VERÔNICA RODRIGUES TEIXEIRA

**Mecanismos associados à perda de expressão
do gene de galectina-3 em um modelo de
progressão de melanoma murino**

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

Área de concentração: Oncologia
Orientador: Dr. Roger Chammas

São Paulo
2007

Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.

(Shakespeare, Sonhos de Uma Noite de Verão).

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais
e aos meus irmãos
por todo amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que contribuíram para minha educação e formação pessoal. Por todo apoio e carinho constantes.

Aos meus irmãos, por todo amor e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Roger Chammas, pela minha orientação e por ter contribuído imensamente para o meu crescimento profissional. Admirável pela conduta como pesquisador e como ser humano.

À Dra. Anamaria Aranha Camargo, por ter me recebido em seu laboratório, por ter participado na minha orientação e pela força nos momentos difíceis.

À Dr. Maria Mitzi Brentani da Disciplina de Oncologia Experimental, do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o meu trabalho nesta Instituição.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em especial ao Dr. Fernando Soares, por permitir o acesso ao Banco de Tumores.

À Sueli Nonogaki pelas reações imunoistoquímicas.

Ao Raphael Salles Medeiros pelo auxílio nas análises de imunoistoquímica.

À Valéria Paixão pela sua paciência e disponibilidade.

À minha ex-orientadora, Elizabeth de Fátima Pires Augusto, por todo incentivo e apoio.

À minha orientadora de iniciação científica, Silvia Celina Alfieri, que me ensinou a seguir o rigor científico, e que contribuiu muito para a minha formação como pesquisadora.

Ao Sérgio, meu amigo do IPT, que me incentivou a fazer pós-graduação.

Ao Fabrício Falconi Costa pelos ensinamentos das técnicas de metilação e pelos momentos de discussão.

À Daniela Filipini Ierardi pela ajuda com os ensaios de metilação.

À Walesca K. Martins pelas amostras de melanoma humano.

Ao Ricardo P. Moura, do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig, por toda ajuda na padronização do PCR Real Time e nos experimentos de clonagem.

À Maria Cristina, do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig, pela ajuda no seqüenciamento e pela sua paciência.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig: Valéria, Newton, Érico, Ana Paula, Daniel, Fabiana, Raphael, Lílian I, Lílian II, Felícia, Murilo e Ana Cris.

Às amigas que fiz no laboratório e que serão amigas pra vida inteira: Luciana e Andréia. Por toda ajuda e principalmente pela amizade. Vocês tornaram esse período da minha vida muito mais agradável.

À amiga Mônica de Campos Pinheiro por sua amizade.

À amiga Izabel Cristina R. da Silva sempre disposta a ajudar.

Ao Giovani M. Fávero pelos momentos de descontração.

À Marilena que me trouxe ao laboratório e pela agradável convivência.

Aos colegas de laboratório: Mara, Fabiana, Ana Paula, Natália, Lara, Tharcísio, Patrícia Costa, Patrícia Braga, Guilherme e Raphael.

A todo o pessoal do LIM 24, professores, funcionários e alunos, que direta e indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho.

À Dona. Berê, Maria José, Ivonete, Cristina, Jair e Wilame pelo auxílio indispensável à elaboração deste trabalho.

À secretaria de pós-graduação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - MELANOMAS	1
1.1.1 – <i>Etiologia e aspectos clínicos da progressão de melanomas</i>	1
1.1.2 – <i>Bases moleculares da Progressão tumoral de melanomas</i>	4
1.2 – GALECTINAS	14
1.2.1 – <i>Galectina-3</i>	15
1.2.2 – <i>Galectina-3 em neoplasias</i>	21
1.3 – METILAÇÃO EM CÂNCER	25
2. OBJETIVO GERAL	32
2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 - APROVAÇÃO DA CAPPESQ	33
3.2 - CÉLULAS	33
3.3 - AMOSTRA DE TECIDO	34
3.4 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	34
3.5 - RT-PCR: REVERSE TRANSCRIPTASE PCR	35
3.5.1 - <i>Purificação do RNA</i>	35
3.5.2 - <i>Síntese de cDNA</i>	36
3.5.3 - <i>Reação de PCR</i>	37
3.6 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	38
3.7 - IDENTIFICAÇÃO DE ILHAS DE CpG E DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO SP1 <i>IN SILICO</i>	40
3.8 - AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA POR SEQUÊNCIAMENTO	40
3.8.1 – <i>Tratamento do DNA com bissulfito de sódio</i>	40
3.8.2 - <i>NESTED-PCR</i>	42
3.8.3 - <i>Purificação do produto de PCR</i>	44
3.8.4 - <i>Clonagem e transformação bacteriana</i>	45
3.8.5 - <i>PCR de colônia</i>	46
3.8.6 - <i>Reação de sequenciamento</i>	47
3.8.7 - <i>Precipitação da reação de sequenciamento</i>	48
3.9 - NORTHERN BLOT	48
3.9.1 - <i>Separação e transferência do RNA para a membrana</i>	48
3.9.2 - <i>Síntese da sonda</i>	49
3.9.3 - <i>Hibridização da membrana</i>	50
3.10 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	51
3.10.1 – <i>Extração de proteínas</i>	51
3.10.2 - <i>Dosagem de proteínas</i>	51
3.10.3 – <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS/PAGE</i>	52
3.10.4 – <i>Transferência para membrana PVDF: Western Blot</i>	53
3.11 – IMUNOPRECIPITAÇÃO	54
3.11.1 – <i>Lise celular</i>	54
3.11.2 – <i>Preclear do lisado</i>	54
3.11.3 – <i>Incubação com anticorpo específico</i>	54
3.12 - TRATAMENTO COM 5'-AZA-2'-DEOXCITIDINA, TRICOSTATINA E ACIDO- 4-FENILBUTÍRICO	55
3.13 - PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)	56
3.13.1 - <i>Desenho dos primers</i>	56

3.13.2 - PCR.....	58
3.14 – ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL	59
3.14.1 – Padronização das concentrações dos primers e da quantidade de cDNA	59
3.14.2 – Análise dos dados de expressão.....	62
4. RESULTADOS.....	65
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM UM MODELO DE PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMA MURINO.....	65
4.2 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-1 NAS LINHAGENS MELAN-A, TM1 E TM5. .	66
4.3 – AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i> DA PRESENÇA DE ILHAS DE CPG NO PROMOTOR DO GENE DE GALECTINA-3 MURINA.	67
4.4 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO 5’ DO GENE DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS DE MELANOMA MURINO.	69
4.6 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE DE GALECTINA-3 EM CÉLULAS TM1 TRATADAS COM AGENTES MODIFICADORES DA ESTRUTURA DA CROMATINA. .	74
4.7 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA DNA METILTRANSFERASE 1 (DNMT1) EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.	80
4.8 – CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA HUMANO.	83
4.9 - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE GALECTINA-3 EM AMOSTRAS DE MELANOMA HUMANO.	84
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
8. APÊNDICES	120
8.1 APÊNDICE 1	120
8.1 APÊNDICE 2	123

RESUMO

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

Galectina-3 é uma lectina animal que apresenta afinidade por β -galactosídeos e que tem sido associada à progressão tumoral e metástase. A expressão de galectina-3 encontra-se alterada durante a progressão tumoral de diferentes neoplasias. Em tumores como carcinoma de tiróide e bexiga a expressão de galectina-3 encontra-se aumentada, enquanto que em tumores como carcinoma de mama e ovário a expressão desta lectina encontra-se diminuída. Neste trabalho nós utilizamos um modelo de progressão tumoral de melanoma murino para investigar os mecanismos envolvidos na perda de expressão de galectina-3. Este modelo é composto por uma linhagem de melanócitos imortalizados (melan-a) e duas linhagens de melanoma de crescimento vertical (Tm1 e Tm5) estabelecidas após submeter a linhagem melan-a a inúmeros ciclos de de-adesão. Enquanto melan-a acumula grandes quantidades de galectina-3, as linhagens Tm1 e Tm5 deixaram de expressar o gene de galectina-3. Análise da região 5' do gene de galectina-3 demonstrou que esta região apresentava grande conteúdo de dinucleotídeos CpG e vários sítios SP1. O seqüenciamento desta região após tratamento do DNA com bissulfito de sódio mostrou que esta região estava totalmente metilada nas linhagens Tm1 e Tm5 e desmetilada na linhagem melan-a. O tratamento da linhagem Tm1 com 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR), um inibidor da DNA metiltransferase, provocou um decréscimo significativo nos níveis de metilação da região 5' do gene de galectina-3 que por sua vez levou a re-expressão do RNAm e da proteína. O tratamento de Tm1 com os inibidores de histono-

deacetilases tricostatina A e 4-ácido-fenilbutírico em combinação com 5-Aza-CdR não aumentou os níveis de expressão do gene de galectina-3 e curiosamente, reverteu o efeito induzido por 5-Aza-CdR. Em adição, a expressão da enzima DNMT1 apresentou um discreto aumento nas linhagens Tm1 e Tm5 em relação a melan-a. Em conjunto esses resultados sugerem que mecanismos epigenéticos como a metilação estão envolvidos no controle de expressão do gene de galectina-3 ao longo da progressão tumoral de melanoma murino.

Descritores: 1.Galectina 3 2.Expressão gênica 3.Metilação 4.Cromatina 5.Melanoma

ABSTRACT

Teixeira, VR. Mechanisms associated to the loss of galectin-3 gene expression in a model of murine melanoma progression. São Paulo [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Galectin-3 is a β -galactoside-binding animal lectin, shown to be involved in tumor progression and metastasis. Galectin-3 expression has been found altered along tumor progression of different tumors. In some types of cancers such as thyroid carcinoma and bladder carcinoma, galectin-3 expression has been found increased, whereas in tumors such as breast carcinoma and ovary carcinoma the expression of this lectin has been found decreased along tumor progression. In this study, we have used a murine melanoma model to investigate the mechanisms responsible for the loss of galectin-3 gene expression. This model consists of a cell line of immortalized melanocytes (melan-a) and two cell lines of vertical growth phase melanoma (Tm1 and Tm5) established after submitting melan-a cells to several deadhesion cycles. While melan-a expressed high amounts of galectin-3, both Tm1 and Tm5 cells lost galectin-3 gene expression. Analysis of the 5' upstream region of the galectin-3 gene demonstrated the presence of a high CpG content and several SP1 binding sites. Bisulfite sequencing of this region showed that it was fully methylated in Tm1 and Tm5 cells and unmethylated in melan-a cells. Treatment of Tm1 cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), a DNA methyltransferase inhibitor, led to a marked decrease in the methylation levels of the 5' upstream region of the galectin-3 gene, which led to transcription of the galectin-3 gene. Treatment of Tm1 cells with the histone-deacetylase inhibitors trichostatin A and 4-acid-phenilbutyrate in combination with 5-Aza-CdR did not increase the levels of galectin-3 gene expression and intriguingly, reverted the effect of 5-Aza-CdR alone.

In addition, the expression of DNMT1 showed a modest, but significant increase in Tm1 and Tm5 cells as compared with melan-a cells. Altogether these results indicate that epigenetic mechanisms such as methylation play a role in the regulation of the galectin-3 gene expression along murine melanoma progression.

Descriptors: 1.Galectin 3 2.Gene expression 3.Chromatin 4. Methylation
5.Melanoma

LISTA DE ABREVIATURAS

5-Aza-CdR - 5-aza-2'-deoxicitidina

APS - persulfato de amônio

CRD - domínio de reconhecimento de carboidrato

DAB - 3,3-tetraidrocloro de diaminobenzidina

DEPC - dietilpirocarbonato

DMSO - dimetilsulfóxido

DNMTs - DNA metiltransferases

dNTP - deoxinucleotídeo fosfato

DTT - dietiltrietaol

EDTA - ácido etileno diamino tetraacético

EGF - fator de crescimento epidermal

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HATs - histono-acetiltransferases

HDACs - histono-deacetilases

HMTs - histono-metilases

IPTG - isopropil-1-tio β -D-galactosídeo

LINE - do inglês, *Long Interspaced Element*

MBD - *methyl binding protein*

MOPS - 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico

MSP - do inglês, *Methylation Specific PCR*

PB - ácido-4-fenilbutírico

PBS - tampão fosfato salina

PCR - do inglês, *Polimerase Chain Reaction*

PMA - forbol miristato acetato

PMSF - fenilmetilsulfonilfluoreto

PVDF - do inglês, *Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride*

RGP - do inglês, *Radial Growth Phase*

ROS - do inglês, *Reactive Oxygen Species*

RT-PCR - do inglês, *Reverse Transcriptase PCR*

SDS - dodecil sódio sulfato

SDS-PAGE - do inglês, *SDS - Polycrylamide Gel Electroforesis*

SFB - soro fetal bovino

TBE - tris-ácido bórico-EDTA

TE - tris - EDTA

TEMED - N,N,N,N tetra metiletilenodiamina

TSA - tricostatina A

VGP - do inglês, *Vertical Growth Phase*

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

1. INTRODUÇÃO

Neste trabalho avaliamos os mecanismos envolvidos na perda de expressão de galectina-3 em um modelo de progressão de melanoma murino. Assim, discorreremos a seguir sobre melanomas, destacando as principais características e alterações moleculares envolvidas na gênese deste tipo tumor. Além disso, descreveremos as principais características e funções de galectina-3, dando ênfase ao seu envolvimento no processo de progressão tumoral. Finalmente, discorreremos sobre o mecanismo de metilação, enfatizando seu papel no controle de expressão gênica e seu envolvimento no processo neoplásico.

1.1 - MELANOMAS

1.1.1 – Etiologia e aspectos clínicos da progressão de melanomas

Melanomas são neoplasias que se desenvolvem a partir da transformação maligna de melanócitos, células produtoras de pigmento que ocorrem na camada basal da epiderme, na coróide, na região bulbar dos folículos pilosos e em leptomeninges¹. Quando o melanoma começa na pele ele é chamado de melanoma cutâneo. Ele pode também ocorrer no olho (melanoma ocular ou intra-ocular) e, raramente, noutras áreas onde existem melanócitos como o tubo digestivo e as meninges.^{1, 2} O melanoma cutâneo é o menos freqüente de todos os tipos de câncer de pele, constituindo apenas 4% de todos os tumores dermatológicos, porém é também o mais agressivo, sendo responsável por aproximadamente 80% dos casos de morte de câncer de pele.²⁻⁴

A incidência de melanoma tem aumentado significativamente nos últimos anos. Nos Estados Unidos a incidência desse tipo de tumor quase triplicou nas últimas quatro décadas.³ A Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer*

Society) prevê para o ano de 2006 nos Estados Unidos cerca de 62.190 novos casos de melanoma com aproximadamente 7.910 casos de morte.^{3, 4} No Brasil as informações epidemiológicas sobre a doença são limitadas, mas segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2006, o melanoma poderá acometer cerca de 5.760 indivíduos, sendo previstos 2.710 casos novos entre os homens e 3.050 casos novos entre as mulheres.⁵

Como observado em outros tipos de câncer, tanto fatores de predisposição genética como fatores de exposição ambiental contribuem para o desenvolvimento do melanoma.⁶ Indivíduos com pele clara e com alta sensibilidade ao sol (que apresentam queimaduras pelo sol e não bronzeamento) apresentam uma maior susceptibilidade de desenvolver melanoma que indivíduos de pele escura.⁷ A exposição ao sol e, mais especificamente à radiação ultravioleta (UV), é o fator ambiental de maior risco para o desenvolvimento de melanomas.⁸⁻¹⁰ Alguns estudos epidemiológicos sugerem que o risco de desenvolver melanoma está significativamente mais associado com um padrão de exposição intenso e intermitente ao sol que com um padrão de exposição cumulativo.¹¹ Além disso, outros estudos demonstraram que a incidência desse tipo de tumor está inversamente relacionada com a latitude de residência.¹² Por exemplo, a incidência de melanoma cutâneo é oito vezes maior na Austrália que na Inglaterra.^{12, 13} O histórico familiar de melanoma também é um fator de risco relacionado com a incidência desse tipo de câncer de pele. Aproximadamente 10% dos pacientes com melanoma apresentam um parente afetado pela doença.¹⁴ Indivíduos pertencentes a famílias com síndromes hereditárias com risco elevado para o desenvolvimento de melanoma apresentam um grande número de nevos que, podem ser benignos ou atípicos (nevo displásico ou displástico). Nevos displásicos constituem lesões precursoras ou marcadoras para o desenvolvimento de melanomas e, indivíduos com esse tipo de nevo apresentam um risco relativo pelo menos 89 vezes maior de

desenvolvimento de melanomas do que indivíduos da população geral; e quando portadores de um melanoma primário, seu risco para o desenvolvimento de um segundo melanoma primário é 230 vezes maior que o de indivíduos da população geral.¹⁵

Portadores da Síndrome genética *Xeroderma pigmentosum* (XP), que apresentam o sistema de reparo de DNA comprometido e, portanto, são incapazes de excisar e reparar os dímeros de timidina, freqüentemente formados por indução de radiação ultravioleta, possuem um risco 1.000 vezes maior para o desenvolvimento de melanoma que os indivíduos da população geral.¹⁶

Baseando-se na localização anatômica e no padrão de crescimento do tumor, Clark, Elder & Guerry propuseram um modelo que enfatiza as mudanças histológicas que acompanham a transformação de melanócitos em melanoma.¹⁷ Segundo esse modelo, a progressão de melanomas pode ser dividida em cinco fases histológicas distintas: nevos comuns, nevos atípicos ou displásicos, melanomas de crescimento radial (*radial growth phase*, RGP), melanomas de crescimento vertical (*vertical growth phase*, VGP) e melanomas metastáticos (Figura 1).

(1) nevos comuns (ou lesões névicas) representam lesões melanocíticas iniciais originadas a partir da proliferação de melanócitos. Esses nevos são locais onde há aumento da presença de melanócitos e hiperpigmentação. Com exceção de seu significado cosmético, nevos são importantes somente pela sua relação com o surgimento de melanomas. Em geral, as células que formam esses nevos apresentam tempo de vida finito.

(2) nevos displásicos são lesões caracterizadas por um crescimento aberrante e que podem ocorrer a partir de lesões névicas pré-existentes ou como uma nova lesão. Tais lesões são assimétricas, apresentando bordas irregulares,

aumento de diâmetro e de coloração. Histologicamente, essas lesões possuem atipia citológica e arquitetural.

(3) melanoma de crescimento radial (RGP) são lesões com atipia citológica contínua formada por células neoplásicas presentes tanto na epiderme como na derme. Enquanto na epiderme estas células encontram-se em ativa proliferação, na derme estas células, como no caso dos nevos comuns, não apresentam capacidade de proliferação.

(4) melanoma de crescimento vertical (VGP) são lesões formadas por células neoplásicas com capacidade de proliferar na derme e no tecido subcutâneo. Essas células dissociam-se da lesão primária, migram através do estroma, penetram nos vasos sanguíneos ou linfáticos e, finalmente disseminam-se para outros órgãos, onde proliferam e se estabelecem como um foco metastático, caracterizando assim o estágio denominado (5) melanoma metastático.¹⁷

A detecção de melanomas em estágios iniciais de desenvolvimento é muito importante para o tratamento clínico do paciente, uma vez que estes são curáveis cirurgicamente.¹⁸ Assim sendo, a identificação das alterações moleculares envolvidas em cada uma das fases da progressão de melanomas, principalmente, aquelas que promovem a transição do melanoma de crescimento radial, que é curável por excisão cirúrgica, para o melanoma de crescimento vertical, é muito importante para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos.

1.1.2 – Bases moleculares da Progressão tumoral de melanomas.

