

Os extratos proteicos foram quantificados e utilizamos 200 μg de proteína de cada extrato. Estas proteínas tiveram seu volume equilibrado com seu próprio tampão de extração e foram tratados com fosfatase ácida (Roche) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão Pipes 40mM por 30 minutos a 37°C. O controle do tratamento ocorreu através de tampão Pipes 40 mM sem adição de fosfatase ácida.

Para retirar o excesso de íons das amostras, foi realizada precipitação proteica através de acetona 100% gelada por 4h a -20°C. O volume de acetona utilizado foi três vezes o volume de amostra proteica. Após este período de precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm, secas a temperatura ambiente e ressuspensas em tampão de hidratação (uréia 9,8 M, detergente CHAPS 2,45% e azul de bromofenol), sendo posteriormente requantificadas.

As fitas de acrilamida de eletroforese de duas dimensões foram hidratadas por 15h (Immobiline Drystrip 18 cm, pH 3-10 linear, GE Healthcare) em tampão de hidratação, 1,5% de tampão IPG 3-10 e 18 mM de DTT com 186 μg de proteína cada de acordo com as instruções do fabricante. Após este

período, as fitas sofreram focalização em aparato Ettan IPGphor3 *IEF system* (GE Healthcare).

Antes da corrida e separação das proteínas de acordo com sua massa molecular, as fitas foram reduzidas e alquiladas em solução Tris-HCl 50 mM, uréia 6 M, SDS 2%, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (v/v) e DTT 65 mM sob agitação por 20 minutos e por 20 minutos adicionais nesta mesma solução substituindo-se o DTT por iodoacetamida. Finalmente, as fitas foram fixadas em sua posição no gel utilizando-se solução de 0,5% agarose diluída em tampão de corrida (Tris 250 mM, glicina 0,19 mM e SDS 0,1%) e a corrida foi realizada no aparelho Ettan DALT *vertical system* (GE Healthcare). Após a corrida em gel de poliacrilamida 12%, os extratos proteicos separados foram transferidos para a membrana PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, Amersham) para a realização do *blotting*, sendo feita em tampão Tris 25mM, metanol 20% por 1h a 100 V e a 4°C.

As membranas tiveram seus sítios inespecíficos bloqueados com leite seco desnatado 5% em PBS–Tween 0,5% e incubadas com o anticorpo anti gal-3 (clone M3/38) 1:50, sendo depois utilizado o anticorpo secundário anti-rato (Sigma) 1:5000 conjugado com peroxidase. A revelação das membranas foi feita utilizando-se solução contendo Tris 100 mM pH 8,8, luminol 2,5 mM, ácido P-cumárico 2,5 mM e 0,01% H₂O₂30% e pelo método utilizando-se 3,3'-Diaminobenzidine (*DAB*, Sigma), de acordo com as instruções do fabricante

5.7) Purificação de anticorpos através de cromatografia por proteína G

A purificação dos anticorpos para gal-3 provenientes da linhagem monoclonal M3/38 ocorreu através de sua ligação com a proteína G imobilizada

em agarose (Sigma). Primeiramente, cerca de 120 mL de sobrenadante da linhagem M3/38 foram dialisados em tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio pH 7,0). Utilizou-se uma membrana de diálise de retenção de partículas maiores do que 12kDa (SIGMA D-9777), a qual primeiramente foi aquecida a 100°C por cinco minutos em água destilada, sendo depois adicionados os 120 mL de solução de anticorpos, sofrendo diálise por 48h a 4°C, sendo o tampão de ligação renovado a cada 24h. Ao fim deste processo, esta solução dialisada foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm para retirada de material que poderia dificultar o fluxo da coluna de cromatografia e depois purificada na coluna com proteína G.

Para a purificação dos anticorpos, a proteína G foi adicionada ao tampão de ligação, cinco vezes seu volume, centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e colocada em uma coluna de purificação, sendo lavada e empacotada em tampão de ligação, de acordo com as instruções do fabricante, sendo a solução dialisada de anticorpos passada por essa coluna por 24h a 4°C através de uma bomba Minipuls 2 (Gilson).

Depois destas 24h, a coluna foi lavada com tampão de ligação até que sua densidade ótica, analisada através de NanoDrop, ficasse em torno de 0,05 para que a proteína G fosse lavada e não houvesse resquícios de proteínas do sobrenadante.

Depois de lavada, os anticorpos foram eluídos em uma solução de glicina 100 mM pH 2,5, sendo o pH ácido neutralizado com Tris 1 M pH 9,0. Para manutenção da coluna de cromatografia, esta foi lavada com 30 mL de tampão de ligação para neutralização do pH ácido e depois lavado com 10 mL de etanol 70%, seguido de 30 mL de etanol 20% com 0,02% de azida.

Após este processo, os eluídos purificados foram analisados por ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

5.8) Detecção de anticorpos reativos através de ELISA e análise por *western blot* e coloração de proteínas por *Coomassie blue*

A análise dos anticorpos purificados por cromatografia e eluídos foi realizada através do ensaio de ELISA. Neste caso, utilizamos placas de 96 poços sensibilizados com extratos proteicos da linhagem NG97ht.

A sensibilização ocorreu através de 50 µg de proteína por poço diluídos em um tampão carbonato pH 9,6 (NaHCO₃ 70 mM e Na₂CO₃ 30 mM) em um volume final de 100 µL *overnight* a temperatura ambiente.

Após a sensibilização, a placa de ELISA foi lavada duas vezes em tampão PBS-Tween 0,1% e sofreu bloqueio de sítios inespecíficos através de 200 µL de uma solução de PBS com 1% de gelatina por 2h a 37°C. Após este período, a placa foi lavada três vezes em tampão PBS-Tween 0,1% e foram aplicados 100 µL dos anticorpos eluídos em cada poço em monoplicata por 90 minutos a 37°C.

A placa de ELISA foi então lavada três vezes em PBS-Tween 0,1% e foi aplicado o anticorpo secundário anti-rato conjugado a peroxidase (SIGMA A9037) na diluição 1:1000 em PBS-Tween 0,1% gelatina 0,5% por 1h a 37°C, sendo então lavada cinco vezes em PBS-Tween 0,1%.

A revelação do ensaio de ELISA foi realizado através de uma solução de ABTS 0,3 mg/mL em tampão citrato pH 5,0 com 0,7 µL de H₂O₂ a 30% por mL de solução de revelação. A placa de ELISA então foi incubada a 37°C por 30

minutos e sua revelação foi quantificada através de um espectrofotômetro na absorbância de 405 nm.

Para verificar a qualidade da purificação deste anticorpo M3/38, foi realizado um ensaio de *western blot* de um dos purificados, além de sua coloração por *Coomassie blue*.

A análise dos purificados foi realizada através da separação de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE), como previamente descrito. Foram utilizados 10 µg de amostras não purificadas, de material não-unido a coluna de cromatografia e de uma amostra purificada, todas incubadas em tampão redutor.

Em seguida, um gel foi corado por *Coomassie blue* e outro sofreu transferência para uma membrana Hybond C-Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) para a realização do *blotting*, sendo feita em tampão Tris 25 mM, etanol 20% por 1h em aparato de transferência semi-seco (BioRad).

A membrana resultante foi bloqueada em uma solução de PBS-BSA 3% *overnight* a 4°C e incubada com anticorpo secundário anti-rato conjugado com peroxidase 1:3000 (SIGMA A9037) por 1h a temperatura ambiente e revelados com Amersham ECL em filme de revelação Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

5.9) Ligação de anticorpos a sefarose

Os eluídos de anticorpos que demonstraram reatividade nos testes de ELISA foram coletados em um único volume e dialisados por 24h em tampão carbonato (NaHCO₃ 10 mM pH 8,7), sendo depois adicionado NaCl para uma concentração final de 50mM.

Antes de haver incorporação dos anticorpos ao gel de sefarose (*CNBr-activated Sepharose 4B*, GE Healthcare), este último sofreu o seguinte processo: cerca de 0,57g de sefarose foram lavadas com 100 mL de HCl 1 mM por 15 minutos sem a utilização de magnetos para não danificar sua estrutura. Depois foram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e lavado mais uma vez com HCl 1mM. Após esta lavagem, a sefarose foi centrifugada novamente por 1500 rpm por 15 minutos, e teve seu sobrenadante descartado, sendo depois adicionado seu tampão de ligação correspondente (NaHCO₃ 10 mM pH 8,7 com 0,5 M de NaCl) e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos.

Após este processo, os anticorpos foram incorporados a sefarose sob agitação *overnight* a 4°C, sendo depois centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, tendo seu sobrenadante descartado e o excesso de ligantes presentes na sefarose lavados com 5 volumes de tampão de ligação, e depois centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. Após este processo, o bloqueio de grupos ativos na sefarose foi realizado com uma solução de Tris 100mM pH 8,0 por 2h em temperatura ambiente e depois lavado com três ciclos de duas soluções diferentes: acetato de sódio 100 mM pH 4,0/NaCl 0,5 M e Tris 100 mM pH 8,0/NaCl 0,5 M.

Após este processo, a sefarose sofreu empacotamento em coluna de cromatografia através da passagem de tampão de ligação.

5.10) Purificação de gal-3 através de coluna de sefarose de extratos protéicos de células da linhagem NG97ht expostos a normóxia, CoCl₂ e hipóxia

Primeiramente foi realizada a purificação dos extratos proteicos extraídos em tampão A/B. Os extratos em normóxia, CoCl₂ e hipóxia totalizaram cada um cerca de 10mL e para cada um foi adicionado 15 mL de tampão de ligação para aumento de volume para a cromatografia e ajuste de pH para 8,7, sendo depois filtrados em poro de 0,22 µm.

Estes extratos sofreram circulação pela coluna de sefarose *overnight* a 4°C, a qual foi posteriormente lavada com 20 volumes de tampão de ligação. Para a eluição da gal-3 purificada, foram utilizados dois tipos de eluentes, um de pH básico e outro ácido. Primeiramente, foi realizada uma pré-eluição com 10 volumes de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 8, sendo depois utilizado tampão de trietilamina 100 mM pH 11,5, com neutralização dos eluídos com fosfato monobásico 1 M pH 6,8. Após esta eluição, a sefarose sofreu pré-eluição com 10 volumes de tampão fosfato monobásico 10 mM pH 6,8 e posterior eluição com tampão glicina 100 mM pH 2,5, com neutralização dos eluídos com fosfato monobásico 1 M pH 8.

Após a eluição, a sefarose foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação para neutralizar o pH, sendo regenerada com 3 lavagens alternadas de duas soluções diferentes: Tris 100 mM pH 8,5/NaCl 0,5 M e acetato de sódio 100 mM pH 4,0/NaCl 0,5 M, sendo ao final lavado com tampão de ligação.

5.11) Análise dos purificados de galectina-3 através de *western blot*

A análise dos eluidos de gal-3 foi realizada através da separação de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE), como previamente descrito. Parte das amostras foi testada utilizando-se 30µL de cada uma e foram incubadas em tampão redutor e aquecidas a 100°C em banho seco por 5 minutos, sendo posteriormente aplicadas em gel de poliacrilamida.

Em seguida, os extratos protéicos separados foram transferidos para a membrana Hybond C-Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) para a realização do *blotting*, sendo feita em tampão Tris 25 mM/glicina, etanol 20% por 1h em aparato de transferência semi-seco (BioRad).

As membranas resultantes foram bloqueadas em uma solução de PBS-BSA 3% *overnight* a 4°C e incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo M3/38 1:50 em PBS-Tween 0,1% BSA 1%, depois lavadas três vezes em PBS-Tween 0,1%, incubadas com anticorpo secundário anti-rato conjugado com peroxidase 1:3000 (SIGMA A9037) por 1h a temperatura ambiente e revelados com Amersham ECL em filme de revelação Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

5.12) Aplicação das amostras purificadas em gel de acrilamida de uma dimensão

Após a análise dos purificados por *western blot*, os eluídos positivos para gal-3 de cada tratamento foram coletados cada um em um único volume e sofreram diálise contra água destilada para retirada do excesso de sal por 24h a 4°C.

Após este período, os purificados dialisados sofreram precipitação com acetona gelada *overnight* a -20°C , foram centrifugados a 11000 rpm por 30 minutos e ressuspensos em água ultrapura em um volume final de cerca de 80 μL .

Esta gal-3 purificada das condições de normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia foi aplicada em gel de acrilamida SDS-PAGE, como previamente descrito e este gel foi corado com nitrato de prata.

Este gel foi mantido sob agitação *overnight* em temperatura ambiente em solução de fixação (12% ácido acético, 50% etanol, formaldeído 37% 0,5 mL/L), depois lavado três vezes (5, 10 e 15 minutos) em uma solução de 50% de etanol. Depois este gel sofreu um enxágue breve de 15 segundos em uma solução de tiosulfato 0,2 g/L, sendo lavado depois três vezes de 20 segundos em água destilada.

Após estas lavagens, o gel foi incubado em uma solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%, formaldeído 0,75 mL/L) por 20 minutos, seguido de três lavagens em água por 20 segundos. A revelação das proteínas foi realizada com uma solução reveladora (Na_2CO_3 3%, tiosulfato 4 mg/mL, formaldeído 37% 0,5 mL/L) até as bandas de proteínas ficarem evidentes. A interrupção do processo de revelação deu-se pelo descarte da solução reveladora e adição da solução de fixação.

As bandas de proteínas visualizadas foram retiradas cuidadosamente com bisturis, separadas em tubos de 1,5 mL e analisadas por espectrometria de massa.

5.13) Análise dos peptídeos de galectina-3 através de espectrometria de massa

Primeiramente, houve tratamento das amostras para retirada da coloração realizada com nitrato de prata, a qual pode interferir nas análises de espectrometria de massa. As amostras foram tratadas com 50µL de uma solução 15 mM de $K_3(FeCN_6)$ /100 mM de $Na_2S_2O_3$ por 10 minutos a 30°C em agitação a 1400 rpm. As amostras foram então lavadas duas vezes em água ultrapura 10 minutos a 30°C em agitação a 1400 rpm e depois incubadas em tampão bicarbonato de amônia 200 mM 10 minutos a 30°C em agitação a 1400 rpm.

O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL de acetonitrilo puro para desidratação dos géis por 10 minutos a 30°C em agitação a 1400 rpm. Este processo foi repetido até que as amostras apresentassem coloração branca.

Estes géis desidratados foram secos sob ventilação em fluxo laminar e depois tratados com 10 µL de uma solução contendo 0,2 µg de tripsina (Promega, *sequencing grade*) diluída em tampão bicarbonato de amônia 0,66 M para reidratação e digestão dos peptídeos. As amostras foram incubadas a 37°C *overnight* e a digestão foi interrompida com 100µL de uma solução de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em 60% de acetonitrilo por 1h a 30°C e em agitação a 1400 rpm.

O sobrenadante foi guardado para análise e este processo foi repetido mais uma vez. Os 200 µL resultantes foram concentrados através de centrifugação a vácuo e desalinizados através de *microtips* de 10 µL com colunas C18 de fase reversa (OMIX *pippete tips*, Varian).

A eluição dos peptídeos foi realizada com 3 µL de solução de matriz (*cyano-4-hydroxycinnamic acid* em 60% de acetonitrilo com 0,2% de TFA) e aplicados diretamente em placas de amostras do espectrofotômetro 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems) em modo refletor e calibrado com uma mistura de peptídeos padrão (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados sob dissociações induzidas por colisão MS/MS em peptídeos selecionados e depois analisados através do programa Mascot (www.matrixscience.com) e identificados pela base de dados NCBI nr através dos seguintes parâmetros: tolerância de massa monoisotópica, tolerância de fragmento de massa de 0,05 kDa, 0,2 Da de oxidação de metioninas como possível modificação e uma perda permitida de clivagem por tripsina.

5.14) Inibição de NF-κB – linhagem NG97ht

A inibição do NF-κB foi realizada através do composto *dehydroxymethylepoxyquinomicin* (DHMEQ) (DABAGHMANESH *et al.* 2009). Este composto foi desenvolvido pelo professor Dr. Kazuo Umezawa do Departamento de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Kitasato, Japão.

Células da linhagem NG97ht foram expostas em triplicatas a normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em privação de SFB por 24h, como descrito no item 5.2, e tratadas conjuntamente com DMSO, diluente de DHMEQ, e em 5 µg/mL de DHMEQ. Após este tratamento, houve extração do RNAm destas células e foi realizada comparação da expressão gênica de gal-3 através de PCR em tempo real.

Para a extração do RNAm, foi utilizado Trizol[®] (Invitrogen), onde as células foram 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 80µL de clorofórmio (Merck) a cada amostra, as quais foram homogeneizadas por inversão por aproximadamente 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos.

Imediatamente após a transferência, 200 µL de álcool isopropílico (Merck) foram adicionados em cada uma das amostras, que foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante removido e o *pellet* lavado duas vezes com 400µL de etanol 75%.

Após homogeneização em *vortex*, as amostras foram novamente centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C, o *pellet* foi dissolvido em água DEPC (dietilpirocarbonato, Merck), no volume de 10 a 30 µL (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 obtida foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), sendo posteriormente realizada a reação de transcriptase reversa (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante.

Para a reação de transcriptase reversa, 2 µg de RNA total foram acrescentados, 1 µL de oligo dT 500µg/mL (Invitrogen), 1 µL de dNTP mix 10 mM (Invitrogen) e completado para 14 µL 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 µL de tampão *first-strand* 5x (Invitrogen), 1 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1µL 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 (DNA complementar) sintetizado foi estocado a -20°C.

Para a Reação de Polimerase em Cadeia Quantitativa (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 gal-3 (alvo) e da β -actina (normalizador). Para tal, utilizou-se quantidades exponenciais de cDNA em duplicata (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng) em um volume final de 20 µL de reação contendo tampão de reação 1x (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 1 U Taq Platinum (Invitrogen), 10 µM de dNTPs (Invitrogen), 1,5 µM de *primers* para gal-3 murina (senso-5' CCT GGA GCT TAT CCT GGT CA -3', anti-senso-5' GTC ACC ACT GAT CCC CAG TTT -3') e β -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 gal-3 (transcrito alvo) foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador, no caso, a β -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 gal-3;

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

ΔCT alvo: Corresponde à diferença entre o CT de gal-3 obtido para a amostra de referência (controle) e do CT de gal-3 obtido para a amostra em análise (tratado);

ΔCT normalizador: Corresponde à diferença entre o CT da β-actina obtido para a amostra de referência (controle) e do CT da β-actina obtido para a amostra em análise (tratado).

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

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

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.

5.15) Tratamento com cicloheximida – linhagem NG97ht

Células da linhagem NG97ht foram expostas a normóxia, CoCl₂ 100 μM e hipóxia em privação de SFB por 6h em quadruplicata em placas de seis poços, como descrito no item 5.2. Concomitantemente, houve tratamento destas células com o composto cicloheximida, o qual é capaz de inibir a tradução proteica.

As células foram tratadas com DMSO, diluente de cicloheximida, e em duas concentrações de cicloheximida, 5 e 20 μM. Após este tratamento, houve extração do RNAm destas células e foi realizada comparação da expressão gênica de gal-3 através de qRT-PCR, como descrito no item 5.14. Uma alteração deste protocolo foi a utilização do RPLP0 como normalizador da reação (senso-5' TGC CAC ACT CCA TCA TCA AT-3', anti-senso-5' CGA AGA GAC CGA ATC CCA TA -3').

5.16) Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por DHE em células de glioma expostas a hipóxia

As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1×10^5 células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia, CoCl_2 100 μM (somente NG97ht) e hipóxia em meio completo (10%) ou privado (1%) de SFB por 48h. Para assegurar retirada total do SFB dos tratamentos em que há privação deste componente, houve lavagem das células com PBS.

Após estes tratamentos, os níveis de ROS foram determinados através da incubação com 5 μM de diidroetidina (DHE) por 30 minutos a 37°C e protegidos da luz. Após este período de incubação as células foram soltas por tripsinização, centrifugadas a 2700 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 200 μL de PBS e analisadas em aparelho de citometria FACS Calibur.

5.17) Avaliação de vacúolos acídicos através de laranja de acridina

Células das linhagens de glioma foram plaqueadas em triplicata em placas de seis poços (1×10^5 células por poço) de acordo com o item 5.1 e submetidas a normóxia, CoCl_2 100 μM (somente NG97ht) e hipóxia por 48h de acordo com o item 5.2. Antes deste processo, o meio destas células foi trocado por meio novo contendo 10% ou 1% de SFB. Ao fim do experimento, as células tiveram seu meio retirado e foi adicionado laranja de acridina 5 μM em PBS aquecido a 37°C por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após esta incubação, as células foram retiradas por tripsinização e centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS, armazenadas a 4°C e

tiveram a leitura de sua fluorescência realizada em aparelho de citometria FACS Calibur.

5.18) Avaliação da morte celular por Anexina V e iodeto de propídeo na linhagem NG97ht

Células da linhagem NG97ht foram plaqueadas em triplicata em placas de seis poços (1×10^5 células por poço) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células tiveram seu meio trocado e foram expostas a normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em meio completo e privado de SFB por 24h. Após este período, as células foram recuperadas por tripsinização, centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos e ressuspensas em PBS gelado e sofreram marcação e análise por citometria de fluxo de acordo com o protocolo do fabricante (Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa Fluor 488 annexin V and PI for Flow Citometry, Molecular Probes, Invitrogen).

5.19) Ensaio com siRNA anti galectina-3 em linhagem de glioblastoma – NG97ht

As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1×10^5 células por poço) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, o meio foi retirado e as células lavadas com meio OPTIMEM (Gibco, Invitrogen) para retirada total de seu SFB.

Após as lavagens, as células foram incubadas com 100pmols de siRNA anti gal-3 (5' rUrUrU rCrCrU rGrArU rUrArG rUrGrC rUrCrC rArCrC rCrGrC rCrGrC -3'; 5' – rGrGrG rGrGrG rUrGrG rArGrC rAeCrU rArArU rCrArG rGrAAA -3') ou 100nM de siRNA controle em 4 μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

por poço e deixadas por 6h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao fim deste período, as células foram expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM ou hipóxia com meio completo com 10% ou privado com 1% de SFB.

Após 48h, estas células foram retiradas para análise do *knockdown* de gal-3 através de q-RT-PCR, como descrito no item 5.14.

5.20) Exposição das células da linhagem NG97ht a carboidratos para análise da indução de morte através da galectina-3 extracelular na linhagem NG97ht

As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1x10⁵ células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia, CoCl₂ 100µM e hipóxia em meio privado (1%) de SFB por 48h, como previamente descrito, além de sofrerem tratamento com sacarose 200 µM (VETEC), a qual possui baixa afinidade para ligação com a gal-3, Galβ1-4GlcNAc (β1-4) 200 µM, Galβ1-3GlcNAc (β3) 200 µM, carboidratos de alta afinidade com gal-3.

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 FACSCalibur.

Estes carboidratos complexos, β3 e β1-4, foram doados pelo *The Scripps Research Institute*, de San Diego, CA, EUA.

Experimentos com as linhagens humanas de glioblastoma: U251, U87MG e T98G

5.21) Análise da expressão protéica de galectina-3 através de *western blot*

Células destas três linhagens foram mantidas em cultura como previamente descrito em garrafas de 75 cm². Suas proteínas foram extraídas de acordo com o método descrito por Parry *et al.* (1985), item 5.3. Após sua quantificação pelo *kit BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), foram testadas diversas quantidades de proteínas por *western blot* para averiguar o grau de expressão de gal-3 comparando-se com a linhagem NG97ht. Para a linhagem U251, foram utilizados 5, 10, 15 e 20 µg de proteínas e para a linhagem U87MG, 10, 20 e 30µg de proteínas e para a linhagem T98G, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de proteína.

Após quantificação, as proteínas foram incubadas em tampão redutor (120 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% bromofenol blue e 20% glicerol, DTT 5 mM) 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 (250 mM de Tris base, 190 mM de glicina, 1% de SDS), e depois transferidas para membranas de PVDF em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol) a 100 volts por 1h.

As membranas resultantes deste *western blot* tiveram seus sítios inespecíficos bloqueados com leite seco desnatado 5% em PBS–Tween 0,5% e foram incubadas com o anticorpo anti gal-3 (clone M3/38) e anti β-actina (Sigma), sendo depois utilizados os anticorpos secundários anti-rato e anti-camundongo conjugados com peroxidase, respectivamente. A revelação das

membranas foi feita utilizando-se o 3,3'-diaminobenzidine (*DAB*, Sigma) ou através da reação com luminol, sendo revelado através do aparelho ImageQuant LAS 4000.

5.22) Avaliação da indução do RNAm de galectina-3 em células expostas a normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino

As células das linhagens U251, U87MG e T98G foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1×10^5 células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia e hipóxia em meio completo (10%) ou privado (1%) de SFB por 24h e 48h. Para assegurar retirada total do SFB dos tratamentos em que há privação deste componente, houve lavagem das células com PBS.

A extração do RNA total destas células e criação de seu DNA complementar (cDNA) foi realizado de acordo com o item 5.14. Para a análise dos cDNAs houve alteração do par de *primers* para a gal-3 humana (senso-5' AGA CAG TCG GTT TTC CCA TTT -3', anti-senso-5' ACC AGA AAT TCC CAG TTT GCT -3').

A expressão diferencial da gal-3 foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador, no caso, a β -actina. Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001).

5.23) Ensaio de morte celular em hipóxia nas linhagens U251, U87MG e T98G

As células das linhagens U251, U87MG e T98G foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1×10^5 células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia e hipóxia em meio completo (10% SFB) ou privado (1% SFB) de SFB por 24h, 48h e 72h, sendo esta última exposição realizada somente para U251 e U87MG.

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 como descrito no item 5.18.

5.24) Análise da expressão de gal-3 em células da linhagem U87MG expostas a normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino

Células da linhagem U87MG foram plaqueadas em placas de 100mm (8×10^5 células) e expostas a normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de SFB por 48h. Após este período, houve extração proteica destas células através de tampão contendo deoxicolato previamente descrito (item 5.3) e a expressão de gal-3 foi realizada através de western blot, como previamente descrito (item 5.21).

5.25) Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por DHE em células de glioma expostas a hipóxia – U87MG e T98G

As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de seis poços (1×10^5 células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia e hipóxia em meio completo (10%) ou privado (1%) de SFB por 48h. Para assegurar retirada total do SFB dos tratamentos em que há privação deste componente, houve lavagem das células com PBS.

Após estes tratamentos, os níveis de ROS foram determinados através da incubação com 5 μ M de diidroetidina (DHE) por 30 minutos a 37°C e protegidos da luz. Após este período de incubação as células foram soltas por tripsinização, centrifugadas a 2700 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas em aparelho de citometria FACS Calibur.

5.26) Avaliação de vacúolos acídicos através de laranja de acridina em células das linhagem T98G e U87MG

Células das linhagens T98G e U87MG foram plaqueadas em triplicata em placas de seis poços (1×10^5 células por poço) de acordo com o item 5.1 e submetidas à hipóxia por 48h de acordo com o item 5.2.

Antes deste processo, o meio destas células foi trocado por meio novo contendo 10% ou 1% de SFB. Ao fim do experimento, as células tiveram seu meio retirado e foi adicionado laranja de acridina 5 μ M em PBS aquecido a 37°C por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esta incubação, as células foram retiradas por tripsinização e centrifugadas a 2000 rpm por 2

minutos e ressuspensas em 1mL de PBS, armazenadas a 4°C e tiveram a leitura de sua fluorescência realizada em aparelho de citometria FACS Calibur.

5.27) Eletroforese de duas dimensões: análise de alterações pós traducionais de gal-3 na linhagem U87MG

As células da linhagem U87MG foram plaqueadas em placas redondas de 100mm ($3,5 \times 10^5$ células, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight* e expostas a normóxia e hipóxia em privação de SFB por 48h, como descrito no item 5.2. Após esta exposição, as proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo desenvolvido por Parry *et al.* (1985) previamente descrito no item 5.3.

Todos os procedimentos realizados nesta etapa estão de acordo com o item 5.6, a única diferença foi a aplicação de 200 µg de extrato proteico por Immobiline Drystrip 7cm, pH 3-10 linear (GE Healthcare).

Ao fim, as membranas tiveram seus sítios inespecíficos bloqueados com leite seco desnatado 5% em PBS–Tween 0,5% e incubadas com o anticorpo anti gal-3 (clone M3/38), sendo depois utilizado o anticorpo secundário anti-rato (Sigma) conjugado com peroxidase. A revelação das membranas foi feita utilizando-se solução de luminol através do Imagequant LAS 4000 e pelo método utilizando-se 3,3'-diaminobenzidine (*DAB*, Sigma), de acordo com as instruções do fabricante.

5.28) Análise por imunofluorescência da expressão de galectina-3 – U87MG e T98G

Cerca de 1×10^4 células das linhagens U87MG e T98G foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm e expostas a normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de SFB por 48h, como previamente descrito em 5.2. Após este período, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído pH 7,4 por 30 minutos e permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100. Após o bloqueio com 5% de BSA em PBS, as células foram incubadas com sobrenadante de cultura do hibridoma M3/38, o qual produz o anticorpo de rato anti-gal-3, *overnight* a 4°C, sendo depois incubada com um anticorpo anti-rato 1:300 por 2h a temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com DAPI e também analisamos suas mitocôndrias através de Mitotracker® 1:4000 marcado ao fim do experimento por 45 minutos. A análise foi realizada através do microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

5.29) Transdução de células das linhagens U87MG e T87G através de lentivírus contendo shRNA anti-galectina-3 ou controle

As células das linhagens U87MG e T98G foram transduzidas através de lentivírus contendo uma sequência de shRNA para gal-3 (OpenBiosystems, pLKO-shGAL3 Cat. TRC0000029305) em garrafas de cultura de 75cm² e depois selecionadas através de puromicina (0,5 µg/mL para U87MG e 1 µg/mL para T98G). Um shRNA controle contendo uma sequência inespecífica (CCT AAG GTT AAG TCG CCC TCG CTC GAG CGA GGG CGA CTT AAC CTT AGG) foi também transduzido nestas células.

Desta forma, criamos quatro linhagens diferentes de células das linhagens U87MG e T98G. Estas linhagens foram testadas para o *knockdown* estável de gal-3 por análise por *western blot* e qRT-PCR. Para os testes realizando *western blot*, os extratos protéicos foram criados através do protocolo descrito por no item 5.3, utilizando-se os tampões nucleares e citoplasmáticos, e foram utilizados 20µg de cada amostra: parental, *scramble* e shRNA gal-3.

Para o ensaio de qRT-PCR, as células parentais, *scramble* e shRNA gal-3 tiveram seu RNAm extraído em garrafas de cultura de 75 cm² através do método de Trizol[®], tiveram seu cDNA criado e analisadas como previamente descrito (item 5.14).

5.30) Avaliação da morte celular em células *knockdown* para gal-3 das linhagens U87MG e T98G expostas a normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino

Para a análise da morte celular, as células destas duas linhagens transduzidas foram plaqueadas (1×10^5 células por poço, Costar, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e deixadas para adesão *overnight*. Após este período, as células foram expostas a normóxia e hipóxia em meio completo (10%) ou privado (1%) de SFB por 48h.

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 como descrito no item 5.20.

5.31) Inoculação de células tumorais da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para galectina-3 em camundongos nude

Células da linhagem U87MG foram cultivadas de acordo com 5.1, sendo as células transduzidas com lentivírus controle *scramble* e lentivírus com shRNA específico para gal-3 selecionadas com 0,5 µg/mL de puomicina de acordo com 5.29 As células foram contadas em câmara de Neubauer, excluindo-se as células não-viáveis pelo uso de azul de trypan, e 5×10^6 células foram separadas para cada camundongo atímico fêmea (cada grupo com seis camundongos: U87MG parental, U87MG *scramble*, U87MG shRNA). Estas células foram lavadas duas vezes com meio DMEM livre de SFB e ressuspensas em 100µL de meio também livre de soro em tubos de 1,5mL.