Ao longo da progressão tumoral de melanomas ocorrem várias alterações celulares e moleculares que promovem a conversão do fenótipo de cada tipo celular para o tipo seguinte.¹⁹ Vários estudos têm demonstrado que tais alterações são consequência da disfunção de várias moléculas associadas à manutenção da homeostasia celular como aquelas envolvidas no processo de proliferação, controle

de crescimento celular, sobrevivência, morte celular, adesão e degradação da matriz extracelular.¹⁹⁻²⁴

Figura 1. Fases da progressão de melanomas. Melanócitos são células produtoras de melanina que se encontram localizados na membrana basal da epiderme. Segundo modelo proposto por Clarck, a progressão de melanomas é dividida em 5 fases histológicas distintas: (1) nevos benignos: lesões caracterizadas pela presença de melanócitos com crescimento limitado e localizados ao longo da membrana basal. (2) nevos displásticos: lesões com atipias arquitetural e estrutural. (3) melanoma de crescimento radial – RGP: lesões com atipias citológicas formadas por células neoplásicas com capacidade de proliferar na epiderme. Estas células podem penetrar na derme, porém não proliferam neste local. (4) melanoma de crescimento vertical – VGP: lesões formadas por células neoplásicas que apresentam capacidade de atravessar a camada basal e proliferar tanto na epiderme como na derme. (5) melanoma metastático: formado por células neoplásicas que se dissociam da lesão primária, penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos disseminando-se para outras regiões onde proliferam como focos metastáticos. Adaptado de Arlo J. Miller e Martin C. Mihm. N. Engl. J. Med. 355: 51-65 (2006).

Um dos primeiros eventos moleculares que caracterizam a transformação maligna de melanócitos está associado à perda do controle normal de crescimento dos melanócitos. Em condições normais, o controle de proliferação dos melanócitos é estabelecido através da sua interação com queratinócitos na camada basal da epiderme. A interação entre melanócitos e queratinócitos é mediada por moléculas de E-caderinas presentes na membrana dos dois tipos celulares.^{25, 26}

As E-caderinas são moléculas de adesão celular encontradas em especializações da membrana: as junções aderentes. O domínio intracelular dessa proteína está associado com o recrutamento de um complexo de proteínas, entre elas a β -catenina.²⁷ Quando livres no citoplasma, as β -cateninas podem ser translocadas para o núcleo onde se ligam a fatores de transcrição que estimulam a proliferação. Com a formação das junções aderentes, as β -cateninas são recrutadas, diminuindo o estímulo de proliferação. Assim, alterações na expressão de E-caderinas afetam a via de sinalização mediada pelas β -cateninas e conseqüentemente a proliferação celular.²⁷⁻²⁹

A expressão de E-caderina encontra-se diminuída em lesões névicas, e parece que há uma diminuição progressiva da expressão dessa molécula ao longo da progressão tumoral de melanomas.²⁵ Paralelamente, a diminuição da expressão de E-caderina é acompanhada por um aumento progressivo na expressão de N-caderina, expressa, por exemplo, por fibroblastos dérmicos e células endoteliais. Tal troca de perfil das caderinas potencializa a interação dos melanócitos com os fibroblastos e com células endoteliais.³⁰ A interação entre células de melanoma e fibroblastos dérmicos parece estar associada não só à persistência da lesão, mas também da sua progressão para metástase.^{25, 26, 30}

A transformação maligna de melanócitos também tem sido associada a um aumento da atividade de vias de transdução de sinal relacionadas à proliferação e crescimento celular. Em estágios iniciais do desenvolvimento de melanomas

verifica-se uma ativação anormal da via de sinalização RAS→RAF→MEK→ERK (Figura 2).^{31, 32} Quando ativo RAS fosforila e ativa a proteína RAF (MAPK quinase quinase), que fosforila e ativa a proteína MEK (MAPK quinase), que, por sua vez fosforila e ativa uma proteína MAPK, a proteína ERK (*Extracellular-Activated Protein Kinase*). Quando ativada ERK é translocada para o núcleo, onde fosforila e ativa fatores de transcrição envolvidos na proliferação e no crescimento celular.^{33, 34} A ativação anormal dessa via ocorre devido a mutações somáticas nos genes *N-Ras*, identificadas em cerca de 10 a 20% dos casos de melanoma, ou em *BRAF*, que está associada à aproximadamente 50% dos melanomas.^{31, 32, 35-37} No entanto, a ativação da via RAS→RAF→MEK→ERK, independentemente da presença de mutação em *N-Ras* e *BRAF* também tem sido demonstrada em melanomas.³⁹

O efeito oncogênico de Ras, independentemente da ativação de RAF, também tem sido demonstrado durante o desenvolvimento de melanomas. Neste caso, RAS ativa uma outra via de transdução de sinal, a via PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase).³⁹

A PI3K é uma enzima que, em resposta a ação de uma variedade de fatores de crescimento, promove a fosforilação do fosfatidilinositol bi-fosfato (PIP2), um fosfolípídio de membrana, convertendo-o em fosfatidilinositol tri-fosfato (PIP3). Assim, ocorre um aumento nos níveis intracelulares de PIP3. Esse aumento provoca a ativação da proteína quinase B (PKB ou AKT) que, por sua vez fosforila e inativa proteínas que bloqueiam o ciclo celular ou estimulam a apoptose, portanto, facilitando a proliferação e a sobrevivência das células ⁴⁰ (Figura 2).

A via de transdução de sinal da PI3K tem sido implicada na progressão de melanomas não somente através da ação do oncogene *Ras*, mas principalmente pela perda do gene supressor de tumor *PTEN* (*Phosphatase and tensin homologue*).^{41, 42} Diversos trabalhos têm mostrado que a perda de *PTEN* é um evento importante para o desenvolvimento de melanomas, principalmente os não

hereditários.⁴² Cerca de 30 a 50% dos melanomas apresentam *PTEN* inativado, seja por mutação, deleção ou metilação do seu promotor.^{43, 44} O gene *PTEN* codifica uma fosfatase que degrada PIP3, mantendo seus níveis baixos.⁴⁵ Na sua ausência, os níveis de PIP3 e de AKT fosforilado aumentam. Esse aumento da atividade de AKT prolonga a sobrevivência celular, através da inativação de sinais pró-apoptóticos e, aumenta a proliferação celular por aumentar a ativação de vias mitogênicas⁴⁶ (Figura 2).

Figura 2. Representação das vias de MAPK e PI3K envolvidas na progressão de melanomas. As MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) estão envolvidas na sinalização de uma série de fatores de crescimento e receptores de superfície celular. Em geral, a ligação de fatores de crescimento ao seu respectivo receptor provoca a ativação de RAS. Quando ativo RAS fosforila e ativa a proteína RAF, que fosforila e ativa a proteína MEK, que, por sua vez fosforila e ativa a proteína ERK. Quando ativada ERK é translocada para o núcleo, onde fosforila e ativa fatores de transcrição envolvidos na proliferação e no crescimento celular. Mutações em *N-Ras* e *BRAF* levam a ativação da via das MAPKs independentemente da ligação de fatores de crescimento e são freqüentemente associadas ao desenvolvimento de melanomas. Mutações em *Ras* também pode levar a ativação da via PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase). A PI3K é ativada por diversos fatores de crescimento. PI3K ativo converte o lipídio de membrana PIP₂ em PIP₃ que atua como um segundo mensageiro levando a fosforilação e ativação de AKT que por sua vez inativa proteínas que bloqueiam o ciclo celular (p27) ou estimulam a apoptose (BAD) e ativa fatores de transcrição como FKHR, favorecendo a proliferação e a sobrevivência das células. PTEN inibe a sinalização dessa via por impedir a fosforilação da PIP₃ pela PI3K. A ativação constitutiva dessa via pode ocorrer através da perda ou mutação do gene *PTEN*. A inativação de *PTEN* ocorre em cerca de 30 a 50% dos melanomas. Adaptado de Arlo J. Miller e Martin C. Mihm. *N. Engl. J. Med.* 355: 51-65 (2006).

Moléculas envolvidas no controle do ciclo celular também encontram-se alteradas ao longo da progressão de melanomas.⁴⁷ Cerca de 25 a 40% dos casos de melanomas de origem familiar apresentam uma deleção na região do cromossomo 9p21 que corresponde ao *locus CDKN2A*⁴⁸ (Figura 3). Este *locus* apresenta dois genes supressores de tumor: *p16^{INK4A}* e *p19^{ARF}* que, apesar de compartilharem seqüências nucleotídicas no éxon 2 são transcritos independentemente e traduzidos em quadro de leitura alternado.⁴⁹

O gene supressor de tumor *p16^{INK4A}* codifica uma proteína que bloqueia a transição G1→S do ciclo celular por inibir a atividade de duas quinases dependentes de ciclinas, a CDK4 e a CDK6. Essas quinases formam complexos com um cofator protéico, a ciclina D, e fosforilam RB, um regulador da transição G1→S do ciclo celular. A fosforilação de RB libera o fator de transcrição E2F, que irá promover a transcrição de genes essenciais para a transição G1→S. Portanto, a proteína *p16^{INK4A}* impede a fosforilação de RB e, conseqüentemente a liberação do fator de transcrição E2F, através da inibição do complexo ciclina D/CDK4,6⁵⁰ (Figura 3). Muitos trabalhos têm relatado que a perda das funções de *p16^{INK4A}*, devido a deleções e hipermetilção do promotor, é um evento comum na gênese de melanomas.⁵¹⁻⁵³

A proteína *p19^{ARF}* controla os níveis de um outro gene supressor de tumor, o *p53*. A *p53* é uma das principais proteínas envolvidas no controle de proliferação e morte celular. A sua ativação é gerada em resposta a diversos tipos de estresse genotóxico. A atividade de *p53* é controlada pela proteína MDM2, que promove a degradação de *p53* via proteassoma. A MDM2, por sua vez tem sua atividade inibida por *p19^{ARF}*. Assim, em resposta a um dano no DNA, *p19^{ARF}* bloquearia os sinais de repressão de MDM2, promovendo um acúmulo de *p53* que, por sua vez bloquearia a transição G2→M do ciclo celular para que o DNA fosse reparado.^{54, 55} A perda de *p19^{ARF}*, por outro lado, provocaria um acúmulo de lesões no DNA, que

favoreceria a instabilidade genética e conseqüentemente o processo de transformação maligna (Figura 3).⁵⁶ Estudos em modelos animais demonstram que a perda de $p19^{ARF}$ diminuí o tempo necessário para desenvolvimento de melanomas após exposição à radiação ultravioleta.⁵⁷ Esses dados mostram como $p19^{ARF}$ favorece o desenvolvimento de melanomas e ainda, indica que a baixa frequência de mutações de $p53$ em melanomas é parcialmente relacionada à perda de $p19^{ARF}$.⁵⁶

Figura 3. O locus *CDKN2A* e o mecanismo de ação dos genes supressores de tumor *p16^{INK4a}* e *p19^{ARF}*. O locus *CDKN2A* é formado por 4 éxons e codifica dois genes supressores de tumor: *p16^{INK4a}* e *p19^{ARF}*. *p16^{INK4a}* é traduzido a partir do *splicing* dos éxons E1A, E2 e E3 enquanto *p19^{ARF}* é traduzido a partir do *splicing* dos éxons E1B, E2 e E3. Entretanto, o éxon E2 é traduzido em quadro de leitura alternado quando utilizado para codificar *p19^{ARF}*. As proteínas codificadas por esse locus participam do controle do ciclo celular. *p16^{INK4a}* inibe a formação do complexo ciclina D/CDK4,6. Esse complexo promove a fosforilação de Rb promovendo dessa forma a liberação do fator de transcrição E2F que promove a transcrição de genes essenciais para a transição G1/S do ciclo celular. A ausência de *p16^{INK4a}* provoca uma ativação anormal do complexo ciclina D/CDK4,6 e conseqüentemente aumenta a proliferação celular. A proteína *p19^{ARF}* controla os níveis de p53 por sequestrar a proteína MDM2. Na presença de *p19^{ARF}* p53 se estabiliza e sua atividade aumenta. P53 então ativa genes envolvidos na parada do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Na ausência de *p19^{ARF}* MDM2 se liga a p53 promovendo a ubiquitinação e posterior degradação de p53 via proteassoma. A diminuição dos níveis de p53 contribui para a proliferação de células com DNA danificado e conseqüentemente favorece o processo de tumorigênese. Adaptado de Arlo J. Miller e Martin C. Mihm. N. Engl. J. Med. 355: 51-65 (2006).

A invasão local e o processo de metástase estão associados com um aumento da mortalidade em melanomas. Como mencionado anteriormente, as características invasivas do melanoma aparecem na fase de crescimento vertical (VGP), quando as células de melanoma que penetram na derme começam a proliferar ativamente. O melanoma metastático se desenvolve quando as células tumorais dissociam-se da lesão primária, migram através do estroma e invadem vasos sanguíneos e linfáticos para formar tumor em sítios distantes.⁵⁸ A invasão e a disseminação de melanomas estão associadas a alterações na expressão de moléculas de adesão. A migração de células de melanoma está associada a uma diminuição dos níveis de E-caderina. Sendo que a progressão da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical é caracterizada por uma perda de E-caderina e um aumento da expressão de N-caderina. A expressão de N-caderina pelas células de melanoma torna-as capaz de interagir com outras células que também expressam essa molécula como os fibroblastos dérmicos e as células do endotélio vascular.^{25, 26, 30} A migração de melanócitos transformados para a derme também é mediada por outras moléculas de adesão celular como as integrinas. As integrinas são proteínas que interagem com componentes da matriz extracelular como a fibronectina, a laminina e os colágenos.⁵⁹ A migração dos melanócitos transformados pela membrana basal é mediada pela ação das integrinas $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha 7 \beta 1$ que reconhecem a glicoproteína laminina, um componente da membrana basal.⁶⁰⁻⁶² Na fase de crescimento vertical a migração das células de melanoma pelo estroma intersticial é mediada pela ação de uma outra integrina, a integrina $\alpha v \beta 3$.⁶³ Esta integrina induz a expressão da metaloprotease de matriz 2 (MMP2), uma enzima que degrada o colágeno presente na membrana basal. Diferenças na expressão dessa metaloprotease durante a progressão tumoral de melanomas tem sido relatada. Estudos *in vitro* mostraram que melanócitos não expressam MMP2.^{64, 65}

À medida que a progressão tumoral de melanomas evolui da fase de crescimento radial para a de crescimento vertical há um aumento no número de células que compõe a massa tumoral. Com o aumento da massa tumoral há a necessidade de aumentar o aporte de oxigênio e nutrientes para manter o tumor. Assim, fatores que induzem a formação de vasos sangüíneos e linfáticos passam a ser expressos e secretados pelas células de melanoma, garantindo o influxo de oxigênio e de nutrientes para o tumor. Um aumento na expressão de fatores angiogênicos como FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos básico) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) tem sido observado em melanomas. Esses fatores induzem a formação de vasos sangüíneos e linfáticos que são essenciais para manter o aporte de nutrientes necessários para o crescimento tumoral, a invasão e a metástase.⁶⁶⁻⁶⁸

Como descrito acima, a progressão de melanomas é um processo bem caracterizado morfológicamente. No entanto, os eventos moleculares envolvidos nesse processo ainda não são completamente compreendidos, apesar da participação de algumas moléculas específicas já ter sido esclarecida. Portanto, uma análise mais detalhada das alterações moleculares que ocorrem durante a progressão tumoral, principalmente nos estágios iniciais, irá permitir a identificação de marcadores moleculares, abrindo novas perspectivas de diagnóstico e tratamento.

1.2 – GALECTINAS

Galectinas são proteínas pertencentes à família das lectinas animais que apresentam duas características principais: afinidade por oligossacarídeos contendo β -galactose e alto grau de similaridade no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD).^{69,70} Essas proteínas são amplamente distribuídas pelo reino

animal, sendo encontradas tanto em vertebrados como peixes, pássaros, anfíbios e mamíferos, como em invertebrados como insetos e helmintos.⁷¹⁻⁷³

Até o momento, 15 tipos distintos de galectinas já foram identificados em uma grande variedade de tecidos de diversas espécies. Essas lectinas são classificadas em três grandes grupos de acordo com o número e a organização estrutural do CRD: protótipo, repetição em *tandem* e químera. As galectinas do grupo protótipo apresentam estrutura composta por uma sequência N-terminal curta e um único CRD. Este grupo inclui as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15. As galectinas do grupo repetição em *tandem* caracterizam-se pela presença de dois CRD diferentes unidos por uma sequência curta de cerca de 70 aminoácidos. Pertencem a este grupo as galectinas 4, 6, 8, 9 e 12. As galectinas do grupo químera, por sua vez, apresentam um único CRD conectado ao domínio N-terminal que possui sequências de tirosina, prolina e glicina que se repetem de 8 a 12 vezes. O único representante desse grupo é a galectina-3.^{73, 74}

1.2.1 – Galectina-3

De todas as galectinas identificadas até o momento, a galectina-3 é uma das mais estudadas. A galectina-3 é uma proteína monomérica com cerca de 30 a 35 kDa e é composta por 3 domínios estruturais distintos: o domínio amino terminal composto de 12 aminoácidos, uma sequência colágeno-símile rica em glicina, tirosina e prolina, a qual serve como substrato para metaloproteinases e o domínio carboxi terminal, estrutura globular onde está localizado o CRD ⁷⁵.