Estas células foram inoculadas através de seringas BD Ultra-Fine de 0,25 mm no dorso destes camundongos *nude* e tiveram seu crescimento tumoral monitorado de duas a três vezes por semana. Estes animais atímicos (nu/nu) da linhagem Balb-c, entre 6 e 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério Central da FMUSP e mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Medicina Nuclear em condições de barreira sanitária, com água e rações estéreis fornecidas *ad libitum*, sob temperatura constante de 20°C a 25°C. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP.

O tamanho tumoral foi avaliado através da fórmula:

$$\text{Tamanho do tumor} = d \times d \times D \times 0,52 \text{ cm}^3$$

d= diâmetro menor (em cm) D= diâmetro maior (em cm)

Após atingirem um tamanho de cerca de 1 a 1,4 cm³, os camundongos eram eutanasiados de acordo com o item 5.4, entretanto, um dos experimentos referente aos camundongos inoculados com células U87MG shRNA, os animais foram eutanasiados precocemente com tumores menores ao mesmo tempo em que os animais controle *scramble* foram eutanasiados para comparação tecidual. Os tumores foram retirados e processados para cortes histológicos e análise por hematoxilina/eosina de acordo com o e também por marcação de gal-3 por imunohistoquímica item 5.4.

Para a marcação de gal-3, os cortes histológicos foram desparafinados em banhos sequencias de xilol I, II e III por 10 minutos, seguidos de hidratação em etanol 100%, 80% e 70% por 5 minutos cada. Estes cortes foram lavados por 5 minutos em água e tiveram o bloqueio da peroxidase endógena realizado com H₂O₂ 3% diluído em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo depois lavado em água por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato 10mM pH 6,9 por 3x3 minutos em microondas na potência 80%. Seguiu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos através de PBS-BSA 5% por 1h a temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo primário foi realizado através do anticorpo M3/38 anti gal-3 1:35 feito em rato em PBS-BSA 5% *overnight* a 4°C. O controle foi realizado através de soro de rato diluído em PBS-BSA 5% 1:20. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados 3 vezes por 10 minutos em PBS e incubados em anticorpo secundário anti-rato 1:300 (Sigma) em PBSA-BSA 5% por 1h e 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após esta incubação, os cortes foram lavados 3 vezes por 10 minutos em PBS e depois revelados através de DAB e depois tiveram

os núcleos de suas células corados com hematoxilina e montados em resina Permout.

5.32) Análise da expressão de gal-3 em tumores derivados da inoculação de células tumorais da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 em camundongos nude

Amostras foram retiradas dos tumores derivados da inoculação das células da linhagem U87MG do item anterior e sofreram desagregação tecidual através do aparelho Polytron (Brinkmann Instruments) em 1mL de Trizol. Após esta desagregação, os tubos contendo estas amostras foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C por 5 minutos e o *pellet* foi descartado, sendo o sobrenadante contendo o RNAm processado, seu cDNA sintetizado e analisado de acordo com o item 5.14 Além dos *primers* para gal-3 e β -actina, foram utilizados mais outros dois *primers* referentes a outros dois normalizadores: RPLP0 (proteína acídica ribossomal P0 60S) (senso-5' GGC GAC CTG GAA GTC CAA CT -3', anti-senso-5' CCA TCA GCA CCA CAG CCT TC -3') e TFRC (receptor de transferrina) (senso-5' TGA TCG TGT CAT GAG AGT GGA -3', anti-senso-5' GCA CCG TTA TTT TGT TTA CGC -3').

Para a análise destas amplificações, foi utilizada a média geométrica do resultado da normalização da expressão de gal-3 entre estes três genes de expressão endógena.

5.33) Avaliação da taxa de crescimento celular *in vitro* das células da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para galectina-3

Células da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 foram cultivadas em duplicata, de acordo com o item 5.1, em duas placas de seis poços cada com 5×10^4 células por poço para avaliar a curva de crescimento destas células. Após 24h de adesão, o meio destas células foi trocado por meio completo novo e cada duplicata foi retirada nos seis dias seguintes, havendo nova troca de meio no 4º dia após o plaqueamento.

As células foram soltas por tripsinização e contadas em câmaras de Neubauer utilizando-se azul de trypan para exclusão de células não viáveis.

5.34) Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 4.0 através dos método Two-Way ANOVA. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes se sua probabilidade era menor do que 0,05.

6) RESULTADOS

6.1) Indução de hipóxia em células da linhagem NG97ht através do composto cloridrato de pimonidazole *in vitro* e em células da área de pseudopaliçada *in vivo* em tumores provenientes da inoculação de células da linhagem NG97ht no dorso de camundongos *nude*

Para demonstrar a indução da hipóxia, foi realizada a exposição destas células ao cloridrato de pimonidazole.

Nossos resultados não demonstraram detecção de adutos de pimonidazole em condições de normóxia, porém foram detectados adutos de pimonidazole em células expostas à hipóxia em privação de nutrientes após duas horas de incubação (Fig. 7C). Inesperadamente, encontramos também adutos de pimonidazole em células expostas ao CoCl_2 100 μM (Fig. 7B).

Figura 7 – Células da linhagem NG97ht foram tratadas com pimonidazole 200 μM e expostas a normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em privação de soro fetal bovino por 2h. A. Células expostas a normóxia não demonstraram adutos de pimonidazole, o qual é formado em ambientes com concentração de oxigênio menores do que 14 μM , ou menos do que 10 mmHg, como demonstrado em na figura C, onde as células foram expostas a hipóxia. B. Adutos de pimonidazole foram também identificados em células expostas ao CoCl_2 100 μM . Marcação de núcleo através de DAPI, (D) normóxia, (E) CoCl_2 100 μM , (F) hipóxia (Barra de escala: 20 μm).

Além dos testes *in vitro*, também realizamos testes para imunomarcação de adutos de pimonidazole *in vivo* em camundongos *nude* inoculados dorsalmente com 1×10^6 células da linhagem NG97ht.

Nossos resultados demonstraram ampla marcação para adutos de pimonidazole somente em áreas de pseudopaliçada (Fig. 8, setas) e uma menor marcação esparsa dentro de regiões necróticas (*).

Figura 8 – 1×10^6 células da linhagem NG97ht foram inoculadas no dorso de animais *nude* e acompanhados por 21 dias. Ao fim deste período, os animais sofreram injeção intraperitoneal de uma solução de pimonidazole 100 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, sendo eutanasiados 1h depois. Os tumores retirados foram submetidos a cortes histológicos e imunomarcação para análise de adutos de pimonidazole. A. Houve marcação para estes adutos somente em células de áreas de pseudopaliçada (setas) e de forma esparsa em células dentro de áreas necróticas (asterisco). B. Controle da reação corado com hematoxilina.

6.2) Acúmulo de HIF-1 α nuclear após 48h de exposição ao CoCl₂ 100 μ M e hipóxia quando comparadas à normóxia em células da linhagem NG97ht

Um dos fatores mediadores mais importante da hipóxia, HIF-1 α , foi analisado por imunofluorescência em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 μ M e hipóxia em meio privado de SFB a fim de se verificar seu possível acúmulo nuclear em condições de hipóxia, ou se seria possível sua acumulação mesmo em condições de normóxia (Fig. 9).

Os resultados demonstraram que HIF-1 α está agindo em sua forma clássica nestas células, onde células em normóxia apresentaram este fator de transcrição principalmente em seu citoplasma, enquanto que em células expostas ao CoCl₂ 100 μ M e hipóxia houve acúmulo de HIF-1 α no núcleo. Estes dados indicam sua função descrita na literatura, onde há acúmulo desta proteína em baixas concentrações de oxigênio, sendo subsequentemente translocada para o núcleo, onde dimeriza-se com HIF-1 β , podendo induzir diversos genes, entre eles, a gal-3 (KADROFSKE *et al.* 1998).

Figura 9 – Ensaio de imunofluorescência para HIF-1α em células da linhagem de glioma híbrido NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 μM e hipóxia por 48h em privação de soro fetal bovino (1%). Normóxia: marcação para HIF-1α de forma regular por toda a célula. CoCl₂ 100 μM e hipóxia: marcação predominantemente nuclear. Marcação de núcleos através de DAPI (Barra de escala: 20μm).

6.3) Distribuição de gal-3 citoplasmática e nuclear e colocalização com mitocôndrias em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia e hipóxia, além de agregação de mitocôndrias em CoCl₂

A exposição das células da linhagem NG97ht à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em meio completo ou privado de SFB (Figuras 10 a 15) demonstrou tanto alterações na localização de gal-3 (verde) quanto na distribuição de mitocôndrias (vermelho) nestas células.

Em normóxia, as células apresentaram gal-3 tanto no núcleo como no citoplasma, sem demonstrar acúmulo diferencial nestes dois compartimentos celulares (Fig. 10 e 11) e houve co-localização com mitocôndrias demonstrada por microscopia confocal.

Em CoCl₂, a distribuição de gal-3 continuou sendo tanto citoplasmática quanto nuclear, porém as mitocôndrias apresentaram-se agregadas, granulares e com maior fluorescência e não houve colocalização destas organelas com a gal-3 (Fig. 12 e 13).

Em hipóxia, a distribuição de gal-3 apresentou-se semelhante ao encontrado em normóxia (Fig. 14 e 15), porém com aumento da gal-3 nuclear, além de demonstrar co-localização de gal-3 com as mitocôndrias. Também foi possível visualizar o aumento de vacúolos dentro das células expostas à hipóxia em meio completo (Fig. 14).

Figura 10 – Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas a normóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Há distribuição tanto citoplasmática quanto nuclear de gal-3, além de apresentar co-localização com mitocôndrias nestas células. Figura no topo a direita: controle negativo do anticorpo secundário marcado com DAPI e Mitotracker® (Barra de escala: 10 μm).

Figura 11 – Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas à normóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). A alteração da concentração de soro fetal bovino não causou alterações aparentes na distribuição de gal-3 nestas células em comparação com células em normóxia em 10% de soro fetal bovino. Há marcação tanto citoplasmática quanto nuclear de gal-3 e co-localização com mitocôndrias (Barra de escala: 10 µm).

Figura 12 - Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas ao CoCl_2 100 µm em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Marcação de gal-3 tanto citoplasmática quanto nuclear nestas células. Exposição ao CoCl_2 induziu aparente agregação mitocondrial e não houve co-localização de gal-3 com mitocôndrias (Barra de escala: 10 µm).

Figura 13 - Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas ao CoCl_2 100 µm em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Marcação de gal-3 tanto citoplasmática quanto nuclear nestas células, porém com aumento desta proteína no núcleo. Exposição ao CoCl_2 induziu aparente agregação mitocondrial e não houve co-localização de gal-3 com mitocôndrias (Barra de escala: 10 µm).

Figura 14 - Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas à hipóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Marcação para gal-3 tanto citoplasmática quanto nuclear, porém mais concentrada neste último compartimento nestas células e aparente co-localização de gal-3 com mitocôndrias. Também foi possível visualizar aumento de vacúolos citoplasmáticos nestas células em hipóxia (Barra de escala: 10 μ m).

Figura 15 - Imunofluorescência de células da linhagem NG97ht expostas à hipóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Marcação para gal-3 tanto citoplasmática quanto nuclear nestas células, com aparente aumento neste último compartimento celular, e co-localização de gal-3 com mitocôndrias (Barra de escala: 10 µm).

6.4) É necessário que haja indução prévia de fatores intermediários para a indução de gal-3 em células da linhagem NG97ht expostas ao CoCl_2 e hipóxia em privação de soro fetal bovino

A fim de avaliarmos se os fatores necessários para indução de gal-3 estão previamente presentes nas células da linhagem NG97ht antes da exposição ao CoCl_2 e à hipóxia, realizamos o tratamento destas células com cicloheximida (CHX), um composto capaz de inibir a tradução proteica.

Estes nossos estudos demonstraram que a exposição destas células à CHX, tanto em 5 μM e 20 μM , inibiu a indução de gal-3, tanto em CoCl_2 quanto em hipóxia em privação de SFB (Fig. 16) no período analisado de 6 horas.

qRT-PCR para gal-3 sob tratamento de CHX - 6h 1% SFB

Figura 16 – Análise da indução gênica de gal-3 através de qRT-PCR em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em privação de soro fetal bovino e tratadas com DMSO, cicloheximida (CHX) 5 μM e 20 μM por 6h. Houve indução significativa de gal-3 em células expostas ao CoCl_2 e à hipóxia em comparação com células em normóxia no grupo tratado com DMSO, porém isto não foi demonstrado em células tratadas com CHX (5 μM e 20 μM). Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.5) Indução de gal-3 em células da linhagem NG97ht dependente do fator de transcrição NF- κ B em células expostas ao CoCl₂ e parcialmente dependente em células expostas à hipóxia e em privação de soro fetal bovino

Continuando os estudos envolvendo possíveis indutores de gal-3, realizamos a exposição das células da linhagem NG97ht à normóxia, CoCl₂ e hipóxia, tratando estas células com o composto *dehydroxymethylepoxyquinomicin* (DHMEQ), inibidor químico de NF- κ B.

Nossos resultados demonstraram participação do NF- κ B na indução gênica de gal-3, principalmente em CoCl₂, indicando dependência deste fator de transcrição. Quanto às células expostas à hipóxia, vimos que o NF- κ B foi parcialmente responsável pela indução de gal-3 nas células desta linhagem (Fig. 17).

Figura 17 – Células da linhagem NG97ht foram expostas à normóxia, CoCl₂ 100 μM e à hipóxia em privação de soro fetal bovino e tratadas com DHMEQ 5 μM por 24h. A análise da indução do RNAm de gal-3 através de qRT-PCR demonstrou aumento do RNAm deste gene em células expostas ao CoCl₂ e à hipóxia em comparação com a exposição à normóxia em tratamento com DMSO, porém houve diminuição total desta indução em células expostas ao CoCl₂ e diminuição parcial em células expostas à hipóxia e tratadas com DHMEQ 5 μM em comparação com células em normóxia. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média±SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, ***p<0,001.

6.6) Exposição de células da linhagem NG97ht à hipóxia e CoCl_2 aumentam formas de ponto isoelétrico mais básico de gal-3 em comparação com células expostas à normóxia

A análise dos extratos proteicos de células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl_2 e hipóxia em privação de SFB através de eletroforese de duas dimensões revelou diversas formas proteicas de gal-3 (Fig. 18).

Estas formas foram denominadas de A a F de acordo com seu ponto isoelétrico (PI), sendo a forma A de PI mais baixo e F de PI mais alto. Além disso, as formas E e F são compostas de duas bandas de mesmo PI, porém de pesos diferentes.

As análises dos PIs dos pontos acima citados demonstraram que em tratamentos com fosfatase ácida, há aumento da distância entre as formas D e E, com consequente aumento nos PIs das formas E e F em células expostas à normóxia e ao CoCl_2 , porém não em células expostas à hipóxia, onde o PI destes pontos ficou inalterado.

Também foi possível notar o aumento do ponto B, de menor peso molecular, em todos os tratamentos com fosfatase ácida, porém não houve controle de massa nestes experimentos.

Normóxia (PI)

A: 7,42
B: 8,0
C: 8,12
D: 8,36
E: 8,98
F: 9,19

Normóxia - fosfatase ácida (PI)

A: não encontrada
B: 8,0
C: 8,12
D: 8,36
E: 9,12
F: 9,33

Cloreto cobaltoso (PI)

A: 7,42
B: 8,07
C: 8,17
D: 8,40
E: 9,08
F: 9,31

Cloreto cobaltoso - fosfatase ácida (PI)

A: não encontrada
B: 8,07
C: 8,17
D: 8,40
E: 9,17
F: 9,40

Figura 18 – Análise de gal-3 através de eletroforese de duas dimensões dos extratos proteicos de células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia em privação de soro fetal bovino por 48h. Os extratos proteicos foram também tratados com fosfatase ácida (100 $\mu\text{g/mL}$) para análise de possíveis alterações pós traducionais como a fosforilação. Foram encontradas seis formas principais de gal-3, sendo denominadas de A a F de acordo com seu ponto isoelétrico (PI). Nota-se que as formas E e F são compostas de duas bandas de mesmo PI, porém de pesos diferentes. Ao lado das figuras, encontra-se o PI de cada um destes pontos analisados.

6.7) Células da linhagem NG97ht expressam duas isoformas de gal-3 – alteração em um aminoácido na porção C-terminal (glicina 252 para arginina)

Os estudos realizados no Instituto Pasteur de Montevideo demonstraram por espectrometria de massa que a linhagem NG97ht apresentou duas isoformas de gal-3 que diferiram em um aminoácido em sua região C-terminal (glicina 252 para arginina) (Quadro 1).

A	Massa nominal (M_r): 27498 ; Valor do PI calculado: 8.46				
1	MADSFSLNDA	LAGSGNPNPQ	GYPGAWGNQP	GAGGYPGAAY	PGAYPGQAPP
51	GAYPGQAPPG	AYPGQAPPSA	YPGPTAPGAY	PGPTAPGAYP	GQPAPGAFPG
101	QPGAPGAYPQ	CSGGYPAAGP	YGVPAGPLTV	PYDLPLPGGV	MPR MLITIMG
151	TVKPNANRIV	LDFFRGNDVA	FHFNPRFNEN	NRRVIVCNTK	QDNNWGKEER
201	QSAFPFESGK	PFKIQVLVEA	DHFKVAVNDA	HLLQYNHRMK	NLREISQLGI
251	SGDITLTSAN	HAMI			

B	Massa nominal (M_r): 27551 ; Valor do PI calculado: 9.02				
1	RDSFSLNDAL	AGSGNPNPQG	YPGAWGNQPG	AGGYPGAAYP	GAYPGQAPPG
51	AYPGQAPPGA	YPGQAPPSAY	PGPTAPGAYP	GPTAPGAYPG	QPAPGAFPGQ
101	PGAPGAYPQC	SGGYPAAGPY	GVPAGPLTVP	YDLPLPGGVM	PRMLITIMGT
151	VKPNANR IVL	DFRRGNDVAF	HFNPRFNENN	RRVIVCNTKQ	DNNWGKEER Q
201	SAFPFESGKP	FKIQVLVEAD	HFKVAVNDAH	LLQYNHRMKN	LR EISQLGIS
251	RDITLTSANH	AMI			

Quadro 1 – Análise da proteína de gal-3 por espectrometria de massa utilizando o aparelho de espectrometria 4800 Maldi-TOF/TOF. Expressão de duas formas diferentes de gal-3, onde uma apresenta uma glicina na posição 252 (A), enquanto a outra apresenta uma arginina (B). Esta alteração geraria duas formas de massa similar, porém de pontos isoelétricos diferentes (A- 8,46 e B- 9,02). Em vermelho: aminoácidos de gal-3 identificados por espectrometria de massa.

A técnica de extração de peptídeos do gel de acrilamida, a qual utiliza tripsina, não foi adequada para a clivagem dos 150 primeiros aminoácidos da gal-3, impedindo sua análise total.

6.8) Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio detectados por DHE 5 μ M (diidroetidina) e vacúolos acídicos por laranja de acridina (5 μ M) em células da linhagem NG97ht expostas ao CoCl_2 100 μ M e hipóxia em comparação com a normóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 48h

Os estudos deste trabalho envolvendo a análise da produção de ROS por DHE em células da linhagem NG97ht demonstraram que em comparação com a situação controle, normóxia, houve indução da produção de ROS em células expostas à hipóxia e CoCl_2 , tanto em meio completo e privado de SFB (Fig. 19A).

A avaliação de vacúolos acídicos por laranja de acridina também demonstrou aumento destes compartimentos celulares em células expostas à hipóxia e CoCl_2 em comparação com a normóxia, tanto em meio completo ou privado de SFB (Fig. 19B).

Figura 19 – Avaliação por citometria de fluxo da produção de espécies reativas de oxigênio através de DHE 5 µM (diidroetidina) (A) e vacúolos ácidoicos por laranja de acridina 5 µM (B) em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia por 48h, em meio completo ou privado de soro fetal bovino. Estes experimentos demonstraram aumento de espécies reativas e de vacúolos ácidoicos em células expostas à hipóxia e CoCl₂ em comparação com a normóxia tanto em meio completo ou privado de soro fetal bovino. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média±SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

6.9) A morte induzida por privação de oxigênio e nutrientes apresenta caráter necrótico, e não apoptótico, na linhagem NG97ht

A avaliação da morte celular através de Anexina V conjugado com o marcador Alexa-Fluor 488 e iodeto de propídeo por citometria de fluxo na linhagem NG97ht demonstrou que a morte induzida em privação de oxigênio e nutrientes é por necrose celular no período analisado de 24h (Fig. 20) (positividade de células no quadro superior direito, dupla marcação Anexina V e iodeto de propídeo) e não por apoptose (ausência de células no quadro inferior direito, Anexina V)

A análise dos tratamentos em normóxia e CoCl_2 em privação de nutrientes mostrou resultado semelhante ao encontrado em hipóxia, de modo que estas células também apresentaram morte celular de característica necrótica.

Figura 20 – Análise por citometria de fluxo da morte celular por Anexina V conjugado com Alexa-Fluor 488 e iodeto de propídeo em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 24h (eixo Y: PI; eixo X: Anexina V). A avaliação da morte celular não demonstrou indução da apoptose nestas células avaliadas, somente encontrando a marcação conjunta de Anexina V e iodeto de propídeo, caracterizando a morte como necrose celular, no tempo avaliado de 24h em todos os tratamentos. Os valores indicados no quadro superior direito indicam a média da porcentagem de morte dos experimentos realizados em triplicata.

6.10) Avaliação do *knockdown* do RNAm de gal-3 em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino durante o tratamento com siRNA específico para galectina-3 por 48h

Além de realizarmos o *knockdown* protéico de gal-3 através de ensaios de *western blot*, também realizamos a análise do *knockdown* do RNAm de gal-3.

Células da linhagem NG97ht foram tratadas com siRNA controle ou específico para gal-3 por 6h sendo posteriormente expostas à normóxia, CoCl₂ 100 µM e hipóxia em meio completo ou privado de SFB por 42h. A análise do *knockdown* de gal-3 foi realizada através de qRT-PCR e demonstrou diminuição da quantidade de RNAm para gal-3 em todos os tratamentos realizados (Fig. 21).

Figura 21 – Avaliação do *knockdown* de gal-3 em células da linhagem NG97ht expostas à normóxia (N), CoCl₂ 100 μM (C) e hipóxia (H) em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 42h, sendo tratadas com 100nM de siRNA controle ou específico para gal-3. Houve diminuição da expressão de gal-3 em todos os tratamentos realizados com siRNA para gal-3. A análise da expressão de gal-3 dos tratamentos realizados com siRNA controle em CoCl₂ e hipóxia foi realizada em comparação com células em normóxia e o *knockdown* foi realizado em comparação com cada tratamento controle de siRNA. O RNAm de β-actina foi utilizado com normalizador.

6.11) A gal-3 extracelular possui pouco papel na indução da morte de células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia por 48h em meio privado de soro fetal bovino

A fim de avaliar um possível papel da gal-3 exógena na indução da morte de células da linhagem NG97ht durante a exposição ao CoCl_2 e à hipóxia, realizamos o tratamento destas células utilizando carboidratos que possuem alta afinidade de ligação com gal-3. Os carboidratos de alta ligação utilizados foram o $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ ($\beta 1\text{-4}$) e $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAcb}$ ($\beta 3$), além da sacarose utilizada como controle da adição de carboidratos, pois possui baixa afinidade para gal-3.

Nossos resultados não demonstraram alterações no perfil de morte celular em normóxia (Fig. 22), porém houve menor morte destas células durante a exposição ao CoCl_2 e à hipóxia em células tratadas com $\beta 1\text{-4}$ em comparação com o controle utilizando-se sacarose ($p < 0,05$). Além disso, células expostas ao carboidrato $\beta 3$ demonstraram menores taxas de morte celular durante a exposição à hipóxia em comparação com células tratadas com sacarose.

Análise de morte celular - 48h 1% SFB

Figura 22 – Avaliação das taxas de morte celular da linhagem NG97ht exposta à normóxia, CoCl_2 100 μM e hipóxia e tratada com sacarose 200 μM , $\beta 3$ (Gal $\beta 1$ -3GlcNAc β -Sp) 200 μM e $\beta 1$ -4 (Gal $\beta 1$ -4GlcNAc β -Sp) 200 μM por 48h e em privação de soro fetal bovino. A análise de morte celular realizada por citometria de fluxo tendo como parâmetro a incorporação de iodeto de propídeo por estas células não demonstrou alterações significativas em células em normóxia. Células expostas ao CoCl_2 e à hipóxia demonstraram menores taxas de morte celular em tratamentos com o carboidrato $\beta 1$ -4 em comparação com o carboidrato controle sacarose. Em hipóxia, o carboidrato $\beta 3$ e $\beta 1$ -4 demonstrou menores taxas de morte celular em relação ao carboidrato controle sacarose. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Análises estatísticas foram realizadas através do método *Two-Way ANOVA*, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Linhagens de glioblastoma U251, U87MG e T98G

Realizamos ensaios com linhagens humanas de glioblastoma, U251, U87MG e T98G a fim de avaliar o papel da gal-3 nestas células e sua resposta a morte celular perante a privação de oxigênio e nutrientes.

Primeiramente, analisamos o perfil de expressão de gal-3 em condições de normóxia em diferentes concentrações protéicas.

6.12) Expressão protéica de galectina-3 em células das linhagens U251, U87MG e T98G

A avaliação da expressão protéica de gal-3 na linhagem U251 demonstrou baixa expressão desta proteína quando comparada com a linhagem NG97ht (Fig. 23A). Em relação à linhagem U87MG (Fig. 23B), observou-se expressão mais elevada de gal-3, porém ainda assim menor que a observada pela linhagem NG97ht. Em relação à linhagem T98G, esta expressa uma quantidade de gal-3 intermediária em comparação com as outras duas linhagens de glioma humano (Fig. 23C).

Além disso, podemos visualizar a diferença na massa molecular aparente de gal-3 da linhagem NG97ht, que expressa esta proteína a partir de seu genoma murino, e a gal-3 das linhagens humanas U251, U87MG e T98G.

Figura 23 – Avaliação da expressão de galectina-3 em extratos protéicos de células das linhagens U251 (A), U87MG (B) e T98G (C) comparadas com a linhagem NG97ht. Controle de carregamento de proteínas realizado por β -actina.

6.13) Avaliação da indução de gal-3 em células de glioblastoma das linhagens U251, U87MG e T98G expostas à hipóxia *in vitro* em meio completo ou privado de soro fetal bovino

Primeiramente, avaliamos o perfil de resposta da indução do RNAm de gal-3 das células da linhagem U251, U87MG e T98G durante a exposição à hipóxia, tanto em meio completo ou privado de SFB, no período de 24h e 48h.

Nossos resultados demonstraram resposta positiva para indução de gal-3 em células da linhagem U251 somente em hipóxia e meio completo durante a exposição realizada por 48h (Fig. 24A), não havendo diferenças estatísticas nos outros períodos e condições realizadas.

Em relação à linhagem U87MG, observamos um perfil mais concreto de indução da transcrição de gal-3 (Fig. 24C e D). Houve aumento significativo do RNAm de gal-3 em células expostas à hipóxia em meio completo por 48h e em hipóxia e em privação de SFB tanto em 24h como em 48h.

Em relação à linhagem T98G, esta não demonstrou aumento de gal-3 em 24h tanto em meio completo ou privado de SFB em hipóxia, além de demonstrar uma tendência de diminuição de gal-3 em 48h, nas duas situações em hipóxia (Fig. 24E e F).

Figura 24 – Avaliação da indução do RNAm de gal-3 em células da linhagem U251, U87MG e T98G expostas à normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino. Exposição realizada por 24h e 48h e analisada através de qRT-PCR. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média±SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.14) Avaliação das taxas de morte de células de linhagens de glioblastoma U251, U87MG e T98G expostas à hipóxia *in vitro* em meio completo ou privado de soro fetal bovino

A exposição das células das linhagens U251, U87MG e T98G (Fig. 25) à hipóxia demonstrou algumas diferenças entre estas três linhagens. A linhagem U251 (Fig. 25A e B) apresentou resistência para a morte induzida somente pela hipóxia em meio completo, demonstrando aumento em suas taxas de morte somente 72h após sua exposição, porém a privação de oxigênio e SFB demonstraram aumento das taxas de morte em relação ao controle no primeiro período analisado de 24h, mantendo-se em períodos subsequentes de 48 e 72h.

Em relação à linhagem U87MG (Fig. 25C e D), a exposição à hipóxia em meio completo não demonstrou afetar as taxas de morte destas células durante o período analisado de 72h. Em relação à exposição destas células a privação de oxigênio e SFB, também houve resistência para indução de morte, somente demonstrando aumento destas taxas a partir de 72h de exposição.

A linhagem T98G demonstrou ser sensível para a morte induzida por hipóxia, o que é demonstrado pelo aumento da morte celular em hipóxia e meio completo, o qual se encontra aumentado quando as células são expostas a privação de SFB (nesta linhagem não foi realizado ensaio de morte até 72h, somente até 48h) (Fig. 25E e F).

Ao fim destes testes, decidimos utilizar as células das linhagens U87MG e T98G, as quais apresentam maior quantidade de expressão de gal-3, porém demonstraram diferenças na indução de gal-3 em hipóxia, sendo a primeira linhagem aparentemente responsiva a este estímulo.

Figura 25 – Avaliação da morte celular através da incorporação de iodeto de propídeo em células das linhagens U251, U87MG e T98G expostas à normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 24, 48 e 72h (menos para T98G) em triplicatas. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média±SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

6.15) Indução da expressão de gal-3 em privação de nutrientes na linhagem U87MG

Após a análise do RNAm das linhagens de glioblastoma humano, decidiu-se analisar a expressão proteica de gal-3 na linhagem U87MG, a qual se demonstrou responsiva ao estímulo da hipóxia em relação à indução do RNAm de gal-3.

Os testes realizados com extratos protéicos de células expostas à normóxia e hipóxia, tanto com alta e baixa concentração de nutrientes (Fig. 26) demonstrou indução de gal-3 em condições de privação de nutrientes, sendo mais acentuada quando concomitante à hipóxia, como visto no ensaio de 48h para análise do RNAm.

Figura 26 – Análise da expressão protéica da gal-3 em células da linhagem U87MG expostas à normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 48h. Indução da expressão de gal-3 em privação de soro fetal bovino, tanto em normóxia quanto hipóxia, porém maior nesta última condição. Controle do carregamento de proteínas por análise da β-actina. Experimento realizado três vezes de forma independente em monoplicata.

6.16) Avaliação da localização subcelular de gal-3 nas linhagens T98G e U87MG através de imunofluorescência e análise por microscopia confocal

A análise das células da linhagem T98G expostas à normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de SFB demonstrou distribuição tanto citoplasmática quanto nuclear de gal-3 (verde), e um crescimento celular em forma de colônias (Fig. 27 a 30).

Foi detectada baixa co-localização de gal-3 com mitocôndrias (vermelho) nestas células nos experimentos realizados. Além disso, visualizamos um aumento da gal-3 nuclear em hipóxia (Fig. 29 e 30).

Em relação às células da linhagem U87MG, estas apresentaram gal-3 tanto citoplasmática quanto nuclear, porém em maior concentração neste último compartimento celular, além de também demonstrarem co-localização mitocondrial (Fig. 31 a 34). É possível notar que em hipóxia e privação de nutrientes, as mitocôndrias nestas células apresentaram-se mais reticuladas e com maior intensidade de fluorescência (Fig. 34) do que em comparação com as outras condições.

T98G Normóxia 10% SFB

Figura 27 – Imunofluorescência de células da linhagem T98G expostas à normóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Células apresentaram expressão tanto citoplasmática quanto nuclear de gal-3, além de apresentarem co-localização com mitocôndrias. Figura no topo a direita: controle negativo do anticorpo secundário marcado com DAPI e Mitotracker® (Barra de escala: 10 μM).

T98G Normóxia 1% SFB

Figura 28 – Imunofluorescência de células da linhagem T98G expostas à normóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). A privação de nutrientes em normóxia não apresentou diferenças de localização em relação a células expostas à normóxia em meio completo, demonstrando expressão tanto citoplasmática quanto nuclear de gal-3 (Barra de escala: 10 μM).