Embora seja encontrada como um monômero quando em solução, a galectina-3 pode se polimerizar formando oligômeros quando se liga a superfícies contendo glicoconjugados multivalentes. Esse tipo de interação envolve o seu domínio amino-terminal e é responsável pela formação de redes. Ainda, a galectina-3 pode fazer uma ponte molecular entre as células ou entre as células e a

matriz extracelular. Esse tipo de interação envolve tanto o seu domínio amino-terminal como o domínio carboxi-terminal.⁷⁶⁻⁷⁹

A galectina-3 pode ser encontrada tanto no meio intracelular (citoplasma e núcleo) como no meio extracelular.^{71, 76, 80} No entanto, o mecanismo pelo qual galectina-3 é secretada para o meio extracelular ou transportada para os diferentes compartimentos celulares ainda não é conhecido. Sabe-se que esta proteína não é transportada pela via clássica de secreção (complexo golgi-retículo), pois não apresenta peptídeo sinal. Existem evidências de que a porção amino-terminal dessa proteína esteja envolvida no seu endereçamento, já que a deleção dessa porção provocou uma alteração na compartimentalização e na função da galectina-3. Ainda, nas células que expressam a forma truncada da proteína, ou seja, sem o domínio amino-terminal verifica-se que a galectina-3 está localizada preferencialmente no citoplasma, não sendo encontrada no núcleo, na superfície celular ou sendo secretada.^{76, 81}

A galectina-3 é expressa por células inflamatórias (monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos), fibroblastos, células dendríticas, neurônios e uma ampla variedade de células epiteliais (intestino, rim, pele, mama, glândulas salivares).⁸²⁻⁸⁴

A galectina-3 está envolvida em diversos processos biológicos, tais como apoptose, proliferação celular, migração e adesão celular. Sendo que a diversidade de funções exercida por essa lectina está associada tanto com a sua localização bem como com o tipo de molécula com quem essa proteína interage.⁸⁵⁻⁹² Sabe-se que o domínio amino-terminal da proteína exerce papel importante nas suas funções, pois este é responsável tanto pela sua localização como também por sua agregação.^{76, 81}

A galectina-3 presente no meio extracelular pode interagir com glicoconjugados presentes na superfície celular e também com proteínas da matriz

extracelular (ECM), modulando dessa forma, interações do tipo célula-célula e célula-matriz. Vários estudos têm relatado que galectina-3 atua como uma molécula de de-adesão celular.⁸⁹⁻⁹² Ochieng *et al.*, 1998,⁹³ utilizando diversos tipos de células tumorais, mostraram que a galectina-3 inibiu a adesão dessas células a vários substratos da matriz extracelular (colágeno IV, fibronectina e laminina), através de sua interação com a integrina $\alpha 1\beta 1$ em um padrão dependente de lactose. Mais recentemente Melo *et al.* (manuscrito em preparação) mostraram que células de sarcoma que expressam galectina-3 são mais migratórias em superfície de laminina do que as células que não expressam essa lectina. Nesse mesmo sentido, Villa-Verde e colaboradores, (2002)⁹² mostraram que galectina-3 inibiu a interação entre timócitos e as células epiteliais do timo, acelerando a liberação dos timócitos e, dessa forma, agindo como uma molécula de de-adesão. Além de apresentar características anti-adesivas, essa molécula apresenta propriedades pró-adesivas. Por exemplo, a galectina-3, promove a adesão de neutrófilos humanos a laminina durante o processo inflamatório.⁹⁴

Ainda no espaço extracelular a galectina-3, tanto na forma de dímero como de oligômero, pode promover a ligação cruzada entre glicoconjugados presentes na superfície celular e, dessa maneira, provocar a ativação de vias de sinalização associadas a apoptose e a proliferação celular.⁹⁵⁻⁹⁷

Intracelularmente, a galectina-3 pode ser encontrada tanto no citoplasma como no núcleo.⁹⁸ A galectina-3 presente no citoplasma está envolvida no controle do processo de apoptose,^{85, 86} enquanto que a galectina-3 nuclear está envolvida no processo de *splincing* de RNA e na ativação de fatores de transcrição específicos (AP-1 e TTF-1, por exemplo).^{85, 99-101}

De forma semelhante ao observado para o processo de adesão celular, a galectina-3 pode atuar inibindo ou estimulando a proliferação celular.^{89, 102-104} Inohara e *et al.*, (1998)¹⁰² mostraram que fibroblastos incubados com galectina-3

recombinante apresentavam um aumento na sua capacidade de proliferação. Sendo este efeito dependente da concentração de galectina-3 e da ligação da proteína a glicoconjugados presentes na superfície celular. Liu e colaboradores, (1996) ¹⁰⁵ demonstraram que a galectina-3 endógena também pode estimular a proliferação celular. Esses autores mostraram que células T de linfoma humano (Jurkat) transfectadas com galectina-3 cresciam mais rapidamente que os transfectantes controle. Mais recentemente, Raz e colaboradores mostraram que a inibição da expressão de galectina-3 em linhagens de carcinoma de mama e de tireóide provocou uma diminuição do crescimento dessas células *in vivo*. ^{106, 107} De maneira geral, esses trabalhos indicam que galectina-3 atua como um regulador positivo da proliferação, estimulando o crescimento celular. Entretanto, estudos recentes têm mostrado que galectina-3 pode atuar regulando negativamente a proliferação celular. Em um trabalho com células de câncer de próstata transfectadas com galectina-3 foi verificado que a expressão de galectina-3 por estas células provocou uma diminuição na sua velocidade de crescimento tanto *in vitro* como *in vivo*. ¹⁰⁸

Os mecanismos pelos quais galectina-3 regula o processo de proliferação celular ainda não são totalmente compreendidos. Estudos recentes têm mostrado que galectina-3 pode regular a expressão de proteínas do ciclo celular, como ciclinas (Ciclinas A e E) e inibidores das quinases dependentes de ciclina (p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}), mediar a ativação de vias de sinalização (via Wnt) e aumentar a expressão de fatores de transcrição como TTF-1. ^{89, 101, 109} Raz e colaboradores em estudos *in vitro* com linhagens de câncer de mama mostraram que galectina-3 inibe a progressão G1→S do ciclo celular por diminuir a expressão das ciclinas A e E e aumentar a expressão dos inibidores do ciclo celular p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}. ⁸⁹ Em outro estudo, Paron e colaboradores mostraram que galectina-3 modula e interage com um importante fator de transcrição envolvido na

proliferação de células de tireóide, o fator de transcrição TTF-1.¹⁰¹ Mais recentemente foi demonstrado que a galectina-3 se liga a β -catenina, uma proteína intracelular relacionada com o controle da progressão do ciclo celular através da via de sinalização Wnt, e essa ligação promove a ativação da ciclina D1.¹⁰⁹

Diversos estudos têm fornecido evidências que confirmam o papel de galectina-3 como uma molécula anti-apoptótica. Linfócitos B transfectados com galectina-3 são significativamente mais resistentes a apoptose induzida por estaurosporina e pelo anticorpo anti-Fas.^{105, 110} Da mesma forma, um estudo de Raz e colaboradores, (1997) mostrou que células de câncer de mama que expressam galectina-3 são mais resistentes a apoptose induzida por perda de ancoragem (*anoikis*).¹¹¹ Em concordância, macrófagos de camundongos *knockout* para o gene de galectina-3 são mais sensíveis a apoptose que macrófagos de camundongos controle.¹¹²

O mecanismo pelo qual galectina-3 exerce sua atividade anti-apoptótica não é totalmente conhecido, porém há evidências que sugerem que após um estímulo apoptótico, a galectina-3 é translocada do núcleo ou do citoplasma para a mitocôndria, onde previne a perda da integridade mitocondrial e inibe a liberação de citocromo c.^{86, 113} Um trabalho recente de Raz e colaboradores (2005) demonstrou que a galectina-3 aumenta a resistência de células de carcinoma de bexiga a apoptose induzida pela molécula TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) por aumentar a atividade da via de sinalização PI3K/Akt. A ativação de Akt inibe a apoptose por bloquear a clivagem de BID, que por sua vez é essencial para a liberação de citocromo c da mitocôndria.¹¹⁴

O mesmo grupo demonstrou que a atividade anti-apoptótica de galectina-3 é regulada por fosforilação.⁸⁸ A fosforilação da galectina-3 ocorre nos resíduos de serina⁶ pela ação da caseína quinase I.¹¹⁵ Quando este resíduo de serina é mutado, a galectina-3 não pode ser fosforilada e sua atividade anti-apoptótica é diminuída,

sugerindo que a fosforilação nesta posição é crucial para a função anti-apoptótica da proteína.⁸⁸ Além disso, a fosforilação é essencial para a exportação da galectina-3 do núcleo após estímulo apoptótico.¹¹⁶

A porção carboxi-terminal da galectina-3 humana apresenta os mesmos aminoácidos do motivo ¹⁸⁰NWGR¹⁸³ (Asp-Trp-Gly-Arg) conservado no domínio BH1 da família do gene anti-apoptótico *Bcl-2*.¹⁰⁵ Na proteína *bcl-2*, esse motivo é responsável pela sua função como molécula anti-apoptótica. A substituição do aminoácido glicina 182 para alanina (G182A) no motivo NWGR, aboliu a atividade anti-apoptótica de galectina-3, demonstrando que esse motivo é importante para essa função de galectina-3.¹¹¹ Entretanto, não está claro se este motivo na galectina-3 funciona da mesma maneira que na proteína *bcl-2*.

Mais recentemente tem sido demonstrado que galectina-3 também pode atuar como uma molécula pró-apoptótica. Um estudo mostrou que a galectina-3 endógena modula a apoptose através da via de sinalização CD95 (APO-1/Fas) em células T.⁸⁷ Outro estudo mostrou que a galectina-3 exógena também pode mediar a apoptose através de sua interação com o complexo C29/CD7 presente na superfície de linfócitos.¹¹⁷

A multiplicidade de funções exercidas pela galectina-3 sugere que a expressão e a atividade dessa molécula sejam finamente reguladas. Tal regulação pode ser exercida através de sua localização celular, da glicosilação ou da modulação da expressão de seus ligantes e, principalmente através do seu controle transcricional.¹¹⁸

A galectina-3 humana é codificada pelo gene *LGALS3* localizado no cromossomo 14, o qual é formado por seis éxons e cinco introns. Exceto pela estrutura do éxon 1 e pela organização dos sítios de início de transcrição, a estrutura do gene de galectina-3 humana é similar à do murino. O promotor do gene de galectina-3 humana, assim como o promotor murino, não apresenta seqüências

TATA a montante do início de transcrição. Entretanto esta região é rica em seqüências CpG, apresenta múltiplas seqüências que são reconhecidas como sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1 e sítios de ligação CRE (elemento responsivo a cAMP), SIE (*sis-inducible element*) e AP1.^{119, 120} Até o momento pouco se sabe sobre o controle da expressão do gene de galectina-3. Sabe-se, no entanto, que a expressão de galectina-3 pode ser modulada sob certas condições como a inflamação e a infecção. Por exemplo, a expressão de galectina-3 encontra-se aumentada no citoplasma de hepatócitos de ratos em resposta a inflamação provocada pela administração de CCl₄.¹²¹ Ainda, a infecção com o vírus HTLV-1 (linfotrófico T humano tipo 1) ou com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV) aumentam significativamente a expressão de galectina-3.^{105, 122}

Além das mudanças observadas durante os processos de inflamação e infecção, a expressão de galectina-3 também pode ser modulada por agentes químicos ou através da expressão de outras moléculas. Foi mostrado que a atividade do promotor de galectina-3 é aumentada quando fibroblastos são transfectados com o oncogene *Ras* ou após tratamento com PMA.^{123, 124} Recentemente, muitos trabalhos têm mostrado que genes cujos promotores apresentam características semelhantes ao promotor de galectina-3, ou seja, alta concentração de dinucleotídeos CpG e sítios Sp1, têm sua expressão regulada por metilação.¹²⁵⁻¹²⁸

1.2.2 – Galectina-3 em neoplasias.

Muitos trabalhos relatam o envolvimento de galectina-3 ao longo do processo de transformação celular.^{82, 129} Entretanto, os dados sobre o padrão de expressão dessa proteína em diferentes neoplasias ainda são bastante contraditórios. Em tumores de tiróide, estômago, bexiga e sistema nervoso central a expressão de galectina-3 encontra-se aumentada.¹²⁹⁻¹³⁴ Em contraste, uma

diminuição da expressão dessa lectina, comparada com o tecido normal, tem sido associada com uma maior capacidade metastática de células tumorais de mama e ovário.^{135, 136}

A galectina-3 modula uma série de eventos que são cruciais para o desenvolvimento do câncer, como aumento do potencial de proliferação, evasão da apoptose, invasão tecidual e angiogênese.^{86, 89-91}

Algumas linhas de evidência sugerem que a expressão de galectina-3 é necessária para o início do processo de transformação. Foi mostrado que a inibição da expressão de galectina-3 em células de carcinoma de mama e tiróide provocou uma reversão do seu fenótipo transformado *in vitro*.^{106, 107} Da mesma maneira, a introdução de galectina-3 em células normais de tiróide levou à transformação dessas células.¹³⁷

Os mecanismos pelos quais galectina-3 induz a transformação maligna ainda não são totalmente conhecidos, porém existem evidências do envolvimento de galectina-3 na transformação maligna mediada pelo oncogene *Ras*.¹³⁸ Kloog e colaboradores (2004) demonstraram que a galectina-3 se liga à proteína RAS, preferencialmente KRAS, e promove a ativação da via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que é uma via de proliferação e sobrevivência celular. De fato, algumas das funções de galectina-3 são resultado da ativação de KRAS, já que o aumento da proliferação celular, do crescimento independente de ancoragem e da atividade anti-apoptótica de galectina-3 envolve a via de sinalização KRas→MEK.^{116, 138} Mais recentemente, Mazurek e colaboradores (2005) mostraram que a fosforilação de galectina-3 contribui para a transformação maligna de células epiteliais de mama por modular a atividade de genes que desempenham papel importante no processo de tumorigênese.¹³⁹

A atividade anti-apoptótica de galectina-3 também é muito importante para o processo de transformação. Células de carcinoma de mama que expressam altos

níveis de galectina-3 são mais resistentes a apoptose induzida por cisplatina, ciclohexamida, óxido nítrico e radiação ultravioleta.^{85, 116, 140}

Alguns trabalhos destacam a participação de galectina-3 na regulação do crescimento tumoral. A inibição da expressão de galectina-3 em células de carcinoma de mama MDA-MB435 provocou uma diminuição do crescimento dessas células.¹⁴¹ Além disso, células de linfoma transfectados com o gene de galectina-3 apresentam uma maior capacidade proliferativa. Em concordância com esses achados, estudos mais recentes mostraram que galectina-3 ativa a ciclina D1 através de sua interação com a β -catenina¹⁰³ e, como mencionado anteriormente, também se liga ao fator de transcrição nuclear (TTF-1), aumentando sua atividade transcricional e sua ligação ao DNA.¹⁰¹

Quanto à participação de galectina-3 no processo de invasão e metástase, é crescente o número de evidências que mostram que a galectina-3 pode modular a capacidade de migração das células tumorais.^{90, 91, 93, 142, 143} Esse efeito é decorrente da capacidade de galectina-3 se ligar a glicoconjugados presentes na superfície celular e na matriz extracelular.^{93, 142} Somando-se a isso, a galectina-3 também pode regular a expressão de integrinas, que são moléculas que desempenham papel importante na migração celular e, portanto na invasão tumoral.¹⁴³ Le Marer e colaboradores (1996) demonstraram que a adição de galectina-3 exógena a células de carcinoma de mama aumentou sua capacidade migratória em matrigel.¹⁴⁴ Em adição, outro grupo mostrou que o aumento da expressão de galectina-3 em células de câncer de pulmão aumentou a migração dessas células *in vitro*.¹⁴⁵

Recentemente, alguns estudos sugerem a participação de galectina-3 na regulação do processo de angiogênese.^{146, 147} A galectina-3 estimula a formação de túbulos capilares *in vitro* e participa da angiogênese *in vivo*.¹⁴⁷

A localização celular da galectina-3 é um fator importante a ser considerado.

Califice e colaboradores (2004) mostraram que a presença de galectina-3 no citoplasma de células de câncer de próstata aumentou a capacidade de crescimento e migração dessas células *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* enquanto que no núcleo, a presença de galectina-3 teve efeito contrário.¹⁴⁶ Ainda, em câncer de endométrio, língua e cólon é possível estabelecer uma correlação entre a localização de galectina-3 e o grau de agressividade das células tumorais. As células mais agressivas expressam galectina-3 exclusivamente no citoplasma.¹⁴⁸⁻¹⁵¹ De maneira contrária, os casos mais avançados de câncer de tireóide, esôfago e pulmão apresentam expressão de galectina-3 no núcleo.^{101, 152-154}

O papel de galectina-3 na transformação celular e seu potencial como marcador de diagnóstico e prognóstico tem sido demonstrado em câncer de tireóide. Neste tipo de tumor é possível estabelecer uma correlação entre a expressão de galectina-3 e a aquisição de um fenótipo mais agressivo. A expressão de galectina-3 é muito baixa ou ausente em lesões benignas (hiperplasias e adenomas) e alta em tumores malignos.^{81, 155}

Na literatura há poucas informações a respeito do papel de galectina-3 na progressão de melanomas. Entretanto, os poucos trabalhos existentes relatam que a expressão de galectina-3 encontra-se aumentada ao longo da progressão de melanomas.¹⁵⁶ Um estudo de Vereecken *et al.* (2006) demonstrou que os níveis de galectina-3 no soro de pacientes com melanoma metastático eram significativamente maiores que os níveis encontrados no soro de indivíduos saudáveis.¹⁵⁶ Estudos de um outro grupo mostraram que melanomas metastáticos acumulam grandes quantidades de galectina-3 e que a expressão de galectina-3 pelas células tumorais está associada com a apoptose de linfócitos associados ao tumor.¹⁵⁷ Em um estudo recente, Pietro *et al.* (2006) mostraram que melanócitos adquirem altos níveis de galectina-3 ao longo da progressão tumoral, particularmente no núcleo. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que melanomas

originários de lesões com um padrão de exposição intermitente ao sol eram caracterizados por uma intensa expressão de galectina-3 no citoplasma enquanto que a expressão de galectina-3 no núcleo era restrita a melanomas originários de lesões com um padrão de exposição crônico e contínuo ao sol, sugerindo um envolvimento da radiação ultravioleta na ativação de galectina-3 e, uma associação entre a translocação de galectina-3 para o núcleo e padrão de exposição crônico ao sol.¹⁵⁸

Recentemente em um estudo colaborativo de nosso grupo desenvolveu-se um modelo que simula a progressão tumoral de melanoma murino. Esse modelo consiste de uma linhagem de melanócitos de camundongo C57/bl-6 (melan-a) e duas linhagens de melanoma (Tm1 e Tm5), selecionadas após inúmeros ciclos de de-adesão da linhagem melan-a. Estudos *in vitro* das características de proliferação destas células indicou-nos que este modelo simula a transição entre uma lesão pré-maligna ou de melanoma de crescimento radial (melan-a) e o melanoma de crescimento vertical (linhagens Tm1 e Tm5, por exemplo).¹⁵⁹ Análise dos genes e proteínas expressos por essas células mostrou que durante o processo de transformação houve uma perda da expressão de galectina-3, já que as linhagens Tm1 e Tm5 deixaram de expressar e acumular essa proteína ¹⁶⁰ (Marilena da Costa, dados não publicados). Assim o modelo de progressão tumoral de melanoma murino desenvolvido constitui um sistema adequado para avaliar os mecanismos envolvidos no controle de expressão de galectina-3.

1.3 – Metilação em câncer

A metilação é um dos principais mecanismos de regulação da expressão gênica de eucariotos e consiste na adição de um grupo metil (CH₃) no carbono de posição 5' dos resíduos de citosina dos dinucleotídeos CpG. Esse processo é realizado por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs).^{161, 162} As

DNMTs identificadas até o momento são: DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L.¹⁶³ A DNMT1 é uma das principais enzimas de vertebrados cuja função principal é manter os padrões pré-estabelecidos de metilação de DNA durante o processo de divisão celular.¹⁶⁴ A distribuição dos dinucleotídeos CpG no genoma não é uniforme. A grande maioria dessas seqüências se localiza em regiões denominadas ilhas de CpG. A maioria das ilhas de CpG está localizada nas regiões regulatórias de um grande número de genes.¹⁶⁵ Aproximadamente 60% dos genes de mamíferos apresentam ilhas de CpG em seus promotores e primeiro éxon.¹⁶⁶ Em condições normais essas regiões não são metiladas, e o gene é expresso se o fator de transcrição correspondente estiver disponível. Entretanto, existem algumas ilhas de CpG que são normalmente metiladas.¹⁶⁷ A metilação dessas ilhas de CpG está associada a vários processos que garantem a manutenção da integridade do genoma e que asseguram que a expressão gênica ocorra de uma forma temporal e espacial. Os processos influenciados pela metilação são: a regulação da transcrição gênica, a modulação da estrutura da cromatina, a inativação do cromossomo X, a estabilidade genômica, o *imprinting* genômico e a inativação de seqüências endoparasitárias como os elementos Alu, por exemplo.^{164, 168- 173,}

Em alguns casos, ilhas de CpG podem ser encontradas fora da região 5' de um gene, porém a metilação desses CpGs geralmente não interfere com a transcrição gênica.¹⁶⁷

De maneira geral, a metilação de ilhas de CpG presentes em regiões regulatórias de genes está associada com a repressão transcricional.^{128, 168, 172} Dois mecanismos têm sido propostos para explicar de que maneira a metilação pode levar ao silenciamento gênico. Um primeiro mecanismo sugere que a metilação bloquearia a ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação em seus respectivos promotores.¹⁷⁴ Diversos fatores de transcrição, entre eles, AP-2, c-

Myc/Myn, CREB (ativador dependente de AMP cíclico), E2F, Sp1 e NFkB, que reconhecem seqüências que contêm resíduos de CpG em seus sítios de ligação, têm sua ligação ao DNA inibida por metilação.^{174, 175} O segundo mecanismo envolve a ligação de repressores transcricionais ao DNA metilado. A metilação do DNA promoveria a ligação de proteínas conhecidas como *methyl-CpG-binding protein*, MBDs. Os membros dessa família de proteínas apresentam um *methyl-binding domain* que as torna capaz de se ligar especificamente ao DNA contendo sítios CpG metilados.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ Diversas proteínas que se ligam ao DNA metilado (MBDs) já foram identificadas em vertebrados: MeCP1, MeCP2, MDB1, MDB2, MDB4 e Kaiso.¹⁷⁷ Pelo menos três dessas proteínas (MePC2, MBD2 e MBD3) se associam a um grande complexo de proteínas contendo histono-deacetilases (HDAC1 e HDAC2) e agentes remodeladores da estrutura da cromatina (sin3a e mi-2). As HDACs retiram radicais acetil das caudas de histonas, restaurando assim a carga positiva dos resíduos de lisina presentes nas caudas das histonas. Isto, juntamente com os agentes remodeladores da estrutura da cromatina provoca uma compactação da cromatina que então impede a ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente a transcrição gênica.^{179, 180} Ainda, as proteínas MBD podem recrutar proteínas denominadas histono-metilases (HMTs) que metilam os resíduos de lisina da histona H3 (H3-K9). A metilação desses resíduos de histona e o subsequente recrutamento de moléculas envolvidas na compactação da cromatina, por exemplo, HP1, implicaria na formação de heterocromatina e no silenciamento gênico. (figura 4).¹⁸⁰

Nos últimos anos, a metilação do DNA tem sido alvo de intensa investigação. Quando comparado às células normais, as células malignas apresentam um padrão de metilação aberrante, ou seja, regiões do DNA que deveriam ser metiladas (seqüências repetitivas do DNA, por exemplo) tornam-se desmetiladas, enquanto que regiões do DNA que não deveriam ser metiladas (Ilhas

de CpG) tornam-se metiladas.^{181, 182}

Figura 4. Alterações epigenéticas envolvidas no silenciamento gênico. Em mamíferos a acetilação (triângulos amarelos) e a metilação (hexágonos laranja) de histonas (cilindros azuis) e a ligação de ativadores transcricionais e fatores de transcrição (círculos verdes grandes) ao DNA promovem a transcrição gênica. A metilação de ilhas de CpG (círculos pequenos, que em verde corresponde a CpG não metilado e em vermelho corresponde a CpG metilado), localizados próximos aos promotores dos genes, pelas DNA metiltransferases (DNMT, círculos grandes vermelhos) está associada ao recrutamento de proteínas que se ligam ao DNA metilado (MBD, círculos grandes vermelhos). As MBDs recrutam proteínas repressoras (CAF-1, Co-REP, HP1) e histono-deacetilases (HDAC, círculos grandes amarelo) que promovem a compactação da cromatina que impede a ligação de fatores de transcrição e consequentemente a transcrição gênica. TF: fator de transcrição; Co-ACT: co-ativador; TBP: *Tata binding factor*; TAF: *TBP associated factor*; RNA-Pol II: RNA polimerase II; MBD: *Methyl binding domain protein*; HP1: *Heterochromatin protein 1*; CAF-1: *Chromatin assembly factor-1*; CO-REP: co-repressor; HAT: Histono-acetiltransferase; HMT: Histono-metiltransferase. Adaptado de Peter W. Laird. *Human Molecular Genetics*. 14:R65-R76 (2005).