T98G Hipóxia 10% SFB

Figura 29 – Imunofluorescência de células da linhagem T98G expostas à hipóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). A exposição à hipóxia em meio completo pareceu demonstrar a presença de gal-3 nuclear em relação a citoplasmática, além de demonstrar co-localização com mitocôndrias (Barra de escala: 10 μM).

T98G Hipóxia 1% SFB

Figura 30 – Imunofluorescência de células da linhagem T98G expostas à hipóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Resultado semelhante ao encontrado durante a exposição à hipóxia em meio completo. Aparente aumento de gal-3 e acúmulo desta proteína no núcleo destas células, além de demonstrar co-localização com mitocôndrias (Barra de escala: 10 µM).

U87MG Normóxia 10% SFB

Figura 31 – Imunofluorescência de células da linhagem U87MG expostas à normóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Estas células apresentaram gal-3 tanto no citoplasma quanto no núcleo, com maior aumento neste último compartimento celular. Houve aparente co-localização mitocondrial de gal-3. Figura no topo a direita: controle negativo do anticorpo secundário marcado com DAPI e Mitotracker® (Barra de escala: 10 μM).

U87MG Normóxia 1% SFB

Figura 32 – Imunofluorescência de células da linhagem U87MG expostas à normóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). A exposição destas células à normóxia e privação de soro fetal bovino demonstrou gal-3 predominantemente nuclear e com co-localização mitocondrial no citoplasma (Barra de escala: 10 μM).

U87MG Hipóxia 10% SFB

Figura 33 – Imunofluorescência de células da linhagem U87MG expostas à hipóxia em 10% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). A exposição destas células à hipóxia demonstrou alterações na localização sub-celular de gal-3, com maior expressão de gal-3 nuclear comparado com a normóxia, além de demonstrar co-localização mitocondrial de gal-3 (Barra de escala: 10 µM)

U87MG Hipóxia 1% SFB

Figura 34 – Imunofluorescência de células da linhagem U87MG expostas à hipóxia em 1% de soro fetal bovino por 48h e analisadas por microscopia confocal para marcação nuclear (DAPI, azul), mitocôndrias (Mitotracker®, vermelho) e gal-3 (M3/38 rato anti-gal-3 e Alexa 488 cabra anti-rato, verde). Compartimentalização de gal-3 aumentada no núcleo em relação à normóxia em meio completo, além de demonstrar co-localização mitocondrial e mitocôndrias com padrão reticular/granular e com maior fluorescência nestas células (Barra de escala: 10 μM).

6.17) A gal-3 apresenta alterações pós-traducionais em normóxia que são sensíveis a fosfatase ácida em células da linhagem U87MG

A análise da proteína de gal-3 por eletroforese de duas dimensões de células da linhagem U87MG expostas por 48h à normóxia e hipóxia em privação de SFB demonstrou cerca de 5 formas diferentes desta proteína, com diferentes PIs entre 7 e 9 (Fig. 35). Foram observadas alterações nestes PIs de gal-3 entre os tratamentos em normóxia e hipóxia, onde os pontos C e D apresentam PI mais básico em hipóxia.

O tratamento destes extratos com fosfatase ácida 100µg/mL demonstrou alterações significantes na gal-3 nos extratos de células expostas à normóxia, porém sendo pouco efetivo em hipóxia. Aparentemente em normóxia temos mais alterações pós-traducionais de gal-3 que são sensíveis a fosfatase ácida, indicando que nestas condições, a gal-3 sofre mais fosforilações, e que em hipóxia, estas alterações encontradas em seu PI são mais resistentes a este tratamento enzimático.

Figura 35 – Análise por eletroforese de duas dimensões em extratos protéicos de células da linhagem U87MG expostas à normóxia e hipóxia em privação de soro fetal bovino, tanto tratadas com tampão pipes (controle) quanto por fosfatase ácida 100 $\mu\text{g/mL}$. Foram encontradas 5 formas principais de gal-3 com pontos isoelétricos diferentes, sendo o padrão destas formas diferentes para normóxia e hipóxia. A gal-3 de extratos protéicos de normóxia demonstrou-se mais sensível ao tratamento com fosfatase ácida do que os extratos de células em hipóxia, indicando que nesta primeira condição, a gal-3 pode sofrer alterações pós-traducionais como a fosforilação, por exemplo.

6.18) Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio detectado por DHE 5 μ M (diidroetidina) e vacúolos acídicos por laranja de acridina (5 μ M) em células das linhagens U87MG e T98G expostas à hipóxia em comparação com a normóxia

A análise da indução de ROS por DHE 5 μ M em citometria de fluxo na linhagem U87MG demonstrou aumento somente quando as células foram expostas a privação de oxigênio e nutrientes (Fig. 36A), porém na linhagem T98G (Fig. 36B), houve aumento em hipóxia tanto em meio completo ou privado de SFB.

Quanto à produção de vacúolos acídicos, foi observado que a hipóxia *per se* é capaz de induzir estes vacúolos em ambas as linhagens (Fig. 36C e D), a qual se demonstra acentuada durante a privação de SFB.

Figura 36 – Avaliação por citometria de fluxo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de DHE 5 μ M (diidroetidina) e vacúolos ácidos por laranja de acridina 5 μ M em células da linhagem U87MG e T98G expostas à normóxia e hipóxia por 48h, em meio completo ou privado de soro fetal bovino. **A.** Aumento de ROS somente em células expostas concomitantemente a hipóxia e privação de nutrientes na linhagem U87MG. **B.** A linhagem T98G demonstra aumento de ROS em hipóxia tanto em meio completo ou privado de soro fetal bovino. **C e D.** Vacúolos ácidos são encontrados em hipóxia em meio completo ou privado de soro fetal bovino nas células da linhagem U87MG e T98G. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.19) Transdução das células das linhagens T98G e U87MG através de lentivírus com shRNA para gal-3 demonstrou diminuição estável da expressão desta proteína

Células das linhagens de glioma humano T98G e U87MG foram transduzidas com lentivírus contendo plasmídeos com sequências para shRNA anti gal-3 ou *scramble*, além de um gene de resistência para o antibiótico puromicina para seleção das células efetivamente transduzidas. Este processo teve como objetivo criar linhagens que tivessem inibição estável de gal-3 a fim de avaliar *in vitro* seu papel na proteção contra hipóxia e privação de nutrientes e *in vivo* no desenvolvimento tumoral.

Nossos resultados demonstraram êxito no silenciamento tanto no nível proteico (Fig. 37A) quanto de RNAm (Fig. 37 B e C) nas duas linhagens testadas.

Figura 37 – Transdução das células das linhagens T98G e U87MG utilizando lentivírus contendo sequências para shRNA anti-gal-3 e *scramble*, o qual contém uma sequência de shRNA inespecífica. **A.** Diminuição da expressão proteica de gal-3 nas linhagens T98G e U87MG em células que expressam o shRNA anti-gal-3 em comparação com o controle (células parentais) que não sofreram transdução por lentivírus e o *scramble*. β -actina utilizada como controle de carregamento proteico. **B/C.** Diminuição do RNAm em células transduzidas com uma sequência para shRNA anti-gal-3 em comparação com células transduzidas com shRNA *scramble* em células da linhagem T98G (**B**) e U87MG (**C**). β -actina utilizada como normalizador.

6.20) Inibição de gal-3 através da transdução de shRNA anti-gal-3 por lentivírus aumentou a suscetibilidade das células da linhagem T98G à morte por hipóxia

A avaliação das taxas de morte das células das linhagens T98G e U87MG demonstrou que células desta primeira linhagem apresentaram aumento das taxas de morte celular em hipóxia em privação de SFB em comparação com células transduzidas com shRNA *scramble*, não havendo diferenças quando comparadas as taxas de morte celular em normóxia (Fig. 37A).

As células da linhagem U87MG não demonstraram diferenças significativas nas taxas de morte celular tanto em normóxia, somente em hipóxia em meio completo (Fig. 38B), porém estes resultados não se repetiram posteriormente em células expostas a estas condições por 72h (dados não mostrados).

Figura 38 – Avaliação da morte celular por incorporação de iodeto de propídeo e análise em citometria de fluxo de células das linhagens U87MG e T98G transduzidas com lentivírus contendo sequências para shRNA anti-gal-3 e *scramble* (controle) e expostas à normóxia e hipóxia, tanto em meio completo ou privado de soro fetal bovino por 48h. Células da linhagem T98G demonstraram aumento da morte celular em hipóxia tanto em meio completo ou privado de soro fetal bovino em comparação com células em normóxia. Em relação à linhagem U87MG, somente houve diferença em relação a hipóxia em meio completo e seu controle em normóxia. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média±SEM. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.21) Inoculação de células da linhagem U87MG shRNA para gal-3 em camundongos *nude* fêmeas demonstrou menores taxas de crescimento tumoral comparadas com células U87MG parental e *scramble*

A inoculação de células da linhagem U87MG shRNA para gal-3 em camundongos *nude* fêmeas demonstrou menores taxas de crescimento tumoral quando comparadas com tumores derivados de células da linhagem U87MG parental ou *scramble* (Fig. 39A). Todos estes animais demonstraram uma pequena inflamação nos primeiros 15 dias após inoculação das células tumorais, a qual desaparecia e se tornava- indetectável. Após 20 dias, tumores começavam a ser detectados em camundongos inoculados com células U87MG parentais ou *scramble*, de modo que estes animais eram eutanasiados após cerca de 35 dias, enquanto que os animais injetados com células shRNA para gal-3 somente apresentavam crescimento tumoral acentuado a partir de 42 dias após a inoculação, além de demonstrar menores taxas de crescimento tumoral.

A análise do RNAm de gal-3 nestes tumores através de três normalizadores demonstrou que o *knockdown* continua estável nas células shRNA para gal-3 em comparação com as células parentais ou *scramble in vivo* (Fig. 39B).

Estas menores taxas de crescimento de tumores derivados da inoculação de células shRNA para gal-3 não foi devido a menores taxas de proliferação *in vitro*, uma vez que as curvas de crescimento das células U87MG *scramble* e shRNA não demonstraram alterações (Fig. 40).

Inoculação U87MG parental, scramble e shRNA para gal-3 em camundongos nude fêmeas

qRT-PCR de tumores derivados da inoculação de células das linhagens U87MG parental, scramble e shRNA para gal-3 em camundongos nude fêmeas

Figura 39 – Análise do crescimento tumoral e o do RNAm de gal-3 em tumores derivados de células da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 em camundongos *nude* fêmeas. Os tumores eram avaliados duas a três vezes por semana, tendo seu tamanho indicado em cm³. Os camundongos eram eutanasiados após seu crescimento tumoral e tiveram seu RNAm extraído e comparado para a produção de gal-3, onde tumores derivados de células parentais e *scramble* tiveram expressão semelhante e tumores derivados de células shRNA para gal-3 demonstraram menor expressão do RNAm de gal-3.

Figura 40 – Análise do crescimento celular *in vitro* de células da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 em um período de 7 dias. Não houve diferenças significativas nas taxas de crescimento destas células no período de tempo analisado. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*

6.22) Análise histológica de tumores derivados da inoculação de células da linhagem U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 em camundongos *nude* fêmeas

A análise histopatológica dos tumores derivados da inoculação das células U87MG parental, *scramble* e shRNA para gal-3 demonstrou áreas necróticas com pseudopaliçada em coloração com hematoxilina e eosina (Fig. 41) em tumores retirados de animais após 33 dias da inoculação das células (parental e *scramble*) e 64 dias (shRNA). Estes mesmos tumores apresentaram estas áreas de pseudopaliçada marcada com gal-3 em sua extensão com intensidades diferentes.

Também realizamos a análise de tumores derivados de shRNA para gal-3 retirados precocemente com cerca de 39 dias, os quais se apresentavam com tamanho pequeno e sem áreas necróticas e/ou pseudopaliçada. Apesar do tamanho inferior ao controle *scramble*, os tecidos tumorais apresentaram marcação heterogênea para gal-3 (Fig. 42), desde baixa marcação até marcação forte e heterogênea dentro do tecido.

Figura 41 – Análise histológica de tumores derivados da inoculação de células da linhagem U87MG parental e *scramble*, retirados após 33 dias da inoculação, e shRNA para gal-3, retirados após 64 dias da inoculação, em camundongos *nude* fêmeas. A coloração por hematoxilina/eosina demonstrou características histológicas típicas de glioblastoma multiforme, como regiões necróticas (N) com presença de pseudopaliçada (setas) nos tumores derivados das células parentais (A), *scramble* (C) e shRNA para gal-3 (E). A análise da expressão de gal-3 demonstrou marcação para esta proteína nas áreas de pseudopaliçada nos tumores (setas), independente da célula utilizada para inoculação, como as células parentais (B), *scramble* (D) e shRNA para gal-3 (F). Barra de escala 20 µm.

Figura 42 – Análise imunohistoquímica para gal-3 de tumores derivados da inoculação de células da linhagem U87MG shRNA para gal-3 retirados após 39 dias da inoculação em camundongos *nude* fêmeas. Os tumores, de tamanho pequeno, não apresentaram áreas necróticas e pseudopaliçada, além de terem volume inferior ao dos tumores derivados da inoculação das células U87MG *scramble* (dados não mostrados). A marcação de gal-3 foi heterogênea, com tumores apresentando marcação baixa (**A** e **B**), marcação média (**C** e **D**) e marcação forte em pontos específicos do tecido tumoral (**E** e **F**). Barra de escala 20 µm.

7) DISCUSSÃO

Este trabalho tem como objetivo a avaliação da função da gal-3 no contexto de morte celular em células expostas a condições extremas, como a privação de oxigênio e nutrientes, ambientes comumente encontrados em tumores de crescimento rápido, como os glioblastomas.

Estes ensaios, inicialmente realizados em uma linhagem de glioma híbrido humano/murino, NG97ht, demonstraram uma forte participação da gal-3 como protetora contra a morte induzida por privação de oxigênio e nutrientes, ambiente mimetizado *in vitro* a partir de uma observação *in vivo*. Estes experimentos agora tiveram como alvo a identificação de seus possíveis mecanismos de proteção contra a morte, também como seus possíveis indutores gênicos e a expansão desta hipótese para outras linhagens de glioma humano.

A seguir serão discutidos nossos resultados nestes últimos anos de trabalho.

7.1) Marcação para hipóxia *in vitro* e *in vivo*

A marcação *in vitro* através de pimonidazole nas células da linhagem NG97ht confirma a exposição destas células a baixas tensões de oxigênio. Neste caso, o pimonidazole é capaz de formar adutos com grupos tiol de proteínas, peptídeos e aminoácidos de células expostas a condições menores de 14 μ M ou 10 mmHg de oxigênio (CHACON *et al.* 1988; RALEIGH *et al.* 1985; RALEIGH *et al.* 1990; VARGHESE *et al.* 1983), e quando medidos através de um sensor de oxigênio, chegam a menos de 1% de oxigênio

disponível para as células.

Curiosamente, a marcação de adutos de pimonidazole também ocorreu em células expostas ao CoCl_2 . É possível que metais pesados como o cobalto possam induzir adutos de pimonidazole mesmo em condições de normóxia, sendo posteriormente detectados através de imunofluorescência em nossos ensaios.

Em relação à marcação *in vivo*, ela demonstra que as células de áreas de pseudopaliçada em tumores derivados da inoculação destas células em camundongos *nude* estão em hipóxia, como já descrito anteriormente em glioblastomas (SONDERGAARD *et al.* 2002). Infelizmente as tentativas de se realizar testes de marcação para HIF-1 α nestas células da pseudopaliçada não foram bem sucedidas em nossos experimentos devido a problemas de marcação do anticorpo durante a imunoistoquímica.

7.2) Correlação entre morte celular e produção de espécies reativas e vacúolos acídicos em células da linhagem NG97ht, U87MG e T98G

A avaliação da produção de ROS por DHE e o aumento de vacúolos acídicos pela marcação com laranja de acridina nas células das linhagens NG97ht, U87MG e T98G demonstraram a indução destes elementos em hipóxia e CoCl_2 (somente para NG97ht), tanto em meio completo ou privado de SFB, e em normóxia em privação de SFB.