A associação entre a metilação e o câncer surgiu da observação de que a grande maioria dos genes supressores de tumor continha em suas seqüências regulatórias ilhas de CpG que tornavam-se metiladas no processo neoplásico.¹⁸³ Desde então, o número de genes inativados por hipermetilação vem aumentando na literatura. Os genes mais susceptíveis são genes envolvidos no controle do ciclo celular (*p16*, *p15*, *Rb* e *p14*),¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ genes associados ao reparo de DNA (*BRCA1* e *MGMT*),^{187, 188} apoptose (*DAPK* e *TMS1*)¹⁸⁹, resistência a drogas, diferenciação, angiogênese e metástase.¹⁹⁰

Embora certos genes como *RASSF1A* e *p16* sejam hipermetilados em um grande número de tumores, outros genes são metilados em tumores específicos. Por exemplo, o gene *GSTP1* encontra-se metilado em cerca de 90% dos cânceres de próstata, mas não é metilado em outros tipos de câncer como as leucemias mielóides.^{191, 192}

A hipermetilação provoca a perda de expressão de muitos genes que são importantes para o desenvolvimento do câncer de mama. Estes incluem genes receptores de hormônios esteróides, genes de adesão celular e inibidores de metaloproteinase de matriz extracelular. Entre os genes que freqüentemente estão metilados em câncer de mama encontram-se *p16*, o receptor de estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PR), *BRCA1*, *GSTP1*, *TIMP-3* e *E-caderina*. Estudos de metilação têm mostrado que o gene *ER* encontra-se desmetilado em células normais e em células ER-positivas, mas apresenta-se densamente metilado em mais de 50% dos tumores primários.¹⁹³

A hipermetilação também é associada com o desenvolvimento de muitos tipos de leucemias. Muitos genes como *p15*, *p21*, *SDC4* e *MDR* encontram-se metilados em um grande número de cânceres hematológicos. O gene *p15* encontra-se metilado em 65% das síndromes mielodisplásicas e tem sido associado à transformação e progressão das leucemias mielóides agudas.^{194, 195}

Da mesma forma, múltiplos genes encontram-se inativados por metilação em câncer de pulmão entre eles, *RAR β* , *RASSF1A*, *CDKN2A*, *MGMT*, *CHD13* e *APC*.¹⁹⁶

Em melanomas diversos genes encontram-se silenciados por metilação como *PTEN*, *CDKN2A*, *RASSF1-A*, *RAR- β 2*, e *MGMT*.^{188, 197-199} O gene supressor de tumor *RASSF1-A* encontra-se metilado em cerca de 55% dos melanomas primários enquanto que os genes *MGMT* e *RAR- β 2* encontram-se metilados principalmente em melanomas metastáticos.²⁰⁰

A diminuição global da metilação ou hipometilação também tem sido observada em tumores.^{201, 202} Essa perda de metilação global é comum tanto em tumores sólidos como câncer de próstata e de útero como em cânceres de origem hematológica como leucemias linfocíticas de células B. A hipometilação global está associada ao aumento da agressividade de tumores como câncer de mama e cérebro.^{182, 202, 203}

As regiões de heterocromatina nos cromossomos 1 e 16 são fortemente hipometilados em pacientes com imunodeficiência, instabilidade centromérica e diversos tipos de câncer.^{204, 205}

A hipometilação pode contribuir para o desenvolvimento do câncer por ativar oncogenes (*cMYC* e *H-RAS*, por exemplo), retrotransposons e retrovirus endógenos e por aumentar a instabilidade genômica. As seqüências repetitivas de DNA, tais como retrotransposons, retrovirus endógenos, repetições ALU e LINE e as repetições do DNA tipo satélite são freqüentemente afetadas por hipometilação em diversos tipos de cânceres. A perda de metilação dessas seqüências favorece a formação de uma estrutura anormal de cromatina que facilita a recombinação entre seqüências repetitivas e gera uma maior instabilidade cromossômica em tumores.²⁰⁶⁻²¹⁰

A perda de metilação também está associada à ativação transcricional de certos genes que estão silenciados em células normais. Por exemplo, a ativação do gene *MAGE-1*, que codifica um antígeno tumoral específico de melanomas, está associada com a perda de metilação.²¹¹

Neste trabalho pretendemos avaliar o envolvimento da metilação do DNA no silenciamento do gene de galectina-3.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos envolvidos na perda de expressão do gene de galectina-3 em um sistema que simula a progressão tumoral de melanoma murino.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o grau de metilação de ilhas CpG presentes na região 5' do gene de galectina-3 em células melan-a, Tm1 e Tm5.
2. Avaliar o papel de inibidores de metilação na expressão do gene de galectina-3.
3. Avaliar o perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 após tratamento da linhagem Tm1 com inibidores de metilação (5-aza2'-deoxicitidina).
4. Avaliar o efeito de agentes remodeladores da estrutura da cromatina como tricostatina A (TSA) e ácido-4-fenilbutírico (PB) na transcrição do gene de galectina-3.
5. Avaliar o perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 após tratamento da linhagem Tm1 com remodeladores da cromatina.
6. Avaliar a expressão da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5.
7. Avaliar o perfil de metilação do promotor do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - APROVAÇÃO DA CAPPesq

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), protocolo # 509/03.

3.2 - CÉLULAS

Células derivadas de melanócitos de camundongos C57BL/6 (melan-a) assim como células de melanoma murino (Tm1 e Tm5) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma), pH 6,9, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e éster de forbol (200 nM PMA, *phorbol myristate acetate*, GIBCO BRL). As linhagens celulares *Wistar Melanoma* (WM1552c, WM35, WM39, WM902B, WM115, WM278 e WM793) e SBC12 foram cedidas ao laboratório pelo Prof. Meenhard Herlyn, Wistar Institute, Filadélfia, Pensilvânia. Estas células foram cultivadas em meio MCDB153/L15 (4/1, v:v, Sigma), pH 7,4 suplementado com 2% de soro fetal bovino, 2 mM de cloreto de cálcio, 5 µg/mL de insulina, 5 ng/mL de EGF, 40 µg/mL de extrato pituitário bovino e 100 nM de éster de forbol. As linhagens de câncer de mama SKBR3 e MCF-7 foram cultivadas, respectivamente, em meio RPMI 1640 e McCoy's 5A. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e com 1% de L-glutamina. Todas as linhagens foram mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio era trocado a cada 48 horas. Ao atingirem confluência, as células eram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2-7,4 e destacadas dos frascos de cultura pela adição de uma solução de tripsina 0,2% (Instituto Adolfo Lutz). Em seguida, era adicionado meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para bloquear a ação proteolítica da tripsina. Finalmente, as células eram transferidas para novos frascos na proporção de 1:3.

O hibridoma TIB 166 (*American Type Culture Collection*, ATCC), que secreta o anticorpo monoclonal M3/38 (anti-galectina-3), foi cultivado em meio RPMI 1640, pH 7,4 suplementado com 20% de SFB a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O meio de cultura era recolhido a cada 5 dias e estocado a -20°C até o momento de uso.

3.3 - AMOSTRA DE TECIDO

As amostras de melanoma foram obtidas cirurgicamente de pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Logo após a remoção cirúrgica, as amostras de melanoma foram rapidamente estocadas em nitrogênio líquido, e mantidas em um banco de tumores regido por normas éticas da Comissão de Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo, o qual consentiu com a avaliação deste projeto.

3.4 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA das células foi extraído com reagente de Trizol[®] (GIBCO BRL). O Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, sendo uma otimização do método de extração de RNA total desenvolvido por Chomczynski e Sacchi em 1987.²¹² As células foram lavadas 3 vezes em PBS. Após a retirada total do PBS, adicionou-se 1 mL de reagente de Trizol[®]. Assim que as células se soltaram, foram transferidas para tubos de minicentrífuga, onde ficaram homogeneizando por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio (Merck) a cada amostra, as quais foram homogeneizadas por inversão por aproximadamente 15 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos. Imediatamente após a transferência, 500 µL de álcool isopropílico (Merck) foram

adicionados a cada amostra, que foram incubadas por 16 horas a -20°C. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C, o *pellet* foi dissolvido em água DEPC (dietilpirocarbonato, Merck), no volume de 10 a 50 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 quantificação do RNA foi determinada por espectrofotometria (medida da absorbância a 260 nm). A integridade do RNA total foi verificada através da visualização de bandas ribossomais 28S e 18S íntegras. Para tanto, o RNA total foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão MOPS (3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico, Sigma) preparado a partir de uma solução de tampão MOPS 10X (200 mM MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Acetato de sódio), e formaldeído 5%. Para cada 1 µL de amostra foram adicionados 8 µL de tampão de amostra de RNA 5X (50% glicerol, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,25% bromofenol blue, 0,25% xileno cianol) sob gelo. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65°C por 15 minutos para denaturação e, antes de serem aplicadas no gel, foi adicionado 1 µL de brometo de etídeo 0,5 µg/mL (GIBCO BRL). A eletroforese foi realizada a 100 V por duas horas em tampão MOPS 1X. A visualização das bandas ribossomais foi feita em transiluminador (ImageMaster, Pharmacia).

3.5 - RT-PCR: *Reverse Transcriptase* PCR

3.5.1 - Purificação do RNA

A 10 µg de RNA total foi acrescentada água DEPC para um volume final de 50 µL. A seguir acrescentou-se 50 µL de um *mix* contendo 1 µL de MgCl₂ 1 M, 1 µL

de dietiltrietol (DTT, Promega) 0,1 M, 10 μ L de DNase-RNase free 1U/ μ L (Invitrogen), 2 μ L de inibidor de RNase (Rnasin, Invitrogen) e 36 μ L de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0). Após leve homogeneização, incubou-se o homogeneizado a 37°C por 30 minutos. Findo esse período, adicionaram-se 2 μ L de proteinase K 2 mg/mL (Promega) e incubou-se a 37°C por mais 30 minutos. Adicionaram-se 125 μ L de um segundo *mix* (2,5 μ L de EDTA 0,5 M, 12,5 μ L de acetato de sódio 3 M pH 5,4, 2,5 μ L de SDS 10%, 107,5 μ L de água DEPC) e 250 μ L de fenol:clorofórmio (1:1) a cada amostra. Após homogeneização em vórtex por 15 segundos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo, no qual foram acrescentados NaCl, para uma concentração final de 250 mM, e isopropanol (mesmo volume do sobrenadante). O material foi mantido a temperatura ambiente por 10 minutos e, ao final desse período, centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. O *pellet* obtido foi lavado com 1 mL de etanol 75% e, após secar naturalmente, ressuspendido em 10 μ L de água DEPC.

3.5.2 - Síntese de cDNA

Aos 10 μ L de RNA purificado foram acrescentados 1 μ L de oligo dT 500 μ g/mL (Invitrogen), 1 μ L de dNTP mix 10 mM (Invitrogen) e 1 μ L de água DEPC. A seguir, incubou-se o material a 65°C por 5 minutos. Imediatamente após esse período, as amostras foram rapidamente resfriadas em gelo e brevemente centrifugadas. Adicionaram-se, então, 4 μ L de tampão *first-strand* 5x (Invitrogen) e 2 μ L de DTT 0,1 M (Invitrogen). Após 2 minutos a 42°C, adicionou-se 1 μ L de *Superscript II* 200 U (Invitrogen) e incubou-se as amostras por mais 50 minutos a 42°C. Para interromper a reação, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 minutos. Finalmente, o cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

3.5.3 - Reação de PCR

A PCR para avaliar a expressão dos genes de *galectina-1*, *galectina-3*, *CDKN2A*, *DNMT1* e *β -actina* de camundongo foi realizada em um volume final de 20 μ L contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen); 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen); 200 μ M de dNTPs (Invitrogen); 0,3 μ M de cada iniciador ou *primer*, 1 U/ μ L de *Taq* (Invitrogen) e 1 μ L de cDNA. Os *primers* utilizados nessas reações foram desenhados utilizando-se o programa disponível na internet denominado PRIMER3 INPUT: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi e encontram-se presentes na tabela 1. As condições de amplificação foram: denaturação do DNA por 5 minutos a 95°C seguido de 35 ou 42 ciclos de denaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C. Após amplificação, as amostras foram corridas em um gel de agarose 2% em TBE 0,5X preparado a partir de solução estoque de TBE 10X (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 50 mM EDTA pH 8,0) e brometo de etídeo 0,5 μ g/mL (GIBCO BRL). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram tratadas com tampão de amostra de DNA 5X (50% glicerol, 0,2% azul de bromofenol, TBE 2,5X). A eletroforese foi realizada a 120 V em tampão TBE 0,5X.

Tabela 1. Iniciadores ou *primers* usados nas reações de amplificação dos genes de *galectina-1*, *galectina-3*, *CDKN2A*, β -*actina* e *DNMT1* de camundongo.

Alvo	Primer senso 5'→3'	Primer antisenso 5'→3'	Tamanho (pb)
Galectina-1	TCTCAAACCTGGGGAATGTC	AGCTTGATGGTCAGGTCAGC	215
Galectina-3	CCTGGAGCTTATCCTGGTCA	GTCACCACTGATCCCCAGTT	504
CDKN2a	CTGCTCAACTACGGTGCAGA	AGCGGTACACAAAGACCACC	255
β -actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	CTGGGTCATCTTTTAACGGT	139
DNMT1	ACTCTTCCTTGGGTTTCCGT	CGGACAGTGACACCCTTTTT	123

3.6 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico das diferentes linhagens e amostra de tecidos foi extraído segundo protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989).²¹³ As células foram removidas dos frascos de cultura com tripsina conforme descrito no item 3.2 e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos. Pedacos de tecidos foram dissociados em placa de petri contendo meio de cultura. O tecido dissociado foi, então, transferido para um tubo de centrifuga e centrifugado a 2.000 rpm por 2 minutos a 4°C. A seguir, tanto o *pellet* celular quanto o *pellet* originado a partir de tecido dissociado

foram lavados duas vezes com PBS gelado. A cada lavagem as amostras eram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Ao final da última centrifugação, as amostras foram ressuspensas em tampão de digestão (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% SDS), contendo 100 µg/mL de proteinase K e 20 µg/mL de Rnase A, e incubadas a 50°C *overnight*. Ao final da digestão, adicionou-se o mesmo volume de uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) a cada amostra, as quais foram homogeneizadas por inversão por 30 segundos e centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa obtida após centrifugação foi, então, transferida para um novo tubo e submetida a uma nova etapa de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) para a obtenção de uma fase aquosa transparente e livre de proteínas. A fase aquosa recuperada foi tratada com igual volume de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. Ao final dessa centrifugação, a fase superior (fase aquosa) foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados ½ volume de acetato de amônio 7,5 M e 2 volumes de etanol absoluto. As amostras foram, então, incubadas por 30 minutos a -70°C para permitir a precipitação do DNA. Ao final desse período, o DNA precipitado foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, lavado com 1 mL de etanol 70%, novamente centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, eluído em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a 4°C. A quantidade do DNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (*GeneQuant Pro*, GE Healthcare). A qualidade do DNA foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, preparado a partir de solução estoque de TBE 10X, e brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras de DNA foram tratadas conforme descrito adiante no item 3.8.1. A eletroforese foi realizada a 120 V em tampão TBE 0,5X. O padrão de migração do DNA foi verificado em transiluminador (ImageMaster, Pharmacia).

3.7 - IDENTIFICAÇÃO DE ILHAS DE CpG E DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO SP1 *IN SILICO*

As seqüências do gene de galectina-3 humano (GenBank, acesso N° AF031421) e de camundongo (GenBank, acesso N° L08649) foram utilizadas para verificar a presença de possíveis ilhas de CpG no gene de galectina-3. Para identificação das ilhas CpG foi utilizado o algoritmo *CpG plot* disponibilizado pelo *European Bioinformatics Institute* (EMBL): <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>. Para se definir ilhas de CpG a partir desse algoritmo é necessário que os seguintes parâmetros sejam satisfeitos: (1) razão de CG observado/esperado > 0.6; (2) frequência de C+G > 50%; (3) ao longo de uma região de mais de 100 nucleotídeos. A seqüência do gene de galectina-3 de camundongo também foi utilizada para verificar a presença de possíveis sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1. Para identificação dos sítios Sp1 foi utilizado o programa AliBaba 2.1: <http://www.gene-regulation.com>.

3.8 - AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA POR SEQUENCIAMENTO

3.8.1 – Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

A utilização da metodologia do bissulfito de sódio nas análises de metilação foi inicialmente descrita por Clarck *et al.* (1994)²¹⁴ e desde então é a metodologia mais utilizada nessas análises. A técnica baseia-se no fato de que o bissulfito de sódio reage quimicamente com as citosinas não metiladas do DNA convertendo-as em uracilas enquanto que as citosinas metiladas não são transformadas em uracilas após o tratamento com esse reagente. Assim, após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio é possível discriminar as citosinas que possuem um radical metil ligado ao carbono de posição 5 das citosinas das que não o possuem. Ao final

do tratamento, o DNA modificado é submetido a uma reação de PCR. Nessa PCR são utilizados *primers* específicos para a seqüência de DNA modificada. Para que ocorra amplificação tanto das amostras metiladas quanto das amostras não metiladas, os *primers* são desenhados fora da região rica em CG. Após a amplificação, o produto de PCR pode ser submetido ao seqüenciamento direto ou pode ser clonado e posteriormente seqüenciado. O seqüenciamento possibilita a direta determinação do status de metilação da seqüência analisada, pois as citosinas que se mantiverem na seqüência são consideradas metiladas enquanto que aquelas que não estão metiladas são visualizadas como timinas, uma vez que após a PCR as uracilas são substituídas por timinas (Figura 5).