Durante a exposição ao CoCl_2 , um metal pesado, pode haver a indução de ROS através da Reação de Fenton, no qual moléculas de peróxido de hidrogênio sofrem reação com o cobalto, induzindo a produção de radicais hidroxila prejudiciais às células. No caso de células em hipóxia e privação de

SFB, pode haver desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial (REED 1997) e liberação de ROS.

No caso da hipóxia induzida por baixas pressões de oxigênio, a produção de espécies reativas ocorreria pela criação de um ambiente redutor em hipóxia, o qual doaria elétrons para o oxigênio existente, mesmo que em baixas concentrações. Na hipóxia, a célula estaria em um estresse redutor pela elevação de agentes redutores, como NADH e FADH₂, os quais se acumulariam na mitocôndria quando houvesse insuficiência de oxigênio para redução pela cadeia de transporte de elétrons. Este acúmulo de agentes redutores faz com que estes elétrons estejam mais disponíveis para reações de redução, como o que ocorre com o O₂ na transformação para o ânion superóxido (CLANTON 2007). E além da hipóxia, a privação de nutrientes também atua como um indutor de ROS nas células (WU *et al.* 2013), podendo participar de processos de indução do efeito Warburg conjuntamente com a AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*), uma proteína que participa da homeostase energética celular.

Além da participação da hipóxia e privação de nutrientes na indução de ROS, estes dois fatores têm papel fundamental nos processos de autofagia celular, a qual também se demonstrou aumentada nestas células. A autofagia faz parte de um processo de reciclagem de organelas e compostos celulares para obtenção de energia em situações de estresse, principalmente de nutrientes.

Este tipo de situação é comum em ambientes necróticos tumorais, onde além de termos a hipóxia, há também a privação de nutrientes e fatores de crescimento devido à distância de vasos sanguíneos. Um fator importante

neste processo é o NF- κ B, o qual será discutido detalhadamente mais a frente, um fator de transcrição sensível ao estado redox da célula, onde pode haver sua ativação em ambientes com maior produção de ROS (AWAD et al. 2013). Este fator atua diretamente nos processos autofágicos através da indução de Beclina 1, uma proteína importante na formação dos autofagossomos (ZENG et al. 2013).

O desbalanço do processo autofágico, uma vez induzido para aumentar a sobrevivência celular, no fim pode levar à morte das células em hipóxia e privação de nutrientes, juntamente com a produção de ROS induzidas nestas células em exposição ao CoCl₂ e hipóxia em privação de nutrientes.

De modo geral, este aumento de ROS pode culminar na indução da morte celular observada em nossos experimentos prévios, e como foi anteriormente discutido, a gal-3 pode participar da proteção contra ROS através da ativação de genes como a glutathione-S-transferase (MAZUREK et al. 2005). Juntamente com o aumento de vacúolos autofágicos, estes dois fatores podem ser os principais estímulos para a indução da morte celular verificada durante a privação de oxigênio e nutrientes.

7.3) A indução da morte por necrose em hipóxia e privação de nutrientes

Nossos primeiros experimentos envolvendo a morte induzida por hipóxia e privação de nutrientes demonstraram que houve aumento de morte celular nestas células, porém o mecanismo de morte induzido por este tipo de estresse ainda é desconhecido, podendo ocorrer apoptose celular ou necrose.

Nossos estudos avaliando conjuntamente a marcação de anexina V, a qual marca a exposição de fosfoserinas na superfície de células em apoptose,

e iodeto de propídeo revelaram que no período de 24h analisado, temos somente a presença da necrose nestas células da linhagem NG97ht, não demonstrando a morte por apoptose celular, tanto em hipóxia como em CoCl_2 .

Estes dados em CoCl_2 são corroborados pela literatura, onde a exposição a metais pesados, como o cobalto, induzem a morte por necrose em células de miócitos esqueléticos diferenciados (C2C12), a qual pode ser inibida por necrostatina-1, além de demonstrar falta de ativação de caspase 3 e 8 (ROVETTA *et al.* 2013). Além disso, esta morte induzida por CoCl_2 pode ter sofrido sinergismo em conjunto com a privação de nutrientes nestas células, somando-se o aumento de ROS, autofagia e toxicidade por metais pesados.

Em relação à morte induzida por necrose em hipóxia e privação de nutrientes, há controvérsias na literatura. Estudos apontam para a indução da apoptose celular em células da linhagem HeLa expostas à privação de nutrientes pela incubação em solução tamponada salina de Hank (HBSS), induzindo a produção de lactato, piruvato citoplasmático e diminuição do consumo de oxigênio, provavelmente pelas menores taxas de fosforilação oxidativa (WU *et al.* 2013). Porém estes estudos não realizaram testes combinados de privação de oxigênio e nutrientes, de modo que poderíamos ter uma alteração no perfil de morte celular para a necrose, como visto nessa linhagem NG97ht.

7.4) A indução gênica de galectina-3: HIF-1 α , NF- κ B e fatores intermediários

O tratamento realizado com cicloheximida demonstrou que a indução do gene de gal-3 é dependente de fatores intermediários que necessitam ser

induzidos através da hipóxia nesta linhagem NG97ht. Neste caso, são possíveis diversos candidatos para essa indução, como é visto na literatura.

Primeiramente investigamos a possível participação de HIF-1 α , pois inúmeros estudos apontam para seu acúmulo no núcleo das células mesmo em condições de normóxia, relacionando-se com algumas características tumorais, como a glicólise aeróbia (WARBURG 1956). Nestes casos, o acúmulo de HIF-1 α induziria a transcrição de diversos genes relacionados com a adaptação à falta de oxigênio, além de genes como a própria gal-3, como previamente descrito (ZENG 2007). Devido a estas evidências, realizamos testes para verificar a localização desta proteína em condições de hipóxia.

Como visto, houve acúmulo de HIF-1 α no núcleo das células da linhagem NG97ht em hipóxia e em CoCl₂. Este fato demonstra que HIF-1 α não está translocado para o núcleo em normóxia e pode ser um possível indutor de gal-3 em condições de baixa concentração de oxigênio. Mas os estudos com inibidores da tradução proteica, como a cicloheximida, demonstraram que é necessária a tradução de fatores intermediários para a indução de gal-3. Este fato demonstra que HIF-1 α , apesar de já estar traduzido e poder se translocar para o núcleo, pode não ser um fator de maior importância na indução inicial de gal-3. Deste modo, é possível que outros fatores responsivos à privação de oxigênio possam induzir diretamente ou através de elementos intermediários o gene de gal-3, uma vez que seu promotor possui diversos sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, como NF- κ B (KADROFSKE *et al.* 1998). Nossos dados apontam para o NF- κ B como o principal fator envolvido na indução de gal-3 durante a exposição ao CoCl₂, tendo uma função parcial na indução durante a exposição à hipóxia.

Estudos correlacionam a exposição de células à hipóxia/reoxigenação com a ativação de NF- κ B, possivelmente envolvendo de forma única ou combinada com a fosforilação de tirosina de I κ B α , um inibidor de NF- κ B, e o controle nuclear de NF- κ B por p50 e Bcl3, além de que é visto que NF- κ B pode ser regulado de maneira dependente de cálcio em baixas concentrações de oxigênio, o qual também agiria sobre HIF-1 α , especialmente por RelA, RelB e p52, membros da família de NF- κ B (Fig. 42) (ROYDS *et al.* 1998, CULVER *et al.* 2010; MELVIN *et al.* 2011; UDEN *et al.* 2008; YAMAZAKI *et al.* 2001).

Deste modo, NF- κ B poderia agir de forma direta e indireta na indução de gal-3, uma vez que existe um *cross-talk* da regulação de HIF-1 e NF- κ B, onde o aumento do RNAm de HIF-1 α pode ser dependente de NF- κ B, além de ser necessário um nível basal de NF- κ B para a expressão constitutiva de HIF-1 α (RIUS *et al.* 2008) (Fig. 43).

Outro fato a ser destacado foi a diferença da indução de hipóxia entre a realizada em baixas concentração de oxigênio e a realizada através da hipóxia mimética por CoCl₂. De fato, Olbryt e colaboradores (OLBRYT *et al.* 2006) demonstraram que os grupos de genes cuja expressão é modificada em baixa pressão de oxigênio e CoCl₂ demonstram similaridades, porém não são idênticos. Além disso, metais pesados como NiCl₂ e CoCl₂ podem ativar NF- κ B pela indução da translocação de NF- κ B p65 e também p50 para o núcleo, podendo aumentar a sua capacidade de ligação com DNA (WAGNER *et al.* 1997).

Figura 43 – Esquema da indução de gal-3 em exposição a baixas concentrações de oxigênio (hipóxia) e ao CoCl_2 . O CoCl_2 e a hipóxia induziriam o acúmulo de HIF-1 α , o qual se translocaria para o núcleo, se dimerizaria com HIF-1 β e induziria gal-3. Nesta mesma situação temos a indução de NF- κ B, o qual poderia agir diretamente na transcrição de gal-3 ou indiretamente estimulando a indução de HIF-1 α .

Além disso, outros estudos têm demonstrado a importância de outros fatores transcricionais na indução de gal-3, como os membros da família RUNX (Hirao *et al.* 2006; Stock *et al.* 2003; Vladimirova *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009), além da possível indução de RUNX-2 em hipóxia (LIU *et al.* 2007), porém nossos estudos através de qRT-PCR para este fator de transcrição não demonstraram sua indução em privação de oxigênio (Apêndice).

7.5) Co-localização subcelular de gal-3 com mitocôndrias e seu papel na proteção contra a morte celular

Os resultados das imunofluorescências para gal-3 nas três linhagens de glioma demonstraram colocalização de gal-3 com mitocôndrias através do anticorpo monoclonal M3/38, algo que não havia sido demonstrado anteriormente através do uso de um outro anticorpo monoclonal de clone A3A12. É possível que a gal-3 possa sofrer alterações como a clivagem e devido a ligação diferenciada destes dois anticorpos estejamos visualizando

diferentes formas de gal-3, embora ambos reconheçam a região N-terminal desta proteína.

Houve co-localização principalmente nas linhagens NG97ht e U87MG, com menor nível na linhagem T98G. A linhagem NG97ht demonstrou co-localização tanto em normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de SFB, porém não pudemos observar alterações de expressão nuclear e citoplasmática nestas células. Quanto a linhagem T98G, além da co-localização de gal-3 com mitocôndrias, pudemos observar aumento da gal-3 nuclear. Como já foi descrito na literatura, a localização nuclear de gal-3 está relacionada a diferentes papéis desta proteína, como por exemplo, na 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), porém seu exato papel no núcleo das células desta linhagem ainda não é claro.

Em relação à linhagem U87MG, houve co-localização da gal-3 com mitocôndrias, além de demonstrar que estas organelas tornam-se mais reticuladas e aumentadas em hipóxia e privação de nutrientes, porém não houve alterações perceptíveis na localização subcelular de gal-3 nestas células. Esta alteração na morfologia das mitocôndrias também foi encontrada em células da linhagem NG97ht expostas ao CoCl_2 . Estudos apontam que estas alterações de aumento das mitocôndrias atuam na proteção contra estímulos apoptóticos em células expostas à hipóxia (CHICHE *et al.* 2010), e a metais pesados também, como evidenciado em nosso estudo.

Esta co-localização com mitocôndrias nos indica que o papel da gal-3 nestas células poderia estar relacionada com a inibição da liberação do

citocromo-C e ativação das caspases, através da manutenção da polarização mitocondrial após translocação de gal-3 do núcleo para o citoplasma (YU *et al.* 2002; FUKUMORI *et al.* 2006).

Finalmente, é descrito na literatura que a gal-3 pode se acumular em agregados em células e isso poderia estar relacionado com a degradação de gal-3 por autofagossomos (LI *et al.* 2010), onde é descrita a degradação lisossomal desta proteína mediada pelas quinases c-Abl e Arg. Averiguamos esta possibilidade pela inibição da PI3K, quinase participante da formação de autofagossomos (REN *et al.* 2009), através do uso de um composto inibidor, LY294002. Porém estes experimentos não demonstraram nenhuma alteração na localização de gal-3 ou co-localização com autofagossomos nas três linhagens de glioma analisadas (dados não mostrados).

7.6) Modificações pós-traducionais de gal-3 em cloreto cobaltoso e hipóxia

Diversos autores relacionam as propriedades da gal-3 com modificações pós-traducionais, como a fosforilação (BALAN *et al.* 2010; DÍEZ-REVUELTA *et al.* 2009; MAZUREK *et al.* 2005; MAZUREK *et al.* 2000). Nossos resultados demonstram que nas células da linhagem NG97ht, encontramos diversas formas de gal-3, porém seis (A a F) apresentam-se de forma destacada em nossos resultados.

A comparação das diversas formas de gal-3 em normóxia, CoCl_2 e hipóxia demonstra que a forma induzida de gal-3 nestas duas últimas condições está representada pelas formas E e F, cada uma composta por duas formas de massa molecular diferente, porém de mesmo PI. É possível que estas formas

de maior massa molecular apresentadas sejam referentes à banda de gal-3 encontrada na Figura 4, em CoCl_2 e hipóxia tanto em meio completo ou privado de SFB.

Em relação aos tratamentos dos extratos protéicos com fosfatase ácida (FA), encontramos alterações no PI das formas E e F em normóxia e CoCl_2 , fato que não é demonstrado em células expostas à hipóxia. Além disso, em todos os extratos tratados com FA, há diminuição das formas A, C e D, podendo indicar que sejam fosforilados, além de demonstrar aumento da forma B.

Este aumento da forma B pode ser devido a defosforilação de outras formas de gal-3 ou mesmo da forma A encontrada nestes extratos, havendo aumento em seu PI e diminuição em sua massa molecular.

As análises em gel de duas dimensões envolvendo a linhagem U87MG também demonstraram diferenças no PI de gal-3 em células expostas à normóxia e hipóxia, indicando que as formas em normóxia são mais sensíveis ao tratamento com fosfatase ácida do que as formas apresentadas em hipóxia.

Estas análises são importantes para o entendimento das funções desta proteína, porém não são capazes de informar com exatidão suas alterações pós-traducionais.

As tentativas de analisar essas possíveis alterações pós-traducionais por espectrometria de massa não foram bem sucedidas, porém obtivemos resultados referentes a possíveis duas isoformas de gal-3 encontradas nesta linhagem.

A troca de uma arginina para glicina na posição 252 na região C-terminal da gal-3 pode explicar o fato de encontrarmos tantos PIs diferentes para esta

proteína. É possível que neste caso as formas mais básicas de gal-3 (E e F) sejam correspondentes a estas duas isoformas diferentes, as quais, quando fosforiladas, originariam as formas mais ácidas desta proteína (C e D).

Esta alteração na gal-3 está identificada e é demonstrado que variantes de gal-3 podem induzir modificações no comportamento das células, pois são descritas na literatura modificações em aminoácidos específicos em gal-3, as quais podem levar a alterações em sua função, como a acumulação nuclear e ativação de β -catenina em câncer gástrico (KIM *et al.* 2011) e na predisposição genética para a artrite reumatóide (HU *et al.* 2011), por exemplo. Em gliomas, estudos recentes têm demonstrado que variantes genéticas de gal-3 podem alterar sua suscetibilidade e prognóstico, pelo menos em uma população específica chinesa (CHEN *et al.* 2012), onde uma mutação do nucleotídeo citosina para adenina na posição 292, o qual induz uma alteração de prolina para treonina no resíduo de aminoácido 98, é mais prevalente em pacientes com glioblastoma do que nos pacientes controle. Deste modo, esta alteração encontrada em nossos experimentos poderia levar a alterações de função da gal-3.

7.7) Possível indução da morte pela galectina-3 extracelular

Além da possibilidade da proteção contra a morte induzida pela hipóxia e privação de nutrientes, a gal-3 também poderia participar da indução da morte celular, a qual dependeria da secreção de gal-3 e deposição na matriz extracelular. Por exemplo, nosso grupo foi capaz de demonstrar que durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas, houve aumento da deposição da gal-3 na matriz celular do timo. Este aumento

desta proteína elevou tanto a migração de timócitos para fora deste órgão quanto a morte celular, levando à atrofia tímica (VILLA-VERDE *et al.* 2007). Além disso, outros dados de nosso grupo demonstraram que a ligação da gal-3 extracelular a $\beta 1$ integrinas é capaz de induzir morte celular em células de carcinoma de cólon (ZHUO *et al.* 2008), porém a sialilação destas integrinas pode diminuir a ligação da gal-3 e inibir a indução da morte celular.