Para que o tratamento com bissulfito de sódio seja eficiente é necessário que antes do tratamento o DNA a ser analisado seja denaturado. Para tanto, a 1 µg de DNA de cada amostra foram adicionados 1 µL de DNA de espermatozoides de salmão (20 µg/mL), 2 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 3M e água para volume final de 17 µL. As amostras foram, então, homogeneizadas vigorosamente e incubadas a 50°C por 20 minutos. A seguir, as amostras foram tratadas com 500 µL de uma solução de bissulfito (2,5 M bissulfito de sódio, 1 M hidroquinona, 2 M NaOH) e incubadas, na ausência de luz, a 70°C por 3 horas. Ao final desse período, adicionou-se 1 mL de uma resina (*Wizard minipreps DNA purification resin*, Promega) a cada amostra e homogeneizou-se vigorosamente. A seguir, as amostras foram transferidas para uma minicoluna de purificação (*Wizard minicolumns*, Promega). Após a transferência, as minicolunas foram lavadas com 4 mL de isopropanol 80% e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Para eluição do DNA, transferiram-se as minicolunas para tubos de minicentrífuga, adicionaram-se 45 µL de água pré-aquecida a 80°C e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Finda a incubação, as amostras foram centrifugadas e as minicolunas descartadas. Após a adição de 5 µL de NaOH 3M, as amostras foram incubadas por 10 minutos a

temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 75 μL de acetato de amônio 5M, incubou-se a solução por 5 minutos a temperatura ambiente, adicionou-se, então, 350 μL de etanol absoluto gelado, 1 μL de glicogênio 20 mg/mL e incubou-se a -20°C *overnight*. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, o *pellet* foi lavado com 500 μL de etanol 70% gelado, submetido a uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos e, após secar naturalmente, eluído em 50 μL de TE. As amostras foram estocadas a -70°C até o momento de uso ou por até 3 meses.

Figura 5. Representação esquemática do método de conversão do DNA com bissulfito de sódio utilizado em análises de metilação.

3.8.2 - NESTED-PCR

Após tratamento com bissulfito de sódio o DNA modificado foi amplificado por um protocolo de *Nested-PCR*, que consiste de duas reações de PCR, nas quais dois pares de *primers* são desenhados, sendo um mais externo e outro mais

interno. Os *primers* utilizados encontram-se presentes na Tabela 2. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 μ L contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen); 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen); 200 μ M de dNTPs (Invitrogen); 0,32 μ M de cada *primer* (senso e anti-senso) e 1 U de *Taq Platinum* (Invitrogen). Para a primeira reação utilizaram-se os *primers* mais externos e 1 μ L de DNA modificado. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C por 12 minutos, 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 50°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos, 5 ciclos de 94°C por 3 minutos, 52°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 6 minutos. Para a segunda reação de PCR utilizaram-se os *primers* mais internos, 1 μ L da primeira reação e as seguintes condições de ciclagem: 94°C por 12 minutos, 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 53°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos, 5 ciclos de 94°C por 3 minutos, 55°C por 3 minutos, 72°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minutos e extensão final de 72°C por 6 minutos. Para verificar os perfis de amplificação, 3 μ L de cada amostra da segunda PCR foram aplicados em um gel de poliacrilamida 8%, preparado a partir de 7 mL de uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, 7 μ L de N,N,N,N tetra metiletilenodiamina (TEMED, Sigma) e 35 μ L de persulfato de amônio (APS) 10%. A eletroforese foi conduzida a 100 V por aproximadamente duas horas em tampão TBE 1X. Ao final da corrida, o gel foi fixado em 200 mL de solução de fixação (etanol absoluto 10% e ácido acético glacial 0,5%), sob agitação, por 10 minutos, corado com $AgNO_3$ 10% por 10 minutos, lavado com água destilada e revelado com 200 mL de NaOH 3% e 2 mL de formaldeído 37%.

Tabela 2. *Primers* de galectina-3 usados na reação de *Nested-PCR*

Alvo	Externo	Interno
Murino	F-5' TAGGTAGTTTTAGATAAGGG 3' R-5' CCCCAACATACCAAAAAAAC 3'	F-5' GGTATAGGTGAGGGGTATAG 3' R-5' TAACCAAACATAAAACCAACTAC 3'
Humano	F-5' ATTTTATAAATAAAGTAATTTATTAATTG 3' R-5' TAAAATACTACCAACCTTCCC 3'	F-5' TTATTTAGGTGATTTTGGAGAGGG 3' R-5' AAAAACAAAACACAACTATAAACTCTC 3'

F: *Forward*; R: *Reverse***3.8.3 - Purificação do produto de PCR**

Aproximadamente 20 µL da segunda reação de PCR (item 3.8.2) foram aplicados em um gel de agarose 0,8% em TBE 0,5X e brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram tratadas conforme descrito no item 3.8.1. A eletroforese foi realizada a 120 V em tampão TBE 0,5X por 2 horas. Ao final da corrida, o gel foi visualizado sob luz UV e as bandas, correspondentes aos fragmentos de interesse, foram recortadas do gel e purificadas como descrito a seguir. Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o *Kit QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) segundo especificações do fornecedor. Basicamente, a cada 100 mg de gel foram adicionados 300 µL de tampão *QG*. A seguir, as amostras foram incubadas a 50°C até dissolução completa do gel. Finda essa etapa, adicionaram-se 100 µL de isopropanol a cada 100 mg de gel inicial e transferiram-se as amostras para uma minicoluna. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 minuto, descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se mais 500 µL de tampão *QG* e centrifugou-se novamente a 14.000 rpm por 1 minuto. Após descartar o sobrenadante, adicionaram-se 750 µL de tampão *PE* e centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 minuto. Realizou-se uma nova

centrifugação para retirar o excesso de tampão, transferiu-se a minicoluna para um novo tubo de minicentrífuga, adicionaram-se 10·µL de água deionizada pH 8,0 a cada amostra e centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 minuto. Finalmente, 2 µL de cada amostra foram aplicadas em um gel de agarose 1% em TBE 0,5X e brometo de etídeo 0,5 µg/mL para confirmar a qualidade da purificação. O produto obtido na reação de *Nested-PCR*, agora purificado, pôde ser clonado e seqüenciado como descrito a seguir.

3.8.4 - Clonagem e transformação bacteriana

Os fragmentos purificados foram clonados utilizando o *Kit* de clonagem *pGEM®-Teasy Vector* (Promega) segundo especificações do fabricante. O vetor *pGEM®* (Figura 6) apresenta um sítio múltiplo de clonagem dentro da região que codifica o gene da enzima β-galactosidase (*lacZ*). A inserção de um fragmento de DNA em um destes sítios de clonagem causa a interrupção do gene, levando à perda da função da β-galactosidase. A inativação da função β-galactosidase permite a identificação de clones recombinantes. A reação de ligação foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 1X tampão de ligação; 50 ng do vetor *pGEM®*; 5 U de T4 DNA ligase e 2 µL do material purificado. A reação foi incubada a 4°C por 16 horas. No dia seguinte, distribuiu-se 10 µL de cada amostra em um filtro de nitrocelulose de 0,025 µm (Millipore) colocado sobre um filme de água e incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado para retirar todo o excesso de sal presente na reação (microdiálise). Findo esse processo, 2 µL de cada amostra foram adicionados a um tubo contendo 30 µL da bactéria eletrocompetente DH10B. A seguir, as bactérias foram submetidas a eletroporação (resistência de 200 ohms, capacitância de 25 microfaradays e voltagem de 1,8 kV) em eletroporador (Gene Pulser, BioRad) e, após o choque, incubadas por 1 hora em 1 mL de meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de

levedura, 1% de NaCl pH 7,5) a 37°C sob agitação constante (200 rpm). Ao final da incubação, 200 µL de bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de IPTG (isopropil-1-tio β-D-galactosídeo) e 4 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo). As placas foram incubadas a 37°C *overnight*.

Figura 6. Sequência do sítio de clonagem do vetor *pGEM®* mostrando onde o produto de PCR foi inserido. O vetor *pGEM®* é um vetor linearizado e apresenta em suas extremidades 3' uma desoxitimidina (T). A presença dessas timidinas permite que o produto de PCR se ligue com eficiência ao vetor porque a enzima polimerase adiciona uma desoxiadenosina (A) às extremidades 3' dos produtos de PCR. Fonte: *pGEM®-Teasy Vector* (Promega, Cat.# A1360).

3.8.5 - PCR de colônia

As bactérias contendo o vetor *pGEM®* recombinante, com o fragmento de DNA purificado apresentavam coloração branca, enquanto que aquelas que receberam o vetor sem o fragmento de DNA purificado apresentavam coloração azul. Assim, 12 colônias brancas de cada placa foram selecionadas e adicionadas com o auxílio de palitos de dente autoclavados a um tubo de reação de PCR (uma

colônia por tubo). As reações foram realizadas em um volume final 20 µL contendo 1X tampão da Taq DNA polimerase (GIBCO BRL), 200 µM de dNTPs (GIBCO BRL), 1,5 mM de MgCl₂ (GIBCO BRL), 1 U Taq DNA polimerase (GIBCO BRL) e 0,4 µM de *primers* específicos para o plasmídeo (pUC/M13, senso: 5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' e pUC/M13, anti-senso: 5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA -3'). O DNA foi inicialmente denaturado por 5 minutos a 95°C e em seguida submetido a 35 ciclos de denaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72°C. Finalmente correu-se um gel de agarose 1% em TBE 0,5X, acrescido de brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram tratadas conforme descrito no item 3.8.1. A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TBE 0,5X por 1 hora. Ao final da corrida, o gel foi visualizado sob luz UV e, as colônias que continham o DNA modificado com bissulfito de sódio ligado ao vetor *pGEM*[®] foram selecionadas e submetidas a uma reação de seqüenciamento.

3.8.6 - Reação de seqüenciamento

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se o *Kit DynamicTM ET terminator cycle sequencing* (Amersham), seguindo as instruções do fabricante. Foram realizadas duas reações de seqüenciamento: uma reação continha somente o *primer* senso do vetor *pGEM*[®] (pUC/M13, senso: 5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') e a outra somente o *primer* anti-senso do mesmo vetor (pUC/M13, anti-senso: 5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA -3'). A reação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1 µL de amostra (produtos gerados a partir da PCR de colônia); 2 µL de um *mix* contendo tampão da Taq, Taq polimerase, dNTP's e ddNTP's; 2 µL de *save moneyTM* 5M e 1 µL de *primer* 5 µM.

As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 95 segundos, 30 ciclos de 95°C por 18 segundos, 60°C por 12 segundos, 60°C por 4 minutos.

3.8.7 - Precipitação da reação de seqüenciamento

Após a PCR adicionaram-se 80 µL de isopropanol 75% a cada amostra, homogeneizou-se em vórtex e estocou-se no escuro a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, centrifugaram-se as amostras a 4.000 rpm por 45 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 200 µL de etanol 70%. Realizou-se uma nova centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos e ressuspendeu-se o *pellet* em 10 µL de formamida ultrapura. As amostras foram então homogeneizadas vigorosamente em vórtex e incubadas a 95°C por 3 minutos. Em seguida, foram colocadas em banho de gelo por 90 segundos e submetidas à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante.

3.9 - NORTHERN BLOT

3.9.1 - Separação e transferência do RNA para a membrana

20 µg de RNA total de melan-a, Tm1 e Tm5 foram preparados em tampão de amostra 5X, como descrito no item 3.4 e, em seguida separadas em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1X, sob agitação constante a 60 V por 5 horas, a temperatura ambiente. Ao término da corrida, o gel foi visualizado em transiluminador (ImageMaster, Pharmacia) sob luz UV para verificar a integridade das bandas ribossomais 28s e 18S. A seguir, o gel foi lavado duas vezes com água deionizada por 15 minutos cada e duas vezes por 15 minutos cada com uma solução SSC 5x feita a partir de uma solução SSC 20X (0,3M citrato de sódio pH 7,0, 3M NaCl). O gel foi transferido para uma membrana de nylon (*Hybond-n*; Amersham biosciences) previamente incubada por 30 minutos em água

e mergulhada na solução de SSC 5x. O gel foi cuidadosamente colocado sob a membrana de maneira a impedir a formação de bolhas. A transferência foi realizada sob condições de vácuo (Vácuo Dine, Pharmacia) e em quatro etapas de 15 minutos cada, sendo as duas primeiras etapas realizadas em solução SSC 5X e as outras duas com SSC 10X, trocando-se sempre as soluções entre cada etapa. Após a transferência a membrana foi incubada em solução SSC 2x por 10 minutos e seca naturalmente a temperatura ambiente. Posteriormente fixou-se o RNA na membrana através da exposição de cada lado da membrana à luz ultravioleta por 5 minutos cada.

3.9.2 - Síntese da sonda

O cDNA utilizado para a síntese da sonda radioativa foi obtido a partir do produto de PCR gerado após amplificação de cDNA de melan-a e/ou Tm1 com *primers* específicos para os genes de *Galectina-3* e *Galectina-1*. Assim, 20 µL da reação de PCR foram separados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X e brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Após confirmação da amplificação, através de visualização sob luz UV, os produtos de PCR foram purificados com um *Kit* de purificação de produto de PCR *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) conforme especificação do fabricante. Basicamente, os produtos de PCR foram recortados do gel e tratados com a solução *Membrane Binding Solution* (10 µL por 10 mg de gel). Após breve homogeneização, as amostras foram incubadas a 65°C até completa dissolução do gel. Finda essa etapa, as amostras foram transferidas para uma minicoluna, incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi descartado e as minicolunas foram lavadas duas vezes com *Wash Solution*. Na primeira lavagem adicionaram-se 700 µL de *Wash Solution* e centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto; na segunda lavagem adicionaram-se 500 µL da mesma solução e centrifugou-se a

10.000 rpm por 5 minutos. Transferiram-se as minicolunas para um tubo novo, adicionaram-se 50 µL de água DEPC e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Os fragmentos assim purificados foram utilizados como sonda. Cada sonda foi marcada com o *Kit* de marcação *Rediprime II Random-Prime Labelling System* (Amersham Biosciences) conforme descrito a seguir. A um volume contendo 50 ng de cDNA de cada amostra foram adicionados 45 µL de TE. Após fervura por 10 minutos, as amostras foram transferidas para um tubo contendo uma mistura de dNTPs, *random primers* (seqüências iniciadoras aleatórias), Klenow (enzima DNA polimerase) e 5 µL do nucleotídeo citosina marcado com ^{32}P ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$). Toda a reação foi realizada em banho de gelo. Após a adição de todos os componentes, a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. A seguir, a reação foi submetida a gel filtração, usando-se uma coluna de Sephadex, granulosidade G50, que permite separar o cDNA (*“flow through”*) do restante do material indesejado (retido na coluna). Findo esse processo, 2 µL de cDNA marcado foi colocado em um tubo de cintilação contendo 5 mL de aquasol (1 L de Triton x-100, Merck; 0,6 g de POPOP, Sigma; 12 g de PPO, Sigma; 2 L de Tolueno, Merck) e, então efetuou-se a contagem da radioatividade total desse volume em um contador de cintilação LS-5000 (Beckman).

3.9.3 - Hibridização da membrana

As membranas foram, inicialmente, incubadas com uma solução de hibridização contendo SSPE 5x (0,75 M NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 4 mM EDTA pH 7,4), Denhart's 5x (Ficoll 400 50 mg/mL, polivinilpirolidona 50 mg/mL, BSA 50 mg/mL), SDS 1%, formamida 50%, Sulfato de Dextran 5% e DNA de esperma de salmão denaturado 200 µg/mL, por 1 hora em forno de hibridização (Techine) a 42°C. A seguir, foi realizada a hibridização com a sonda de interesse. Para tanto, aproximadamente 2×10^6 cpm/mL da sonda foi fervida por 10 minutos e, então,

adicionada à solução de hibridização. A hibridização foi realizada a 42°C por 16 horas. Ao final da etapa de hibridização, as membranas foram lavadas 2 vezes com SSPE 2x e SDS 0,1%. Cada lavagem foi realizada por 15 minutos a 23°C. Finalmente, realizou-se uma última lavagem de 15 minutos com SSPE 1x e SDS 0,1% a 42°C. Após secar naturalmente sobre papel filtro, as membranas foram acondicionadas em sacos plásticos e expostas a um filme de raio X-Omat XK-1 100SH (Kodak), dentro de cassetes de filmagem, e a seguir, mantidas a -70°C *overnight*. Para revelação, o filme foi colocado em solução reveladora e reforçador Gbx (Sigma) até o aparecimento das bandas. Em seguida foi fixado com fixador (Kodak) por 10 minutos e lavado em água corrente.

3.10 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*

3.10.1 – Extração de proteínas

As células foram lavadas com PBS, destacadas com solução de PBS/EDTA e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de tampão de lise (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM), contendo os inibidores de proteases aprotinina 2 µg/mL e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. O lisado foi, então, mantido por 15 minutos a 4°C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido, transferido para tubos novos e estocados a -20°C até o momento do uso, quando sua concentração protéica foi determinada.

3.10.2 - Dosagem de proteínas

A concentração protéica dos extratos foi determinada segundo o método de Lowry,²¹⁵ utilizando-se o *Kit* de dosagem protéica *DC Protein Assay* (BioRad)

conforme instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços, foram colocados 4 µL de cada amostra a ter sua concentração protéica determinada, 20 µL da solução de tartarato de cobre e 160 µL do reagente de Follin. A placa foi homogeneizada cuidadosamente e após 15 minutos a temperatura ambiente sua absorbância a 655 nm foi determinada e comparada às obtidas em curva padrão de BSA (0-2,5 µg de BSA).

3.10.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS/PAGE

Os extratos protéicos a serem analisados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo protocolo de Laemmli (1970) ²¹⁶. O gel de corrida foi preparado com Tris-HCl 1,5M pH 8,8; SDS 0,4%; persulfato de amônio 0,3%, TEMED 0,015% e acrilamida 7,5 ou 10%. O gel de empilhamento foi preparado com Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida 4%; APS 0,05% e TEMED 0,025%. Os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra não redutor 2X (Tris-HCl 200 mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,01%), aquecidos por 5 minutos a 100°C e aplicados no gel SDS/PAGE 7,5, 10 ou 12%. A eletroforese foi feita em tampão de corrida 1X, preparado a partir de tampão de corrida 10X (Tris 250 mM, glicina 1,9 M, SDS 1%), a temperatura ambiente e sob voltagem constante de 50 V por aproximadamente 4 horas. Todas as amostras foram separadas em dois géis SDS/PAGE: um gel foi transferido para a membrana de PVDF e o outro foi utilizado como controle de aplicação de massa (controle de massa). O gel de controle de massa foi corado com uma solução de *Coomassie blue* (10% ácido acético, 50% metanol e 0,05% *Coomassie blue* 250, Sigma) por 45 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, o gel foi mantido em solução descorante (30% metanol e 7% ácido acético), sob agitação, até que todo o excesso de corante fosse retirado. Após lavagem em água destilada o gel foi seco por 45 minutos a 80°C em secador de gel (Hoefer, modelo GD2000).

3.10.4 – Transferência para membrana PVDF: *Western Blot*

Os extratos protéicos separados em gel SDS/PAGE foram eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (*Hydrophobic Polyvinylidene difluoride*, Amersham) previamente umedecida em metanol e água destilada. A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v:v) por 1 hora a 80 V a 4°C. Ao final da transferência, a membrana foi novamente mergulhada em metanol e água destilada e, em seguida, incubada em leite Molico (Nestlé) 5% em PBS por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após 2 lavagens com PBS, a membrana foi incubada por 16 horas a 4°C ou por 1 hora a temperatura ambiente com a solução derivada do hibridoma TIB 166 que contém o anticorpo monoclonal anti-galectina-3 M3/38 (*American Type of Culture Collection*, ATCC) ou com o anticorpo policlonal anti-galectina-1 (cedido ao laboratório pela Dra. Claudia Souto Maior, Córdoba, Argentina). Após 3 lavagens de 10 minutos com leite Molico 5% em PBS, a membrana foi incubada por 1 hora, sob agitação constante com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de rato conjugada a peroxidase (Sigma) 1:500 ou com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de coelho conjugada a peroxidase (Sigma) 1:100, respectivamente para galectina-3 e galectina-1. Finda incubação, a membrana foi submetida a 3 lavagens de 10 minutos com leite Molico 5% em PBS e, posteriormente imersa em solução contendo 7,5 mL de PBS, 20 µL de peróxido de hidrogênio e 5 mg de DAB (3,3'-tetraidrocloreto de diaminobenzidina, Sigma), para detecção da presença de galectina-3 e galectina-1. A reação foi interrompida pela imersão da membrana em água destilada após o aparecimento das bandas.

3.11 – IMUNOPRECIPITAÇÃO

3.11.1 – Lise celular

A extração das proteínas citoplasmáticas foi realizada como descrito no item 3.10.1. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e o *pellet* resultante dessa centrifugação foi ressuspendido em tampão de lise (Hepes 40 mM pH 7,4, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 1%, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM e aprotinina 2 µg/mL; pH 7,4) para a extração das proteínas nucleares. A extração procedeu como descrito anteriormente no item 3.10.1. Os extratos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

3.11.2 – *Preclear* do lisado

Para *preclean* do lisado, um anticorpo que não reconhece o antígeno que está sendo estudado é adicionado ao extrato. Assim, 500 µL de extrato nuclear foram incubados com 5 µL de soro de camundongo por 1 hora a 4°C sob agitação. A seguir, adicionaram-se 250 µL de tampão de lise nuclear (item 3.11.1) contendo proteína G acoplada a *beads* de Sepharose (Sigma) 10% (v:v) para remoção dos anticorpos presentes no soro de camundongo. As amostras foram incubadas novamente por 1 hora a 4°C sob agitação e, após esse período, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto a 4°C e o sobrenadante foi recolhido.

3.11.3 – Incubação com anticorpo específico

O sobrenadante recolhido foi então incubado com 2 µg do anticorpo monoclonal anti-DNMT1 (Imgenex) *overnight* a 4°C sob agitação. Findo esse período, adicionou-se igual volume de tampão de lise nuclear contendo proteína G acoplada a *beads* de Sepharose 10% (v:v) e incubou-se a 4°C sob agitação por 2 horas. A seguir, centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto a 4°C e desprezou-se o sobrenadante. Os *beads* foram recolhidos e submetidos a 3 lavagens de 10 minutos

a 4°C sob agitação como descrito a seguir: duas lavagens com 10 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,1%; pH 8,0 e uma lavagem com 10 mL de tampão Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1%; pH 6,8. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 minuto a 4°C, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se aos imunoprecipitado 50 µl de tampão de amostra não redutor 2X (Tris-HCl 200 mM pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,01%) e incubou-se por 5 minutos a 100°C para eluição do imunocomplexo. A seguir, a amostra eluída foi aplicada em gel SDS/PAGE 7,5% e, a eletroforese foi realizada como descrito no item 3.10.3. Após eletroforese, foi realizado um *Western blot* como descrito no item 3.10.4 utilizando 2 µg/mL do anticorpo primário anti-DNMT1 (Imgenex) e o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de camundongo conjugada a peroxidase (Sigma) 1:500.

3.12 - TRATAMENTO COM 5'-AZA-2'-DEOXCITIDINA, TRICOSTATINA E ACIDO- 4-FENILBUTÍRICO

Células Tm1 (1×10^6 células) foram plaqueadas em garrafas de 75cm² contendo 5 mL de meio RPMI, pH 6,9, acrescido de soro fetal bovino (5%, v:v) e éster de forbol 200 nM. Após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'-deoxicitidina (Sigma) (2,5, 5 e 10 µM) por 72 horas; com 10 µM de 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) por 48 horas e diferentes concentrações de tricostatina A (ICN Biomedicals) (50,100 e 200 nM) por mais 24 horas; com diferentes concentrações de ácido-4-fenilbutírico (MERCK) (1, 2, 3 e 4 mM) por 72 horas e também com 10 µM de 5-Aza-CdR por 48 horas e diferentes concentrações de ácido-4-fenilbutírico (1, 2, 3 e 4 mM) por mais 24 horas. Os tratamentos foram adicionados a cada 24 horas por um período de 72 horas. A cada adição dos tratamentos o meio de cultivo era trocado. As células também

foram cultivadas em meio contendo DMSO (diluyente de 5-Aza-CdR) e etanol (diluyente da tricostatina A e do ácido-4-fenilbutírico). No final do tratamento as células foram lavadas com PBS e foram isolados DNA, RNA e proteína como descrito anteriormente.

3.13 - PCR METILAÇÃO ESPECÍFICA (MSP)

3.13.1 - Desenho dos *primers*

A técnica de MSP (*Methylation-specific PCR*)²¹⁷ consiste no tratamento das amostras de DNA com bissulfito de sódio e posterior amplificação do DNA modificado. No MSP os *primers* são desenhados dentro de regiões ricas em CpG. Os dois pares de *primers* são desenhados de maneira que se possa distinguir entre o DNA metilado e o não metilado após tratamento com bissulfito de sódio. No desenho dos *primers* é importante levar em consideração a modificação dos dinucleotídeos pelo bissulfito de sódio e, além disso, desenhar *primers* que contenham pelo menos um par CpG próximo à extremidade 3' dos *primers* (para permitir a máxima discriminação na reação de PCR entre o DNA metilado e o não metilado). Dessa forma, após a reação de PCR, as amostras de DNA metiladas são somente amplificadas com os *primers* metilados enquanto que as não metiladas são amplificadas com os *primers* não metilados.

Os *primers* para análise do gene de galectina-3 de camundongo foram desenhados levando em consideração a localização dos dinucleotídeos CpG metilados, presentes na região promotora desse gene, bem como a localização dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1. Os *primers* foram desenhados mais precisamente em regiões do promotor de galectina-3 cujos dinucleotídeos CpG correspondentes a sítios de ligação do fator Sp1 apresentaram-se desmetilados após o tratamento com o inibidor de metiltransferase, 5-aza-2'-deoxicitidina (Figura 7). Foram desenhados, então, dois pares de *primers*: (Tabela 3) um par para a

situação metilada (*primer* senso e anti-senso) e um par para a situação não metilada (*primer* senso e anti-senso). Os *primers* utilizados para análise de metilação do promotor de galectina-3 humana foram descritos previamente por Lahm et al.²¹⁸ e estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. *Primers* de galectina-3 usados nas reações de MSP.

Primers	Senso 5'→3'	Antisenso 5'→3'	Tamanho (pb)
Murino Metilado	AGTTTTGATAGTTAG CGGAGCGG	CCAAAACCC CG CTAACATCC CG	273
Murino Não Metilado	TTAGTTTTGATAGTTAG TGGAGTGG	ACCCAAAACCC CA CTAACATCC CA	273
Humano Metilado	GGAG CGTTACGGA ATTTAAC	T CCGAACG ACTACTA ACG AAAA	273
Humano Não Metilado	GGGAG TGTTATGGA ATTTAAT	CTCCAA ACA ACTACTA ACAAAA	275

Os dinucleotídeos CpG contidos dentro dos *primers* estão em negrito.

Figura 7. Posicionamento dos primers para as reações de MSP dentro da região promotora e primeiro exon do gene de galectina-3 murina (posição -137 a +377 em relação ao início de transcrição GTA). Esta região do gene de galectina-3 contém 33 ilhas de CpG (em vermelho). Os primers foram desenhados nos dinucleotídeos CpG 13, 14, 29 e 30 sendo que os dinucleotídeos 1, 8, 14, 15 e 29 possuem sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1 (seqüência sublinhada). As setas indicam as regiões onde os primers foram desenhados. Cada seta representa um par de primer para a situação metilada e não metilada. Os dinucleotídios em azul correspondem às diferenças observadas entre a seqüência L08649 depositada no *GenBank* e a seqüência encontrada nas linhagens melan-a, Tm1e Tm5. Nestas linhagens estas seqüências correspondem a ilhas de CpG. Seqüência em rosa: início de transcrição.

3.13.2 - PCR

O DNA das células melan-a, Tm1, Tm5, MCF-7, SKBR3 e dos tecidos de melanoma humano, após modificação com bissulfito de sódio conforme descrito no item 3.8.1, foram amplificados por PCR utilizando os pares de primers presentes na Tabela 3. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µL contendo tampão de PCR 1x (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 0,16 µM de cada primer e 1 U de Taq *Platinum* (Invitrogen). Em cada tubo de reação foi adicionado 1 µL de DNA modificado com bissulfito de sódio. As condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C

por 1 minuto. Ao final da PCR, as amostras foram corridas em um gel de poliacrilamida 8%. Após a corrida o gel foi corado com prata como descrito anteriormente no item 3.8.2.

3.14 – ANÁLISE DO NÍVEL DE EXPRESSÃO POR PCR EM TEMPO REAL

A PCR em Tempo Real é um sistema de detecção que utiliza fluoróforos que permitem o acompanhamento da reação de amplificação e, conseqüentemente da quantidade de produto amplificado ao longo dos ciclos.

O nível de expressão da enzima DNMT1 nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi avaliado por PCR em Tempo Real, utilizando-se a metodologia do *SYBR[®] Green*. Nessa metodologia o *SYBR[®] Green* liga-se à dupla fita de DNA e, quando excitado pela luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite fluorescência verde. Uma vez que novas moléculas de DNA são formadas a cada ciclo da reação, o nível de fluorescência emitida aumenta ao longo da reação (Vitzthum *et al.*, 1999).²¹⁹ Os valores quantitativos foram obtidos no ponto no qual a fluorescência emitida ultrapassou um limiar de detecção estabelecido (C_T : *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 *ABI Prism[®] 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

3.14.1 – Padronização das concentrações dos *primers* e da quantidade de cDNA

As concentrações dos *primers* foram padronizadas com base em dois parâmetros: utilização das menores concentrações dos *primers* a fim de evitar a formação de dímeros de *primers* e a obtenção dos menores valores de C_T . Para as

amostras de cDNA, as quantidades utilizadas foram padronizadas de maneira a garantir os menores valores de C_T .

As reações foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp® Optical, Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL. Cada reação foi realizada em duplicata na presença de 10 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 10 a 100 ng de cada amostra de cDNA e 200 a 800 nM de cada *primer*. Os *primers* utilizados nessas reações foram desenhados por meio do *software Primer Express 2.0* do aparelho *ABI Prism® 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) e estão presentes na Tabela 4. O gene constitutivo utilizado para corrigir variações nas quantidades iniciais de cDNA foi a *β-actina*. As condições de amplificação foram as seguintes: 50°C por 2 minutos para ativação da enzima *AmErase* (se presente na reação), 95°C por 10 minutos para ativação da *AmpliTaq Gold* DNA Polimerase e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Uma etapa final de 20 minutos, na qual a temperatura aumenta gradualmente de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência, foi adicionada ao final da amplificação para submeter os produtos amplificados a uma curva de dissociação. A análise da curva de dissociação permite verificar se a reação está livre de produtos inespecíficos e/ ou de dímeros de *primers*. A especificidade dos produtos amplificados também foi verificada em gel de poliacrilamida 8% como descrito anteriormente no item 3.8.2 (Figura 8).

Tabela 4. *Primers* usados nas reações de PCR em Tempo Real.

Primers	<i>Senso 5'→3'</i>	<i>Antisenso 5'→3'</i>
DNMT1	CCGGTTCTTCGGCAACAT	GGTGGTGGCACAGCATTACC
β-actina	GACAGGTGCAGAAGGAGATTACTG	TCTGGCTCCTAGCACCA

Figura 8. Padronização da reação de PCR em Tempo Real para o gene DNMT1. A especificidade da reação de PCR em Tempo Real para o gene DNMT1, durante a etapa de padronização, foi avaliada por meio de análise da curva de dissociação (A) e por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (B). No gel estão indicadas as concentrações de *primers* ensaiadas. NTC corresponde à reação na ausência de *primers*. As linhas na curva de dissociação representam cada condição de *primer* testada.

3.14.2 – Análise dos dados de expressão

A expressão diferencial da enzima DNMT1 (transcrito alvo) foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador. O gene da *β-actina* foi utilizado como normalizador e a quantificação entre as linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi realizada utilizando a

linhagem melan-a como amostra referência. Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl em 2001.²²⁰

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta C_T^{\text{alvo}}} / (E_{\text{normalizador}})^{\Delta C_T^{\text{normalizador}}}$$

Onde **E alvo** corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o transcrito alvo, **E normalizador** corresponde a eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene normalizador, ΔC_T **alvo** corresponde a diferença entre o C_T do transcrito alvo obtido para a amostra em análise e o C_T do transcrito alvo obtido para a amostra de referência, ΔC_T **normalizador** corresponde a diferença entre o C_T do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o C_T do gene endógeno obtido para a amostra de referência.

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

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

Onde, **Slope** corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_T do transcrito alvo e do normalizador em função do *log* de diferentes quantidades de cDNA. Neste caso, foram utilizadas as seguintes quantidades de cDNA: 100; 10; 1; 0,1 e 0,01 ng. Essas quantidades de cDNA foram obtidas por meio de diluição seriada da amostra de cDNA original, sintetizada a partir de 10 µg de RNA total (item 3.4). Na figura 9 está representado o gráfico gerado para o cálculo da eficiência de amplificação.

Figura 9. Curva padrão de cDNA utilizada para determinação da eficiência de amplificação. Para determinar a eficiência da reação de amplificação foi realizada uma curva padrão utilizando diferentes concentrações (100; 10; 1; 0,1; 0,01 ng) de cDNA de melan-a. O valor de C_T foi analisado em função do $\log$ da concentração do cDNA. A inclinação da reta foi utilizada para calcular a eficiência de amplificação segundo a fórmula: $E=10^{(-1/\text{slope})}$, em que o *slope* corresponde à inclinação da reta. C_T : *Cycle Threshold*, ponto no qual a amplificação do produto foi detectada. $\log CO$: $\log$ de diferentes quantidades de cDNA.

4. RESULTADOS

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM UM MODELO DE PROGRESSÃO TUMORAL DE MELANOMA MURINO.

A expressão de galectina-3 no modelo de progressão tumoral de melanoma murino desenvolvido por nosso grupo foi determinada por *Western blot*. Como descrito anteriormente, esse modelo consiste de uma linhagem não tumorigênica, melan-a, e duas linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5, derivadas de melan-a após seleção por crescimento independente de ancoragem. Para avaliar o acúmulo de galectina-3 nesse modelo, extratos protéicos de melan-a, Tm1 e Tm5 foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida, estes extratos foram separados em gel de poliacrilamida 10%, transferidos para uma membrana PVDF e tratados com o anticorpo M3/38 que reconhece especificamente a proteína galectina-3. Como ilustrado na Figura 10 A, a presença de galectina-3 foi verificada somente na linhagem não tumorigênica melan-a. A expressão do RNAm do gene de galectina-3 nessas linhagens também foi determinada. Para tanto, foi realizado um ensaio de *Northern blot*. A análise de *Northern blot* mostrou que apenas a linhagem melan-a expressava o gene de galectina-3 (Figura 10 B).

Figura 10. As linhagens tumorigênicas não expressam galectina-3. (A) 30 microgramas de extratos proteicos de melan-a, Tm1 e Tm5 foram analisados por *Western blot* para galectina-3. A seta indica presença de galectina-3 e sua massa molecular aparente em kDa. Galectina-3 não foi detectada em extratos de Tm1 e Tm5, mas foi detectada em grandes quantidades em extratos de melan-a. (B) a ausência de galectina-3 em Tm1 e Tm5 foi associada com a perda da expressão de RNAm, como mostrado por *Northern blot*. (R) expressão relativa de RNAm de galectina-3. GAPDH foi utilizado como controle da integridade do RNA.

4.2 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-1 NAS LINHAGENS MELAN-A, TM1 E TM5.

A expressão de galectina-1 também foi avaliada no modelo de progressão tumoral em estudo. Diferente do observado para galectina-3, verificou-se que todas as linhagens que constituíam esse modelo (melan-a, Tm1 e Tm5) apresentavam expressão (tanto do RNAm como da proteína) de galectina-1 (Figura 11). Entretanto, nas linhagens tumorigênicas (Tm1 e Tm5), os níveis de expressão do gene de galectina-1 encontravam-se aumentados (Figura 11 A). Como ilustrado na

Figura 11, as diferenças na expressão do RNAm do gene de galectina-1, aparentemente, não foram refletidas no acúmulo dessa proteína.

Figura 11. As linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 expressam galectina-1. (A) a expressão de RNAm de galectina-1 encontra-se aumentada em Tm1 e Tm5 quando comparada a melan-a, como mostrado por *Northern blot*. (B) 30 microgramas de extratos proteicos de melan-a, Tm1 e Tm5 foram analisados por *Western blot* para galectina-1. A seta indica presença de galectina-1 e sua massa molecular aparente em kDa. Galectina-1 foi detectada em extratos de todas as linhagens murina. (R) expressão relativa de RNAm de galectina-1. GAPDH foi utilizado como controle da integridade do RNA.

4.3 – AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA PRESENÇA DE ILHAS DE CPG NO PROMOTOR DO GENE DE GALECTINA-3 MURINA.

A sequência do gene da galectina-3 murina depositada no *GenBank* sob número de acesso L08649 foi utilizada para identificação de possíveis ilhas de CpG no promotor do gene de galectina-3. Essa sequência apresenta cerca de 7.000

pares de bases. Análise *in silico* dessa sequência usando o algoritmo *CpG plot* (EMBL) mostrou a presença de ilhas de CpG em duas regiões: uma localizada a aproximadamente 2.000 pares de bases do primeiro nucleotídeo e a outra situada à cerca de 6.700 pares de bases do primeiro nucleotídeo (Figura 12 A), sendo que a ilha de CpG encontrada na região localizada a 2.000 pares de base do primeiro nucleotídeo compreendia o promotor e o primeiro éxon do gene de galectina-3 murina (Figuras 7 e 12 B) e apresentava 33 dinucleotídeos CpG (Figuras 7 e 12 B). Nessa ilha de CpG também foram identificados alguns sítios de ligação para o fator transcricional Sp1 (sítios Sp1).

Figura 12. Distribuição de ilhas de CpG no gene de galectina-3 murina. A sequência do gene de galectina-3 de camundongo (GenBank, acesso N° L08649) tem cerca de 7.000 nucleotídeos. O início da transcrição do gene de galectina-3 encontra-se na posição 2.018. (A) O programa *CpG plot* foi usado para identificar possíveis ilhas CpG na região promotora e primeiro éxon (nt 1.881-2.394) do gene da galectina-3 murina. Aqui estão ilustrados os parâmetros que determinam presença de ilhas de CpG: (1) razão de CG observado/esperado > 0,6; (2) frequência de C+G > 50%; (3) ao longo de uma região de mais de 100 nucleotídeos, verifica-se que o início de transcrição está imerso em uma possível ilha CpG. (B) Esquema representativo da estrutura do gene de galectina-3 murina. A região onde foram encontradas ilhas de CpG encontra-se em destaque no gráfico (posição -137 a +377 em relação ao início de transcrição). Essa região compreende o promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3. Nesta região também se observa presença de vários sítios Sp1. E: éxon.