Estudos prévios realizados na linhagem NG97ht demonstraram que a privação de SFB pode diminuir as taxas de sialilação nestas células, uma vez que células com altas taxas de proliferação celular, como células tumorais, dependem do ácido siálico proveniente da alimentação (TANGVORANUNTAKUL *et al.* 2003), ou neste caso, da suplementação através do meio de cultura.

Uma vez que estas células possuem menores taxas de sialilação, a gal-3 poderia ser secretada e poderia induzir a morte celular nesta linhagem NG97ht quando exposta a privação de oxigênio e nutrientes. A adição de carboidratos de alta ligação com a gal-3 poderia inibir esta ligação com receptores não sialilados e impedir a indução da morte celular.

Neste caso, podemos ter em uma mesma linhagem celular a indução e inibição da morte celular através da gal-3. A gal-3 seria secretada e induziria a morte destas células, porém o maior papel desta proteína seria a de proteção contra a morte induzida pela privação de oxigênio e nutrientes, como foi visto na linhagem NG97ht.

7.8) Expansão da função de galectina-3 na inibição da morte celular induzida pela privação de oxigênio e nutrientes em outras linhagens de glioblastoma

A primeira análise destas três linhagens demonstrou grande diferença para a expressão de gal-3, onde a linhagem U251 apresentou baixa expressão comparada com as linhagens U87MG, T98G e NG97ht.

Além disso, as linhagens U251 e T98G não se apresentaram responsivas a indução de gal-3 durante a exposição à hipóxia tanto em meio completo ou privado de SFB, ao contrário da linhagem U87MG.

Estes dados podem indicar um perfil diferente da linhagem U251, a qual não se encaixou em nosso quadro de estudos para a expansão da função da gal-3 como fator chave durante a proteção contra a morte induzida pela privação de oxigênio e nutrientes, porém decidimos continuar com a linhagem T98G pela maior expressão de gal-3 nestas células, apesar da falta de resposta na indução do RNAm de gal-3 em hipóxia.

Em relação à linhagem U87MG, esta demonstrou perfil de resposta parecido com o da linhagem NG97ht, tanto em expressão proteica de gal-3 como o de indução de seu RNAm, tornando-se uma melhor candidata para os experimentos de hipóxia e privação de nutrientes, além dos ensaios com silenciamento através de RNA de interferência.

Os primeiros testes envolvendo a análise da expressão de gal-3 em normóxia e hipóxia em meio completo ou privado de SFB demonstrou que somente a privação de soro já foi um indutor da expressão de gal-3 nesta linhagem U87MG, sendo a privação de oxigênio e nutrientes um fator ainda mais expressivo para indução deste gene.

Estes dados apontam a gal-3 como uma proteína não somente de expressão induzida por hipóxia, mas também induzida por outros estresses, como a privação de nutrientes. Em relação aos dados obtidos através da eletroforese de duas dimensões, foi visto que há alterações pós-traducionais de gal-3 nesta linhagem, principalmente em normóxia, visto que esta foi mais sensível ao tratamento com fosfatase ácida, como previamente discutido, corroborando com nossos estudos prévios sobre a alteração da gal-3 durante a exposição das células à hipóxia.

Porém nossos resultados com a transdução de shRNA para gal-3 nas linhagens U87MG e T98G somente demonstraram aumento da sensibilidade durante a exposição à hipóxia e privação de nutrientes nesta última linhagem.

Desta forma, estamos expandindo nossa teoria da gal-3 como molécula protetora da morte celular induzida pela privação de oxigênio e nutrientes em gliomas, comumente apresentada em áreas de pseudopaliçada. Entretanto, outras propriedades da gal-3 podem estar presentes neste tipo de microambiente, uma vez que esta proteína pode participar da migração e invasão celular, por exemplo, como visto em tumores gástricos onde há aumento de PAR-1 e MMP-1 (KIM *et al.* 2011) ou em tumores pancreáticos através da degradação de β -catenina (KOBAYASHI *et al.* 2011), atuando em diversas peculiaridades tumorais.

7.9) O papel da galectina-3 no desenvolvimento tumoral

Os experimentos realizados com células da linhagem U87MG *scramble* e shRNA para gal-3 demonstraram diferenças significativas no estabelecimento e desenvolvimento destas células em camundongos *nude*. Inicialmente o

objetivo deste experimento seria avaliar o papel da gal-3 no desenvolvimento de áreas de pseudopaliçada *in vivo*, porém como utilizamos células com expressão reduzida de gal-3 e não células *knockout* para este gene, a abolição total desta proteína não foi alcançada, porém obtivemos resultados relevantes para a importância desta proteína no desenvolvimento tumoral.

A análise dos volumes tumorais destes dois grupos demonstrou uma grande dependência de gal-3, tanto para o estabelecimento quanto para o crescimento tumoral. É possível que após a inoculação destas células no dorso destes camundongos, houvesse uma seleção de células com maiores taxas de expressão de gal-3 em detrimento de células que expressam pouco desta proteína, as quais eventualmente entram em necrose e morrem. A marcação para gal-3 em tumores derivados de células transduzidas com shRNA para gal-3 demonstrou que em estágios iniciais, há expressão heterogênea desta proteína, os quais não demonstraram áreas necróticas e/ou pseudopaliçada devido ao seu tamanho, porém tumores mais tardios e de maior tamanho apresentaram estas áreas necróticas e larga marcação de gal-3 em zonas de pseudopaliçada.

Neste ambiente, a gal-3 poderia ter diversos papéis nos diferentes estágios de desenvolvimento tumoral. Song e colaboradores (2012) demonstraram que a redução da expressão de gal-3 em células de câncer pancreático diminuiu suas taxas de proliferação celular e invasão *in vitro* e reduziu o volume e tamanho tumoral em modelo ortotópico de forma dependente de RAS, uma família de genes envolvida na proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular (SPAARGAREN *et al.* 1995). De forma parecida, estes pesquisadores demonstraram que a indução de

expressão de gal-3 em células de câncer pancreático que possuem baixa expressão desta proteína levou ao aumento da expressão de RAS e suas vias *downstream*.

Outros estudos apontam que além de ter um papel direto na proliferação de células tumorais, os níveis de gal-3 tumoral também alteram sua interação com células do sistema imune, principalmente macrófagos. Dumont e colaboradores (2008) analisaram o papel do sobrenadante de macrófagos M1, os quais produzem TNF- α , IL-1 β e ROS e possuem papel anti-tumoral em câncer colo-retal. No caso foram utilizadas células da linhagem de colo-retal DLD-1 e a exposição a este sobrenadante demonstrou inibição do crescimento destas células. Além disso, o *knockdown* de gal-3 nesta linhagem a deixou mais suscetível a morte frente a exposição a este sobrenadante de macrófagos polarizados M1.

De forma geral, a gal-3 pode possuir múltiplos papéis dentro do ambiente tumoral, podendo agir na proliferação celular, além de atuar na proteção destas células contra o sistema imune, seja por proteção contra citocinas produzidas pro macrófagos ou durante a proteção contra ROS liberadas por estas células.

Por fim, os resultados deste trabalho podem indicar outro mecanismo no qual a gal-3 estaria envolvida. Após a inoculação das células tumorais que possuem baixa expressão de gal-3, estas, que foram inseridas em um ambiente celular desfavorável no subcutâneo de camundongos, possuem baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes, essencial para o estabelecimento tumoral. Neste cenário, esta mistura de células heterogênea para a expressão de gal-3 propicia a seleção de células com maior expressão desta proteína,

uma vez que a falta desta proteína leva ao aumento das taxas de morte celular frente a hipóxia e privação de nutrientes. Uma vez selecionadas, estas células seriam responsáveis pelo estabelecimento e crescimento tumoral, mas necessitariam de um maior tempo de estabelecimento e teriam menores taxas de proliferação do que as células controle *scramble* que possuem maior expressão desta proteína, como visto em nossos resultados.

8) SUMÁRIOS DE RESULTADOS

- Há dependência de fatores intermediários na indução de gal-3;
- NF- κ B participa da indução de gal-3, de forma direta ou indireta;
- Gal-3 sofre alterações pós-traducionais, entre elas a fosforilação, e se apresenta proveniente de dois alelos diferentes na linhagem NG97ht;
- Há aumento de ROS e vacúolos acídicos em hipóxia e privação de nutrientes;
- A morte induzida por privação de oxigênio e nutrientes ocorre por necrose na linhagem NG97ht;
- A gal-3 exógena possui pouca participação na indução da morte pela via extracelular;
- A linhagem de glioma humano U87MG demonstra aumento da expressão do RNAm e da proteína de gal-3 quando exposta à hipóxia e privação de nutrientes;
- A gal-3 também protege outra linhagem de glioma, T98G, contra a morte quando exposta à privação de oxigênio e nutrientes;
- A gal-3 tem papel no estabelecimento e crescimento tumoral *in vivo* na linhagem U87MG.

9) CONCLUSÕES

- A gal-3 possui alterações pós-traducionais, como a fosforilação, sendo que há mais alterações em seu ponto isoelétrico durante o tratamento com fosfatase ácida em células que foram expostas à normóxia e CoCl_2 . As formas mais ácidas de gal-3 aparentam ser as formas fosforiladas desta proteína, e as múltiplas formas apresentam-se devido a dois alelos diferentes do gene de gal-3 nestas células da linhagem NG97ht;
- O NF- κ B demonstra-se com um indutor parcial da expressão de gal-3 em hipóxia, tendo maior papel na indução desta proteína na exposição ao CoCl_2 . Este fato demonstra diferenças destes dois métodos de indução de hipóxia;
- A morte celular nas células da linhagem NG97ht em hipóxia ocorre por necrose sem apoptose, além de ser acompanhada pelo aumento da autofagia e espécies reativas de oxigênio, aumentando as taxas de morte nestas condições;
- A indução da morte das células em hipóxia e privação de nutrientes não ocorre devido a gal-3 secretada pela célula, uma vez que a inibição da gal-3 extracelular por carboidratos específicos não demonstrou interferência nas taxas de morte celular na linhagem NG97ht;
- A gal-3 também protege contra a morte outra linhagem de glioma, T98G, quando exposta a privação de oxigênio e nutrientes, expandindo esta teoria da gal-3 como proteína protetora contra a morte neste tipo de ambiente;

- A gal-3 é importante no estabelecimento e desenvolvimento tumoral na linhagem U87MG, provavelmente atuando em diversas vias, como a proteção contra a morte pela privação de oxigênio e nutrientes no microambiente subcutâneo do modelo murino, além de poder participar da proteção contra espécies reativas de oxigênio e promover angiogênese.

10) APÊNDICE

Figura 44 – qRT-PCR para *RUNX-2* de células da linhagem NG97ht expostas à normóxia, CoCl₂ 100 μ M e hipóxia em meio privado de soro fetal bovino por 48h. A análise da expressão gênica de *RUNX-2* não demonstrou alterações nestas condições analisadas. Representação de experimentos realizados pelo menos três vezes de forma independente e os dados são apresentados como média $\pm$ SEM.

11) REFERÊNCIAS

1. 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.
2. AUZUBEL, FM.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRHUL, K. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1997.
3. AWAD, E. M.; KHAN, S. Y.; SOKOLIKOVA, B.; BRUNNER, P. M.; OLCAYDU, D.; WOJTA, J.; BREUSS, J. M.; UHRIN, P. Cold induces reactive oxygen species production and activation of the NF-kappa B response in endothelial cells and inflammation in vivo. *J Thromb Haemost*, 11(9):1716-1726, 2013.
4. 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.
5. BALAN, V., NANGIA-MAKKER, P., JUNG, Y. J., WANG, Y., RAZ, A. Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803: 1198–1205, 2010.
6. 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, 2004.

7. BRAT, D. J.; & MAPSTONE, T. B. Malignant Glioma Physiology: Cellular Response to Hypoxia and Its Role in Tumor Progression. *Ann Intern Med.* 2003;138(8):659-668. doi:10.7326/0003-4819-138-8-200304150-00014
8. BRAT, D. J.; VAN MEIR, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 84: 379-405, 2004.
9. BRESALIER, R. S.; YAN, P. S.; BYRD, J. C.; LOTAN, R.; RAZ, A. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer* 80(4): 776-87, 1997.
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. CHACON, E.; MORROW, C. J.; LEON, A. A.; BORN, J. L.; & SMITH, B. R. Regioselective formation of a misonidazole-gluthaione conjugate as a function of pH during chemical reduction. *Biochem Pharmacol* 37: 361-363, 1988.
12. CHEN, H. J.; ZHENG, ZC; YUAN, BQ.; LIU, Z.; JING, J.; WANG, SS. The effect of galectin-3 genetic variants on the susceptibility and prognosis of gliomas in a Chinece population. *Neuroscience Letters*, 518: 1-4, 2012.
13. CHICHE, J.; ROULEAU, M.; GOUNON, P.; BRAHIMI-HORN, M, C.; POUYSSÉGUR, J.; MAZURE, N. M. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *J Cell Physiol*, 222(3):648-657, 2010.
14. 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 astroglioma cells. *Molecular and Cellular Biology*, vol 22, no 3:724-736, 2002.
15. CLANTON, T. L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *L Appl Physiol*, 102: 2379-2388, 2007.
16. COCKMAN, M. F. Posttranslational hydroxylation of akyrin repeats in I κ B proteins by the hypoxia-inducible facor (HIF) asparaginyl hydroxylase, factor inhibiting HIF (FIH). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 103: 14767-14772. 2006.
17. COOPER, N. W. & BARONDES, S. H. God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology*, vol 9, no 10: 979-984. 1999.
18. CORMAC, T. T. & CUMMINS, E. P. The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N.Y Acad Sci*, 1177: 178:184, 2009.
19. CULVER, C.; SUNDQVIST, A.; MUDIE, S.; MELVIN, XIRODIMAS, D.; ROCHA, S. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 30(20):4901-4921, 2010.
20. CUMMINS, E. P.; BERRA, K. M.; COMERFORD, K. M.; GINOUVES, A.; FITZGERALD, K. T.; SEEBALLUCK, F.; GODSON, C.; NIELSEN, J. E.; MOYNAGH, P.; POUYSSSEGUR, J.; TAYLOR, C. T. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase-beta giving insight into hypoxia-induced NF- κ B activity. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2006.
21. DABAGHMANESH, N.; MATSUBARA, A.; MIYAKE, A.; NAKANO, K.; ISHIDA, T.; KATANO, H.; HORIE, R.; UMEZAWA, K.; WATANABE, T. Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Sci*, vol 100, n4, 737-746, 2009.

22. 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.
23. 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.
24. DÍEZ-REVUELTA, N., VELASCO, S., ANDRÉ, S., KALTNER, H., KÜBLER, D., GABIUS, H-J., ABAD-RODRÍGUEZ, J. Phosphorylation of adhesion- and growth-regulatory human galectin-3 leads to the induction of axonal branching by local membrane L1 and ERM redistribution. *Journal of Cell Science* 123, 671-681, 2009.
25. DUMONT, P.; BERTON, A.; NAGY, N.; SANDRAS, F.; TINTON, S.; DEMETTER, P.; MASCART, F.; ALLAOUI, A.; DECAESTECKER, C.; SALMON, I. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer.
26. ELOLA, M. T.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; TRONCOSO, M. F.; VASTA, G. R.; RABINOVISH, G. A. *Cell Mol Life*, 64, 1679-1700, 2007.
27. 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.
28. GORDOWER, L.; DECAESTECKER, C.; KACEM, Y.; LEMMERS, A.; et al. Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic

- tumours and related angiogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(4): 319-30, 1999.
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. HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution, *Glycobiology* 3, 297–304, 1993.
31. HIRAO, M.; TAMAI, N.; TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H.; MYOUI, A. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 281, n41, 31079-31092, 2006.
32. HOLLAND, E. C. Glioblastoma multiforme: The terminator. *PNAS*, 6242-6244, 2000.
33. HU, R.; JIN, H.; ZHOU, S.; YANG, P.; LI, X. Proteomic analysis of hypoxia-induced responses in the syncytialization of human placental cell line BeWo. *Placenta* 28(5-6):399-407, 2007.
34. 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.
35. KANAYA, K & KAMITANI, T. pVHL-independent ubiquitination of HIF1 and its stabilization by cobalt ion. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 750-755, 2003.