4.4 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO 5' DO GENE DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS DE MELANOMA MURINO.

Com o intuito de avaliar o grau de metilação das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 a região correspondente ao promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3

(localizada a aproximadamente -137 a +377 do início de transcrição) foi seqüenciada após tratamento químico do DNA genômico dessas linhagens com bissulfito de sódio. O seqüenciamento dessa região revelou que as linhagens tumorigênicas (Tm1 e Tm5) apresentavam uma alta frequência de metilação, sendo que 100% dos dinucleotídeos CpG presentes nessa região estavam metilados, enquanto que a linhagem melan-a não apresentava nenhum dos dinucleotídeos CpG metilados (Figura 13). Além disso, foi verificado que essa seqüência nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 possuía 36 dinucleotídeos CpG ao invés dos 33 dinucleotídeos CpG observados na seqüência correspondente depositada no *GenBank*, acesso L08649 (Figuras 7 e 12 B).

4.5 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE DE GALECTINA-3 EM CÉLULAS TM1 TRATADAS COM 5-AZA-2'-DEOXCITIDINA.

Para confirmar que a metilação do promotor de galectina-3 era a responsável pelo silenciamento e conseqüente perda de expressão desse gene, células Tm1 foram tratadas com diferentes concentrações (2,5; 5 e 10 μ M) do inibidor de metiltransferase, 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) por 72 horas. Após o tratamento com 5-Aza-CdR, realizaram-se ensaios para avaliar a expressão do gene de galectina-3 e para determinar o perfil de metilação da região promotora e primeiro éxon do gene de galectina-3. A expressão do gene de galectina-3 foi avaliada por RT-PCR. Como ilustrado na figura 14, somente a maior concentração de 5-Aza-CdR foi capaz de induzir a expressão do gene de galectina-3 nestas células. O perfil de metilação da região promotora e primeiro éxon do gene de galectina-3 foi avaliado por seqüenciamento após tratamento do DNA dessas células com bissulfito de sódio como descrito em Materiais e Métodos. Seis alelos da linhagem Tm1 foram analisados. Como mostrado na Figura 15, o tratamento

com a maior concentração (10 μ M) do agente desmetilante provocou uma acentuada diminuição no *status* de metilação original destas células. É interessante ressaltar que algumas ilhas de CpG que correspondem a sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 tornaram-se desmetilados após o tratamento com 5-Aza-CdR.

Figura 13. Perfil de metilação das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5. Seqüenciamento da região promotora e do primeiro éxon do gene de galectina-3 murino (posição -137 a +377 em relação ao início de transcrição) das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 após tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio. Cada linha corresponde a um alelo seqüenciado e cada elipse representa um dinucleotídeo CpG. Em melan-a todos os dinucleotídeos foram encontrados desmetilados, enquanto que em Tm1 e Tm5 todos os dinucleotídeos CpG foram encontrados metilados.

Figura 14. A expressão do gene de galectina-3 foi restaurada após o tratamento de células Tm1 com o inibidor de metiltransferase, 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR). Células Tm1 foram tratadas com DMSO que representa um controle para o tratamento com 5-Aza-CdR (segundo *lane*) e com diferentes concentrações de 5-Aza-CdR (2,5; 5,0 e 10 μM). Após tratamento o RNA foi extraído e submetido a RT-PCR, utilizando-se *primers* específicos. A linhagem melan-a, que expressa galectina-3, foi utilizada como controle. Note que a expressão de galectina-3 por Tm1 ocorreu somente quando estas células foram tratadas com a maior concentração de 5-Aza-CdR (10 μM). β-actina foi utilizada como controle da integridade de cDNA.

Figura 15. Perfil de metilação da linhagem Tm1 após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR). Células Tm1 foram tratadas com 5 e 10 µM de 5-aza-2'-deoxicitidina. Como controle para o tratamento com 5-Aza-CdR utilizou-se DMSO. Após o tratamento o DNA destas células foi extraído e tratado com bissulfito de sódio. Em seguida realizou-se o seqüenciamento da região promotora e do primeiro éxon do gene de galectina-3. Tm1 que apresentava todas as seqüências metiladas antes do tratamento (Tm1/DMSO), apresentou uma acentuada diminuição no número de CpG metilados após o tratamento com 10 µM de 5-Aza-CdR. Cada linha corresponde a um alelo seqüenciado e cada elipse representa um dinucleotídeo CpG.

4.6 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E DO PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE DE GALECTINA-3 EM CÉLULAS TM1 TRATADAS COM AGENTES MODIFICADORES DA ESTRUTURA DA CROMATINA.

Genes silenciados podem ser ativados com agentes modificadores da cromatina após parcial desmetilação com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR).^{221, 222} Para testar se o tratamento com modificadores da organização da cromatina poderia restaurar completamente a expressão do gene de galectina-3 nas linhagens tumorigênicas de melanoma murino, células Tm1 foram tratadas com 10 μ M de 5-Aza-CdR por 48 horas e, em seguida expostas a 10 μ M de 5-Aza-CdR e diferentes concentrações de tricostatina A (50, 100 e 200 nM) ou a 10 μ M de 5-Aza-CdR e diferentes concentrações de ácido-4-fenilbutírico (1, 2, 3 e 4 mM) por mais 24 horas. Análise de RT-PCR mostrou que o tratamento com 10 μ M de 5-Aza-CdR por 48 horas e posteriormente com 50 nM de tricostatina A (TSA) induziu a expressão do gene de galectina-3 na linhagem Tm1 (Figura 16), porém o nível de expressão observado foi aparentemente semelhante ao observado quando estas células foram tratadas com 5-Aza-CdR somente. Ainda, o tratamento das células com concentrações acima de 50 nM não induziu a expressão desse gene e curiosamente provocou um efeito reverso ao obtido quando as células foram tratadas apenas com o agente desmetilante 5-Aza-CdR (Figura 16). Com relação ao tratamento das células com a combinação 5-Aza-CdR/ácido-4-fenilbutírico, a análise de RT-PCR mostrou que a re-expressão do gene de galectina-3 por essas células só foi alcançada quando as mesmas foram expostas a 2 e 3 mM de de ácido-4-fenilbutírico (Figura 17). As células também foram tratadas apenas com ácido-4-fenilbutírico por 72 horas. Como ilustrado na figura 17, somente a maior concentração de ácido-4-fenilbutírico foi capaz de induzir re-expressão de galectina-3, porém os níveis de expressão observados foram aparentemente

menores que os observados quando essas células foram tratadas com 5-Aza-CdR somente. Um fato curioso que pode ser observado na Figura 17 é que a combinação do agente desmetilante com a maior concentração de ácido-4-fenilbutírico bloqueou o efeito obtido quando essas células foram tratadas somente com 5-Aza-CdR, com ácido-4-fenilbutírico 4 mM e com as combinações 5-Aza-CdR/ácido-4-fenilbutírico 2 e 3 mM.

Figura 16. Expressão de galectina-3 em Tm1 após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) e tricostatina A (TSA). Células Tm1 foram tratadas com 10 μM de 5-Aza-CdR por 48 horas e diferentes concentrações de TSA (50, 100 e 200 nM) por mais 24 horas. Como controle para o tratamento com 5-Aza-CdR e TSA utilizou-se DMSO e etanol respectivamente. Após o tratamento o RNA destas células foi extraído e submetido a RT-PCR, utilizando-se *primers* específicos. A linhagem melan-a, que expressa galectina-3, foi utilizada como controle. Note que somente as células que foram tratadas com 5-Aza-CdR somente e com a combinação 5-Aza-CdR/TSA 50 nM apresentaram expressão de galectina-3.

Figura 17. Expressão de galectina-3 em Tm1 após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) e ácido-4-fenilbutírico (PB). Células Tm1 foram tratadas com diferentes concentrações de ácido-4-fenilbutírico (1, 2, 3 e 4 mM) por 72 horas ou com 10 μM de 5-Aza-CdR por 48 horas e diferentes concentrações de ácido-4-fenilbutírico (1, 2, 3 e 4 mM) por mais 24 horas. Como controle para o tratamento com 5-Aza-CdR e PB utilizou-se DMSO e etanol respectivamente. Após o tratamento o RNA destas células foi extraído e submetido a RT-PCR, utilizando-se *primers* específicos. A linhagem melan-a, que expressa galectina-3, foi utilizada como controle. Note que o agente modificador da estrutura da cromatina induziu re-expressão de galectina-3 somente quando administrado sozinho, na sua maior concentração, e em combinação com 5-Aza-CdR (5-Aza-CdR /PB 2 mM e 5-Aza-CdR /PB 3 mM).

O acúmulo da proteína galectina-3 em células Tm1 tratadas com 10 μM 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) e com a combinação 5-Aza-CdR 10 μM/TSA 50 nM foi determinado por *Western blot*. Extratos protéicos das células tratadas com 10 μM de 5-Aza-CdR e com a combinação 5-Aza-CdR 10 μM/TSA 50 nM foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida, estes extratos foram separados em gel de poliacrilamida 10%, transferidos para uma membrana PVDF e tratados com o anticorpo M3/38 que reconhece especificamente a proteína

galectina-3. Como ilustrado na figura 18, a presença de galectina-3 só foi detectada quando as células foram tratadas com 10 μ M de 5-Aza-CdR somente.

O padrão de metilação do gene de galectina-3, após tratamento da linhagem Tm1 com 5-aza-2'-deoxicitidina, com ácido-4-fenilbutírico e com as combinações 5-Aza-CdR/TSA e 5-Aza-CdR/PB, foi avaliado por MSP, usando *primers* específicos para a situação metilada e não metilada. Análise de MSP mostrou que o tratamento dessas células com a combinação 5-Aza-CdR/TSA não alterou o perfil de metilação original dessas células, pois após o tratamento, verifica-se a presença de bandas somente na condição metilada (Figura 19 A). O gene de galectina-3 apresentou-se metilado em todas as condições ensaiadas, até mesmo na condição em que foi observada re-expressão do gene de galectina-3 (10 μ M de 5-Aza-CdR/TSA 50 nM) (Figuras 16 e 19 A). Como ilustrado na Figura 19 B, nos tratamentos com ácido-4-fenilbutírico 4 mM, 10 μ M de 5-Aza-CdR/PB 1 mM e 10 μ M de 5-Aza-CdR/PB 4 mM verifica-se a presença tanto de bandas metiladas como não metiladas. Entretanto, nas demais condições ensaiadas observam-se bandas correspondentes somente à situação metilada (Figura 19 B). Semelhante ao observado com tricotatina A, os tratamentos com 10 μ M de 5-Aza-CdR/PB 2 mM e com 10 μ M de 5-Aza-CdR/PB 3 mM que, induziram re-expressão do gene de galectina-3, apresentaram bandas correspondentes somente à condição metilada.

Figura 18. Detecção de Galectina-3 nos extratos protéicos de Tm1 após tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR) e com a combinação 5-Aza-CdR/TSA. Extratos protéicos de células tratadas com 10 µM de 5-Aza-CdR e com a combinação 5-Aza-CdR 10 µM/TSA 50 nM foram separados em gel de poliácridamida 10%, transferidos para uma membrana PVDF e incubados com o anticorpo M3/38, específico para galectina-3. A seta indica presença de galectina-3 e sua massa molecular aparente em kDa. A linhagem melan-a, que acumula galectina-3 espontaneamente, foi utilizada como controle. Como controle para o tratamento com 5-Aza-CdR e TSA utilizou-se DMSO e/ou etanol. Observe que somente o tratamento com 5-Aza-CdR foi capaz de induzir o acúmulo de galectina-3 em Tm1.

Figura 19. Perfil de metilação do gene de galectina-3 após tratamento da linhagem Tm1 com agentes remodeladores da estrutura da cromatina e com inibidor de DNA metiltransferase. O perfil de metilação do promotor de galectina-3, após tratamento da linhagem Tm1 com agentes remodeladores da estrutura da cromatina (tricostatina A e ácido-4-fenilbutírico) e com inibidor de metilação (5-aza-2'-deoxicitidina), foi avaliado por MSP (Methylation Specific PCR), usando *primers* que amplificam especificamente DNA metilado e não metilado. (A) perfil de metilação do gene de galectina-3 observado após tratamento das células Tm1 com 10 µM de 5-aza-2'-deoxicitidina por 48 horas e com 5-aza-2'-deoxicitidina/tricostatina A por mais 24 horas. (B) perfil de metilação do gene de galectina-3 observado após tratamento das células Tm1 com ácido-4-fenilbutírico por 72 horas, 5-aza-2'-deoxicitidina por 48 horas e com 5-aza-2'-deoxicitidina/ácido-4-fenilbutírico por mais 24 horas. As linhagens melan-a e Tm1 representam controles para a condição não metilada e metilada, respectivamente. As concentrações das drogas estão indicadas na figura. 5-Aza-CdR: 5-aza-2'-deoxicitidina; TSA: tricostatina A; PB: ácido-4-fenilbutírico; NO:

controle sem cDNA. DMSO e Etanol são os diluentes de 5-Aza-CdR e de TSA e PB, respectivamente.

4.7 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA DNA METILTRANSFERASE 1 (DNMT1) EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.

A expressão da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi avaliada por RT-PCR. Análise da expressão dessa DNMT por RT-PCR mostrou que todas as linhagens analisadas expressavam o RNAm para o gene DNMT1 (Figura 20). A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para verificar se havia diferença nos níveis de expressão do gene DNMT1 entre as linhagens celulares melan-a, Tm1 e Tm5. A reação de PCR em tempo Real foi realizada utilizando-se o sistema *SYBR Green* e o método de quantificação relativa, adotando, como amostra de referência o cDNA da linhagem melan-a e, como gene normalizador, a β -actina. Inicialmente, foram realizados ensaios de padronização que permitiram determinar as concentrações de *primers* e de cDNA a serem utilizadas, assim como a eficiência de amplificação de cada *primer* (Materiais e Métodos, item 3.14 e Figuras 8 e 9). A reação de PCR em Tempo Real para o gene DNMT1 foi, então, realizada com 400 nM de cada *primer* e com 10 ng de cDNA de cada linhagem celular. Para o cálculo da expressão relativa do gene de DNMT1 foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl em 2001 (Materiais e Métodos, item 3.14.2) que leva em consideração a eficiência de amplificação dos *primers*. Com base nos dados obtidos, pode-se verificar que as linhagens tumorigênicas (Tm1 e Tm5) apresentaram um discreto aumento nos níveis de expressão do gene DNMT1 quando comparadas com a linhagem não tumorigênica melan-a. Sendo que o nível de expressão observado em Tm5 em relação à linhagem melan-a foi discretamente maior ao observado para a linhagem Tm1 (Tabela 5).

Figura 20. As linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 expressam a enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1). O RNA total das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi extraído e submetido a RT-PCR, utilizando-se *primers* específicos para DNMT1. β-actina foi utilizada como controle da integridade das amostras de cDNA.

A presença da proteína DNMT1 nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 também foi avaliada. Para tanto, extratos protéicos dessas linhagens foram imunoprecipitados com anticorpo específico para DNMT1, submetidos a um gel de poliacrilamida 7,5%, transferidos para uma membrana de PVDF que foi, então incubada com o anticorpo específico anti-DNMT1. Conforme mostrado na Figura 21, a presença da proteína DNMT1 foi observada em todas as linhagens. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto ao acúmulo dessa proteína entre as linhagens analisadas, usando-se imunoprecipitação.

Tabela 5. Dados de expressão relativa do gene DNMT1 nas linhagens de melanoma murino determinadas por PCR em Tempo Real.

Linhagens	C _T amostra	C _T controle endógeno β-actina	R
melan-a	27,52±0,492	21,26±0,039	2,18
Tm1	24,31±0,03	18,93±0,025	
melan-a	27,52±0,492	21,26±0,039	3,01
Tm5	22,36±0,009	17,29±0,089	

A quantificação relativa da expressão do gene DNMT1 nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi obtida através da utilização do modelo matemático proposto por Pfaffl em 2001.

Figura 21. Detecção da presença da enzima DNMT1 nas linhagens de melanoma murino. Extratos protéicos das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foram inumoprecipitados com 2 µg do anticorpo específico para DNMT1, submetidos a um gel de poliacrilamida 7,5%, transferidos para uma membrana de PVDF que foi, então incubada com 2 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-DNMT1. A seta indica a presença de DNMT1 e sua massa molecular aparente em kDa. A presença da enzima DNMT1 foi observada em todas as linhagens.

4.8 – CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA HUMANO.

A presença de galectina-3 foi avaliada em um painel de linhagens celulares de melanoma humano. Para avaliar o acúmulo de galectina-3 nessas linhagens, extratos protéicos de cada tipo celular foram preparados como descrito em Materiais e Métodos. Em seguida, estes extratos foram separados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para uma membrana PVDF que foi tratada com o anticorpo M3/38 (anti-galectina-3). A Figura 22 ilustra a presença de galectina-3 tanto nas linhagens celulares derivadas de fases iniciais da progressão de melanoma ou melanoma de crescimento radial (linhagens WM35 e WM 1552C) quanto nas linhagens mais agressivas que representam estágios mais avançados da progressão de melanoma ou melanoma de crescimento vertical (WM39, WM902B, WM115, WM278, WM793). Entretanto, em duas linhagens de crescimento vertical (WM278, WM793) observa-se uma acentuada diminuição nos níveis de galectina-3.

Figura 22. Avaliação da presença de galectina-3 em linhagens de melanoma humano. Extratos protéicos de melanócitos (SBC12) e de diferentes linhagens de melanoma humano (Wistar melanoma, WM) foram separados em gel de poliacrilamida 12%, transferidos para uma membrana de PVDF e incubados com anticorpo M3/38 (para galectina-3). Duas das cinco linhagens de melanoma VGP (WM278 e WM793) apresentaram uma diminuição nos níveis de galectina-3. VGP: melanoma de crescimento vertical; RGP: melanoma de crescimento radial.

4.9 - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE GALECTINA-3 EM AMOSTRAS DE MELANOMA HUMANO.

Vinte e nove amostras de melanoma de pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo, sendo 24 derivadas de melanoma metastático, foram utilizadas para avaliar o perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 (região localizada entre os nucleotídeos -237 e +38 a partir do início de transcrição) em melanoma humano. A avaliação do *status* de metilação dessas amostras foi realizada através do emprego da técnica do "Methylation Specific PCR" (MSP). Como controle para a

condição não metilada foi utilizado DNA da linhagem de carcinoma de mama MCF-7, cujo padrão de metilação já havia sido caracterizado pela técnica de seqüenciamento após tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Como controle da condição metilada foi utilizado DNA da linhagem de carcinoma de mama SKBR3, cujo perfil de metilação foi previamente descrito por Ruebel *et al*, 2005. Análise de MSP mostrou que todas as amostras analisadas apresentaram-se desmetiladas (Figura 23). Para confirmar os resultados obtidos com a técnica de MSP, o perfil de metilação do promotor do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano também foi avaliado por seqüenciamento após tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Para tanto, selecionamos apenas seis amostras de melanoma humano: amostras 98, 99, 100, 105, 107 e 110.

Nesta análise foi selecionada uma região do gene de galectina-3 (*GenBank*, acesso No. AF031421) localizada entre os nucleotídeos -293 e +203 a partir do início de transcrição. Esta região corresponde ao promotor e primeiro éxon de *LGALS3* humano. Análise dessa região, utilizando o programa *CpG plot*, revelou a presença de uma ilha de CpG contendo 63 dinucleotídeos CpG.

Para avaliar do perfil de metilação do promotor do gene de galectina-3 foram seqüenciados seis clones de cada amostra. Análise de seqüenciamento do promotor de galectina-3 mostrou que essa região estava totalmente desmetilada em todos os clones analisados (Figura 24), confirmando os resultados obtidos com a técnica de MSP.