36. 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.
37. KIM, S. J.; SHIN, J. Y.; LEE, K. D.; BAE, Y. K.; CHOI, I. J.; PARK, S. H.; CHUN, K. H. Galectin-3 facilitates cell motility in gastric cancer by up-regulating protease-activated receptor-1 (PAR-1) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). *Plos One* 6(9):e25103, 2011.
38. KOBAYASHI, T.; SHIMURA, T.; YAJIMA, T.; KUBO, N.; ARAKI, K.; TSUTSUMI, S.; SUZUKI, H.; KUWANO, H.; RAZ, A. Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of β -catenin. *Int J Cancer* 129(12):2775-2786, 2011.
39. 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.
40. KUWABARA, I.; LIU, F-T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin, *J. Immunol.* 156, 3939–3944, 1996.
41. LANDO, D.; PEET, D. J.; GORMAN, J. J.; WHELAN, D. A.; WHITELOW, M. L.; BRUICK, R. K. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.*, 16: 1466-1471, 2002.
42. 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.

43. LE MERCIER, M. ; FORTIN, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. ; LEFRANC, F.
Galectins and gliomas. *Brain Pathol* 20: 17-27, 2009.
44. LI, X.; MA, Q.; WANG, J.; LIU, X.; YANG, Y.; ZHAO, H.; WANG, Y.; JIN, Y.;
ZENG, J.; LI, J.; SONG, L.; LI, X.; LI, P.; QIAN, X.; CAO, C. c-Abl and Arg
tyrosine kinases regulate lysosomal degradation of the oncoprotein Galectin-3.
Cell Death Differ. 17(8):1277-87, 2010.
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. Galectins as modulators of tumour progression.
Nat Rev Cancer, 5: 29-41, 2005.
47. LIU, X. D.; DENG, L. F.; WANG, J.; QI, J.; ZHOU, Q.; WANG, J. S.; WEI, L.;
ZHU, Y. P. Regulation of hypoxia inducible factor-1alpha on osteoblast function
in osteogenesis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 87(47):3357-3361, 2007.
48. KE, F.; WU, J. M.; YAO, J. E.; BAI, Y. J.; GUO, A. L. Application of suspension
array assay to detect marker genes expression of circulating tumor cells for
early prediction of breast cancer metastasis. *Zhonghua yi xue za zhi.*
87(47):2257-2261, 2007.
49. LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K. WHO
Classification of tumours of the central nervous system, 4th Edition, IARC,
Lyon, 2007.
50. MAHER, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter.
Genes Dev, 15: 1311-1333, 2001.
51. 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.
52. MARKOWSKA, A. I.; JEFFERIES, K. C.; PANJWANI, N. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J Biol Chem* 286(34):29913-29921, 2011.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. MELVIN, A.; MUDIE, S.; ROCHA, S. Further insights into the mechanism of hypoxia-induced NFκB. *Cell Cycle* 10(6):879-882, 2011.
57. 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.
58. MAZUREK, N., SUN, Y. J., PRICE, J. E., RAMDAS, L., SCHOBBER, W., NANGIA-MAKKER, P., BYRD, J. C., RAZ, A., BRESALIER, R. S.

- Phosphorylation of Galectin-3 Contributes to Malignant Transformation of Human Epithelial Cells via Modulation of Unique Sets of Genes. *Cancer Res*; 65: (23), 2005.
59. 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.
 60. 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.
 61. 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.
 62. 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.
 63. 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.
 64. 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.

65. OZOG, M. A.; BECHBERGER, J. F. & NAUS, C. C. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFR α) increases connexin 43 expression and suppresses growth of C6 glioma cells. *Cancer Res*, 62(12):3544-3548, 2002.
66. PAPETTI, M & HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282: 947-970, 2002.
67. 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.
68. 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.
69. PARRY, G., LEE, E. Y. -H, FARSON, D., KOVAL, M. AND BISSELL, M. J.. Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. *Experimental Cell Research*, Vol 156, Issue 2, 487-499, 1985.
70. PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: 2002-2007, 2001.
71. PICCOLO, E.; TINARI, N.; SEMERARO, D.; TRAINI, S.; FICHERA, I.; CUMASHI, A.; LA SORDA, R.; SPINELLA, F.; BAGNATO, A.; LATTANZIO, R.; D'EGIDIO, M.; DI RISIO, A.; STAMPOLIDIS, P.; PIANTELLI, M.; NATOLI, C.; ULLRICH, A.; IACOBELLI, S. LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, induces vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells and promotes angiogenesis. *J Mol Med (Berl)* 91(1):83-94, 2013.

72. POWIS, G. & KIRKPATRICK, L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Molecular Cancer Therapeutics*, 647-654, 2004.
73. RALEIGH, J. A.; FRANKO, A. J.; KOCH, C. J. & BORN, J. L. Binding of misonidazole to hypoxic cells in monolayer and spheroid culture: evidence that a side-chain label is bound as efficiently as ring label. *Br J Cancer* 51: 229-235, 1985
74. RALEIGH, J. A. & KOCK, C. J. Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitromidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol* 40: 2457-2464, 1990.
75. RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews Cancer*. Vol 3, 489-501, 2003.
76. REED, J. C. Cytochrome C: can't live with it—can't live without it. *Cell* 91: 559–562, 1997.
77. REN, Y.; HUANG, F.; LIU, Y.; YANG, Y.; JIANG, Q.; XU, C. Autophagy inhibition through PI3K/Akt increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells. *BMB Rep.* 30; 42(9): 599-604, 2009.
78. RIUS, J.; GUMA, M.; SCHACHTRUP, C.; AKASSOGLOU, K.; ZINKERNAGEL, A. S.; NIZET, V.; JOHNSON, R. S.; HADDAD, G. G.; KARIN, M. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453: 807-811, 2008.
79. RONG, Y.; DURDEN, D. L.; VAN MEIR, E. G.; BRAT, D. J. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(6): 529-539, 2006.

80. ROSKANS, J.; RODGERS, L. Lab Ref. A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2002.
81. ROSZMAN, T. ; ELLIOT, L & BROOKS, W. Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunology Today*, vol. 12, no 10 :370-374, 1991.
82. ROVETTA, F.; STACCHIOTTI, A.; FAGGI, F.; CATALANI, S.; APOSTOLI, P.; FANZANI, A.; ALEO, M. F. Cobalt triggers necrotic cell death and atrophy in skeletal C2C12 myotubes. *Toxic and Appl Pharmacol*, 271:196-205, 2013.
83. ROYDS, J. A.; DOWER, S. K.; QWARNSTROM, E. E.; LEWIS, C. E. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 51: 55–61, 1998.
84. SATO, S.; HUGHES, R. C. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol Chem*, 267: 6983-6990, 1992.
85. SCOTT, E.; WRIGHT, R. Variability of glutathione S-transferase of human erythrocytes. *Am J Hum Genet*, 32:115–7, 1980.
86. SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer*, 3: 721-732, 2003.
87. SHEEHAN, D. C. & HRAPCHAK, B. B.: *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd Edition; Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, 1987.
88. SONDERGAARD, K. L.; HILTON, D. A.; PENNEY, M.; OLLERENSHAW, M.; DEMAINE, A. G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 210-217, 2002.

89. SPAARGAREN, M.; BISCHOFF, J. R.; MCCORMICK, F. Signal transduction by Ras-like GTPases: a potential target for anticancer drugs. *Gene Expr*;4:345–356, 1995.
90. STOCK, M.; SCHÄFER, H.; STRIKER, S.; GROSS, G.; MUNDLOS, S.; OTTO, F. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by RUNX-2. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 278, n19, 17360-17367, 2003.
91. SONG, S.; JI, B.; RAMACHANDRAN, V.; WANG, H.; HAFLEY, M.; LOGSDON, C.; BRESALIER, R. S. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *Plos One*, 7(8), e42699, 2012.
92. 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.
93. STRIK, H. M.; DEININGER, M. H.; FRANK, B.; SCHLUESENER, H. J.; MEYERMANN, R. Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. *J Neurooncol* 2001; 53(1): 13-20.
94. 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.
95. 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.

96. THOMPSON, SAMUEL W. Selected Histochemical and Histopathological Methods, Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1966.
97. UDEN, P.; KENNETH, N. S.; ROCHA, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J* 412:477-484, 2008.
98. VILLA-VERDE, D. M.; SILVA-MONTEIRO, E.; JASIULIONIS, M. G.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; BRENTANI, R. R.; SAVINO, W.; CHAMMAS, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 32:1434-1444, 2002.
99. VHARGUESE, A. J. Glutathione conjugates of misonidazole. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 1013-1020, 1983.
100. VLADIMIROVA, V.; WAHA, A.; LÜCKERATH, K.; PESHEVA, P.; PROBSTMEIER, R. Runx-2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectina-3. *Journal of Neuroscience Research*, 86:2450-2461, 2008.
101. WAGNER, M.; KLEIN, C. L.; KLEINERT, H.; EUCHENHOFER, C.; FÖRSTERMANN, U.; KIRKPATRICK, C. J. Heavy metal ion induction of adhesion molecules and cytokines in human endothelial cells: the role of NF-kappaB, I kappaB-alpha and AP-1. *Pathobiol.* 65(5):241-252, 1997.
102. WARBURG, O. *Science* 124, 269–270, 1956.
103. WECHSLER-REYA, R. & SCOTT, M. P. The development biology of brain tumors. *Annu Rev Neusci*, 24:385-428, 2001.
104. WENGER, R. H. & GASSMANN, M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-I. *Biol. Chem.*, 378: 609–616, 1997.
105. WU, C-A.; CHAO, Y.; SHIAH, S-G.; LIN, W-W. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS-AMPK-dependent activation of

- pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem and biophys acta*, 1833: 1147-1156, 2013.
106. YAMAZAKI, K.; KAWAI, A.; KAWAGUCHI, M.; HIBINOY, L. I. F.; SASAHARA, M.; TSUKADA, K.; HIRAGA, K. Simultaneous induction of galectin-3 phosphorylated on tyrosine residue, p21(WAF1/Cip1/Sdi1), and the proliferating cell nuclear antigen at a distinctive period of repair of hepatocytes injured by CCl₄. *Biochem Biophys Res Commun* 280(4):1077-1084, 2001.
 107. 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.
 108. 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. *J Biol Chem* 277:6852-6857, 2002.
 109. 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.
javascript:PopUpMenu2_Set(Menu11839755);
 110. YUAN, Y.; HILLIARD, G.; FERGUSON, T. & MILLHORN, D. E. Cobalts inhibit the interaction between hypoxia inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia inducible factor- α . *J Biol Chem* 278: 15911-15916, 2003.
 111. ZAGZAG, D.; ZHONG, H.; SCALZETTI, J.; LAUGHNER, E.; SIMONS, J. & SEMENZA, G. Expression of HIF-1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion and progression. *Cancer*; 88: 2006-2018, 2000.
 112. ZENG, M.; WEI, X.; WU, Z.; LI, W.; LI, B.; ZHEN, Y.; CHEN, J.; WANG, P, FEI, Y. NF- κ B mediated induction of autophagy in cardiac

- ischemia/reperfusion injury, *Biochem and Biophys Res Com*, 436: 180-185, 2013.
113. ZENG, Y.; DANIELSON, K. G.; ALBERT, T. J.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. *Bone Miner Res*, jun 25, 2007.
114. ZHANG, H. Y.; JIN, L.; STILLING, G. A.; RUEBEL, K. H.; COONSE, K.; TANIZAKI, Y.; RAZ, A.; LLOYD, R. V. RUNX1 and RUNX2 upregulate Galectin-3 expression in human pituitary tumors. *Endocrine*, 35(1):101-111, 2009.
115. ZHU, Y; PARADA, L. F. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Tumours. *Nature Reviews*, vol. 2, 616:626, 2002.
116. 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. *J Biol Chem* 283(32):22177-22185, 2008.

12) ANEXOS

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0993/09**, intitulado: "**AValiação DO MECANISMO DE EFEITO ANTI-APOPTÓTICO DE GALECTINA-3 EM CÉLULAS DE GLIOMA E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE ÁREAS DE PSEUDOPALIÇADA IN VIVO**", apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **DR. ROGER CHAMMAS**

Pesquisador (a) Executante: **DR. RAFAEL YAMASHITA IKEMORI**

CAPPesq, 04 de Novembro de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail:

cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

matc

Ademar Lopes
Roger Chammas
Hirofumi Iyeyasu

Oncologia para a Graduação

3ª Edição revisada e ampliada

Le mar

CAPÍTULO 15

CAPÍTULO 15 - ALTERAÇÕES METABÓLICAS ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

Rafael Yamashita Ikemori
Renata de Freitas Saito

A troca de oxidação fosforilativa mitocondrial pela glicólise aeróbia em tumores, denominada “efeito Warburg”, pode estar relacionada a alguns eventos adaptativos em tumores, conforme abaixo:

1) Embora o processo de fosforilação oxidativa seja 18 vezes mais eficiente que a glicólise, essa última, apresentada pelas células tumorais mesmo em condições normais de oxigênio (normóxia), favorece a produção mais rápida da energia necessária ao rápido crescimento dessas células. Esse fenômeno pode explicar as elevadas taxas de captação de glicose observadas na maioria dos tumores.

2) Glicólise realizada pelas células tumorais pode gerar compostos nocivos, como lactato e ácido carbônico, que, quando secretados, induzem acidose do microambiente extracelular. Por sua vez, essa acidose atua na seleção de células tumorais resistentes e pode favorecer a invasão tumoral por indução da morte de células normais, ao mesmo tempo em que suprime a resposta imune antitumoral.

3) Tumores também metabolizam glicose pela via alternativa a glicólise, a via fosfato pentose (PPP, do inglês *pentose phosphate pathway*), que gera NADPH (do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) e R5P (ribose-5-fosfato). NADPH é utilizado na síntese de ácidos graxos. Podendo atuar como molécula antioxidante e propiciar a sobrevivência celular no microambiente tumoral pró-oxidativo, além de interferir na resposta a agentes quimioterápicos. R5P é um precursor essencial para síntese de nucleotídeos.

O mecanismo molecular que leva ao efeito Warburg ainda não foi totalmente elucidado, porém estudos mostram que a ativação de vários oncogenes (incluindo o Akt e Myc) e do fator induzido por hipóxia (HIF-1) em células tumorais contribuem para esse fenômeno. Essas vias de sinalização envolvidas no metabolismo celular e alteradas em tumores resultam em vantagens adaptativas às células tumorais e serão abordadas ao longo deste capítulo.

Alterações metabólicas em tumores

Cânceres surgem com a proliferação descontrolada de células tumorais que adquirem essa capacidade por meio do ganho de função de oncogenes e perda de função de supressores tumorais. Foram classificadas seis principais alterações que ocorrem numa célula normal para que ela se torne uma célula tumoral: autossuficiência aos sinais de proliferação, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão a morte celular programada, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Recentemente, uma sétima alteração foi proposta: alteração do metabolismo celular.

Com o crescimento tumoral e distanciamento de vasos sanguíneos, células tumorais são expostas a baixas tensões de oxigênio, a privação de nutrientes e a baixas concentrações de medicamentos. Esse microambiente, desfavorável a sobrevivência celular, exerce pressão seletiva sobre essas células, resultando em células tumorais adaptadas a ele. Portanto, essa seleção favorece tanto a progressão tumoral quanto a quimiorresistência.

Entre as diversas alterações metabólicas apresentadas pelas células tumorais, algumas se destacam, como glicólise aeróbia, pois suas consequências repercutem em diversos aspectos da biogênese tumoral, como proliferação, morte celular, invasão e metástase.

Glicólise aeróbia – o efeito Warburg

Uma característica comum às células tumorais é o metabolismo alterado de glicose, no qual há prioritariamente a conversão de glicose em piruvato e lactato por meio da via de glicólise. Em células com taxas normais de proliferação, a glicólise é inibida pela presença de oxigênio, permitindo que a mitocôndria oxide piruvato em dióxido de carbono e água. Essa inibição foi denominada “efeito Pasteur”, pois Luís