Figura 23. Perfil de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano. O perfil de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano foi avaliado por MSP (*Methylation Specific PCR*), usando *primers* que amplificam especificamente DNA metilado e não metilado.

Figura 24. Perfil de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano. O promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 humano estão localizados entre os nucleotídeos -293 e +203 em relação ao início de transcrição. Essa região apresenta 63 dinucleotídeos CpG e constitui uma ilha de CpG. O *status* de metilação dessa região foi determinado por seqüenciamento após o tratamento do DNA de seis amostras de melanoma (98, 99, 100, 105, 107 e 110) com bissulfato de sódio. Cada elipse representa um dinucleotídeo CpG. Elipses em branco correspondem a CpG não metilado. As setas representam o início de transcrição. Note que o seqüenciamento dessa região confirma os resultados obtidos por MSP (Figura 23).

5. DISCUSSÃO

Galectina-3 é uma lectina animal que tem sido associada a vários processos biológicos envolvidos na progressão do câncer, tais como proliferação, angiogênese, migração celular e metástase^{82, 129}. Apesar de muitos trabalhos relatarem essa associação entre a proteína e o desenvolvimento do câncer, ainda é muito difícil estabelecer uma correlação entre o padrão de expressão de galectina-3 e o processo de transformação tumoral.

Diversos estudos têm mostrado que a expressão de galectina-3 encontra-se aumentada ao longo da progressão tumoral, sendo que em alguns tipos de tumores como câncer de tiróide,^{130,131} cólon¹⁴⁹ e estômago¹³² foi possível até estabelecer uma correlação entre o aumento de expressão de galectina-3 e a aquisição de um fenótipo mais agressivo. Em contraste, uma diminuição da expressão dessa lectina, comparada com o tecido normal, tem sido associada com uma maior capacidade metastática de células tumorais de mama, endométrio e ovário.¹³⁶

Com relação a melanomas, existem poucas informações a respeito do papel de galectina-3 na progressão desse tipo de tumor. Porém, todos os trabalhos existentes sugerem um aumento da expressão de galectina-3 ao longo da progressão tumoral de melanomas.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Recentemente, em um estudo colaborativo de nosso grupo, estabeleceu-se um modelo celular de progressão tumoral de melanoma murino. Esse modelo consiste da linhagem melan-a e duas linhagens derivadas desta linhagem (Tm1 e Tm5).¹⁵⁹ Estudos *in vitro* das características de proliferação destas células indicaram que Tm1 e Tm5 representam melanoma de crescimento vertical (VGP) enquanto melan-a comporta-se como um melanócito ou melanoma de crescimento radial (RGP). Utilizando esse modelo, Marilena da Costa demonstrou que as

linhagens de crescimento vertical (Tm1 e Tm5) deixaram de expressar galectina-3, sugerindo que durante a progressão tumoral de melanoma murino há uma perda da expressão dessa molécula. A figura 10 ilustra um ensaio de *Western e Northern blot* que confirmam que as linhagens Tm1 e Tm5 não acumulam galectina-3 como também não expressam o RNAm do gene de galectina-3. Esses achados sugeriam que a ausência de expressão de galectina-3 era devido a alterações nos mecanismos de controle que regulam a expressão do gene de galectina-3.

Como mencionado anteriormente, a metilação representa um dos principais mecanismos de controle de expressão gênica e constitui na adição de grupamentos metil no carbono 5 da citosina dos dinucleotídeos CpG. A metilação das ilhas de CpG, regiões com alta concentração de CpG, localizadas principalmente em promotores e nos primeiros éxons, está associada com a inativação ou com o silenciamento gênico.^{161, 162} Em condições fisiológicas, essas regiões geralmente não são metiladas. Entretanto, no câncer ocorre uma alteração nos padrões de metilação do DNA de maneira que estas regiões tornam-se hipermetiladas.^{181, 182} Nos últimos anos muitos estudos têm demonstrado que a inativação transcricional de genes supressores de tumor por hipermetilação é um evento freqüente em câncer.¹⁸³ Há um crescente número de genes relacionados ao câncer que são inativados por hipermetilação, entre eles, destacam-se: genes envolvidos no controle do ciclo celular (*p16^{INK4a}*, *p15^{INK4a}*, *p14^{ARF}* e *Rb*),¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ genes associados com o reparo de DNA (*BRCA1* e *MGMT*),^{187, 188} apoptose (*DAPK* e *TMS1*)¹⁸⁹ e adesão celular (*E-caderina*).¹⁸⁶ Diante disso, fomos avaliar se o processo de metilação do DNA estava envolvido no silenciamento do gene de galectina-3 no nosso modelo de progressão de melanoma murino.

Análises *in silico* da sequência do gene de galectina-3 murina depositada no *GenBank* mostrou que a região promotora e primeiro éxon desse gene continha uma ilha de CpG contendo 33 dinucleotídeos CpG, sendo que alguns desses

dinucleotídeos CpG correspondiam a sítios de ligação do fator de transcrição Sp1, cuja ligação ao DNA depende do *status* de metilação do CpG presente no seu sítio de ligação.¹²⁵ A presença de uma ilha de CpG no promotor e primeiro éxon desse gene sugeria que a expressão do gene de galectina-3 poderia ser controlada por metilação. Então, para verificar se tal mecanismo era responsável pelo silenciamento do gene de galectina-3, observado nas linhagens de melanoma murino fomos primeiro determinar o padrão de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5. Análise do perfil de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 nessas linhagens revelou que nas linhagens Tm1 e Tm5, que não expressam o gene de galectina-3, todos os 36 dinucleotídeos CpG encontrados estavam metilados enquanto que na linhagem melan-a, que expressa esse gene, nenhum desses CpGs estavam metilados (Figura 13). Além disso, estas regiões nessas linhagens apresentavam 3 dinucleotídeos CpG extras quando comparadas à sequência correspondente depositada no *GenBank*. A sequência do *GenBank* foi obtida por análises do gene de galectina-3 em camundongos Sv129²²³, enquanto que em nosso estudo utilizamos linhagens de células derivadas de camundongos C57BL/6. Provavelmente esses três dinucleotídeos CpG extras encontrados nas linhagens estudadas representem polimorfismos do promotor de galectina-3 na linhagem de camundongos C57BL/6. A observação de que o promotor do gene de galectina-3 estava completamente metilado nas linhagens Tm1 e Tm5 e desmetilado na linhagem melan-a, sugeria que a ausência de expressão de RNAm de galectina-3 nas linhagens de melanoma de crescimento vertical era devido a hipermetilação do promotor desse gene.

Para confirmar que a hipermetilação do promotor do gene de galectina-3 nas linhagens Tm1 e Tm5 era de fato responsável pelo silenciamento transcricional desse gene, tratamos a linhagem Tm1 com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR). O

agente químico 5-Aza-CdR é um análogo de citosina que inibe especificamente a metilação do DNA por formar uma ponte covalente entre o DNA e a enzima metiltransferase. Vários trabalhos têm demonstrado que 5-Aza-CdR em baixas concentrações é capaz de ativar genes silenciados por metilação.^{224, 225} O tratamento da linhagem Tm1 com 5-Aza-CdR provocou uma significativa desmetilação do promotor do gene de galectina-3 e induziu a expressão tanto do RNAm como da proteína nessas células, confirmando que de fato a hipermetilação do promotor do gene de galectina-3 está diretamente correlacionada com a ausência de expressão desse gene ao longo da progressão tumoral de melanoma murino.

Interessantemente, os dinucleotídeos CpG correspondentes aos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 tornaram-se desmetilados após o tratamento com 5-Aza-CdR. Um dos mecanismos propostos para explicar como a metilação do DNA pode inibir a transcrição gênica sugere que a metilação dos resíduos de citosina poderia impedir a ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação.^{161, 175} Como muitos fatores de transcrição de mamíferos (E2F, CREB e USF, por exemplo) apresentam sítios de ligação no DNA ricos em CpG, a metilação ocorreria nestes sítios e impediria a ligação desses fatores ao DNA e dessa forma inibiria a transcrição.¹⁶¹ Clarck colaboradores (1997)²²⁶ e Mancini e colaboradores (1999)²²⁷ mostraram que a metilação de CpG presentes nos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 impedem a ligação desse fator ao DNA. Porém outros trabalhos mostraram que a metilação de CpG presentes nos sítios de ligação do fator Sp1 não interfere na ligação desse fator ao gene.^{228, 229} Assim, parece que o mecanismo de silenciamento gênico por metilação depende do tipo de célula, do fator de transcrição ou do estímulo recebido²²⁹.

Os achados mencionados acima têm sido corroborados por resultados encontrados em uma outra linhagem de melanoma murino (Mgal3) que foi

recentemente estabelecida e caracterizada por Mara de Souza Junqueira em nosso laboratório. Essa linhagem, da mesma forma que as linhagens tumorigênicas que compõem o modelo de estudo do presente trabalho, apresentam o gene de galectina-3 silenciado por hipermetilação do seu promotor.

Parece que o processo de metilação é um mecanismo importante no controle de expressão das galectinas. Recentes estudos mostraram que outros membros da família das galectinas apresentam sua expressão regulada por metilação. Salvatore *et al.* (2000) demonstraram que células de leucemia T humana que não expressavam galectina-1 apresentavam o promotor desse gene hipermetilado e que o tratamento dessas células com 5-azacitidina provocou significativa desmetilação e subsequente reativação do gene de galectina-1.²³⁰ Mais recentemente, Moisan e *et al.* (2003) mostraram que o tratamento de células de linfomas com 5-Aza-CdR induziu a expressão de galectina-7 nessas células, sugerindo que o gene de galectina-7 pode ser regulado por metilação.²³¹ Diferentemente do observado em células de leucemia T, parece que em nosso modelo de progressão de melanoma a expressão do gene de galectina-1 não está sendo regulada por metilação do promotor desse gene uma vez que todas as linhagens que constituem esse modelo expressam esta lectina.

Como observado nas figuras 14 e 15 o tratamento com 5-Aza-CdR provocou uma acentuada desmetilação do promotor do gene galectina-3 que foi acompanhada por re-expressão desse gene. No entanto, o nível de expressão observado após o tratamento com esse agente desmetilante parece não refletir o acentuado grau de desmetilação provocado por 5-Aza-CdR. Diante desse contexto duas hipóteses podem ser levantadas: (1) existência de dinucleotídeos CpG críticos que não foram desmetilados após o tratamento ou (2) envolvimento de outros fatores no controle de expressão desse gene. Como discutido anteriormente, alguns CpG correspondem a sítios de ligação de fatores de transcrição, por

exemplo os sítios Sp1. A metilação desses sítios pode impedir a ligação do respectivo fator de transcrição ao DNA, impedindo ou diminuindo a transcrição gênica. Nós mostramos que na região mais 5' do gene de galectina-3 (no promotor e primeiro éxon) existem quatro sítios de ligação Sp1 que se encontravam metilados antes do tratamento com 5-Aza-CdR. Como esses sítios tornaram-se desmetilados após o tratamento parece que esta hipótese não seja suficientemente forte para explicar o baixo nível de expressão observado. De fato, um trabalho de Harrington e colaboradores (1988) demonstrou que a metilação de certos CpGs não impede a ligação de certas proteínas ao DNA, como por exemplo o fator de transcrição Sp1.²²⁹

É bem estabelecido na literatura que a metilação não é o único fator envolvido no controle de expressão gênica. Um importante elemento regulatório da expressão gênica é o *status* de compactação da cromatina, o qual é determinado por modificações pós-traducionais (metilação, acetilação e fosforilação) nas histonas.²³² Tais modificações podem afetar a estrutura da cromatina por alterar as interações entre as histonas e o DNA e, principalmente por controlar a ligação de proteínas à cromatina. Em geral, a acetilação de histonas está associada à formação de uma estrutura de cromatina mais relaxada que permite a ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente a transcrição gênica. Por outro lado, a desacetilação dessas proteínas torna a estrutura da cromatina mais compacta, impedindo a ligação de fatores de transcrição e conseqüentemente diminuindo ou impedindo a transcrição.²³³ As proteínas que participam do processo de acetilação e desacetilação de histonas são as histono-acetiltransferases (HATs) e histono-deacetilases (HDACs), respectivamente.^{234, 235} De particular importância para a regulação da atividade transcricional é a modificação de resíduos de lisina 9 da histona H3 (H3-K9). A acetilação

dessa lisina está associada com uma estrutura de cromatina ativa enquanto que sua metilação provoca a formação de heterocromatina, que impede a transcrição de genes associados.^{232, 236}

O padrão de metilação das ilhas de CpG também pode controlar o estado conformacional da cromatina. A metilação das ilhas de CpG provoca o recrutamento de proteínas que se ligam especificamente a CpG metilados (*methyl binding proteins*, MBDs). Essas proteínas recrutam complexos protéicos contendo co-repressores e histono-deacetilases (HDACs), que desacetilam as histonas, promovendo uma compactação da estrutura da cromatina que impede a transcrição gênica.^{237, 238} Diante desse cenário, pensamos que a expressão do gene de galectina-3 poderia estar sendo controlada não apenas por metilação do seu promotor, mas também por um inapropriado recrutamento de HDACs. Para verificar se a desacetilação de histonas estava envolvida no controle de expressão do gene de galectina-3, tratamos a linhagem Tm1 com dois inibidores de histono-deacetilases: tricostatina A (TSA) e ácido-4-fenilbutírico (PB).²³⁹ Estas drogas provocam uma hiperacetilação da estrutura da cromatina levando a uma mudança na expressão gênica, parada de ciclo celular, indução de apoptose e diferenciação de células transformadas.²⁴⁰⁻²⁴² Estas propriedades destes inibidores de histono-deacetilases indicam que as histono-deacetilases constituem alvos promissores para a terapia anticâncer. Atualmente, um grande número de protocolos clínicos estão avaliando a eficácia destes inibidores de histono-deacetilases no tratamento de diversos tipos de câncer. O análogo do butirato, fenilbutirato, que tem demonstrado capacidade de inibir o crescimento tumoral *in vivo* tem apresentado resultados promissores em protocolos clínicos de Fase I e II, especialmente em leucemias.²⁴³

Muitos estudos têm demonstrado que genes com promotores metilados e hipoacetilados não são ativados após o tratamento com inibidores de HDACs

somente, mas podem ser amplamente ativados com esses inibidores após parcial desmetilação com 5-aza-2'-deoxicitidina^{221, 222}. Os efeitos gerados pelo tratamento com a combinação 5-Aza-CdR/TSA foram contrários aos descritos na literatura. O tratamento com a combinação 5-Aza-CdR/TSA além de não aumentar os níveis de expressão de galectina-3 quando comparados aos obtidos com o tratamento com 5-Aza-CdR somente, bloqueou a expressão de galectina-3 na linhagem Tm1. Na menor concentração de TSA (50 nM) observamos re-expressão de galectina-3, porém a níveis semelhantes ao observado quando as células foram tratadas com 5-Aza-CdR apenas. Esse resultado nos sugeria que o efeito observado nesta situação foi causado por 5-Aza-CdR e não por TSA. Em um trabalho recente, Cameron e colaboradores mostraram que o efeito da metilação é dominante em relação ao efeito da desacetilação de histonas em manter o silenciamento transcricional de um gene cujo promotor encontra-se hipermetilado.²⁴⁴ Consistentemente, muitos trabalhos relatam que apenas uma pequena fração de genes tem sua expressão regulada por TSA. Um trabalho em que se avaliou a expressão global de genes em resposta ao tratamento de células linfóides humanas com TSA mostrou que apenas 2% dos genes foram regulados por TSA.²⁴⁵ De maneira semelhante, um outro trabalho com células de câncer gástrico demonstrou que apenas 5% dos 2.400 genes analisados foram regulados por TSA.²⁴⁶ Em adição, o efeito gerado pelos inibidores de HDACs parece dependente do tipo de célula. Consistente com isso, um trabalho mostrou que o gene *gelsolin* é fortemente regulado por inibidores de HDACs como TSA em células de carcinoma de bexiga (T24) enquanto que em células de carcinoma de mama (MDA 468 e 435) a expressão desse gene não é alterada em resposta ao tratamento dessas células com inibidores de HDACs.²⁴⁷ Esses dados podem explicar porque o tratamento com a menor concentração de TSA não foi capaz de induzir ou aumentar a expressão de galectina-3, mas não explicam porque o tratamento com as maiores

concentrações de TSA (100 e 200 nM) inibiu o efeito obtido quando essas células foram tratadas apenas com 5-Aza-CdR. Pode-se especular que nessas concentrações TSA estaria inibindo a expressão de galectina-3 por induzir a expressão de fatores que regulam negativamente a transcrição do gene de galectina-3 ou por inibir a expressão de outros fatores que regulam positivamente a expressão desse gene. Na literatura existem alguns trabalhos que demonstraram que o tratamento com inibidores de HDACs como TSA pode diminuir ou inibir a expressão de alguns genes. No entanto, nenhum destes trabalhos mostrou de que maneira esses inibidores provocaram esse efeito inibitório. Em adição, Verdel e colaboradores (1999) mostraram que duas histono-deacetilases murinas, mHDA1 e mHDA2, que são homólogas a HDA1, uma histono-deacetilase de levedura, tem sua expressão induzida em resposta a inibidores de HDACs.²⁴⁸

Alguns agentes diferenciadores de melanócitos, como fenilbutirato, butirato de sódio e seus derivados²⁴⁹ também são capazes de aumentar a acetilação de histonas por inibir as enzimas histono-deacetilases. Aqui nos utilizamos o diferenciador de melanócitos ácido-4-fenilbutírico (PB) na tentativa de induzir a expressão de galectina-3 em Tm1. As células tratadas com essa droga quando comparadas ao seu par não tratado apresentavam-se maiores e mais fusiformes (dados não mostrados), consistente com alterações morfológicas observadas durante a diferenciação de melanócitos. Entretanto, ao contrário do demonstrado por outros trabalhos^{250, 251} o tratamento não provocou produção de melanina por essas células. Com relação à indução da expressão do gene de galectina-3, observamos que essa droga se comportou de maneira semelhante ao observado com TSA, ou seja, não aumentou o nível de expressão de galectina-3 comparado ao obtido com 5-Aza-CdR e em algumas condições reverteu efeito gerado pelo agente desmetilante. Curiosamente, a expressão de galectina-3, obtida quando as células foram tratadas apenas com PB (4mM), foi perdida quando as células foram

tratadas com a combinação 5-Aza-CdR/PB (1 e 4 mM). Esses dados indicam que PB quando sozinho consegue induzir um certo nível de expressão de galectina-3, sugerindo talvez o envolvimento de remodeladores da cromatina no silenciamento do gene de galectina-3. Porém em combinação com o agente desmetilante esse efeito é reprimido. Nestas condições (5-Aza-CdR/PB 1 e 4 mM) pode ser que o agente diferenciador de melanócitos ácido-4-fenilbutírico esteja modulando a expressão de moléculas que regulam a expressão do gene de galectina-3 (como mencionado anteriormente para TSA).

Diferentemente do reportado na literatura, os inibidores de HDACs TSA e PB não foram eficientes em induzir a expressão do gene de galectina-3 na linhagem Tm1. Além de não potencializarem o efeito provocado pelo agente desmetilante 5-Aza-CdR, em algumas situações esses inibidores provocaram uma reversão do efeito gerado pelo tratamento com 5-Aza-CdR. Apesar disso, esses resultados não excluem a possibilidade de que agentes remodeladores da cromatina estejam envolvidos no controle de expressão do gene de galectina-3. Como discutido acima, cada inibidor de HDACs atua em um tipo específico de célula e regula apenas um pequeno número de genes. Talvez o tratamento com outros inibidores de HDACs ou o emprego de outras estratégias como a utilização de RNA de interferência para inibir a expressão de proteínas envolvidas na organização da estrutura da cromatina como, por exemplo, as HDACs possa ajudar a responder se de fato agentes remodeladores da estrutura da cromatina estão envolvidos no silenciamento desse gene.

O perfil de metilação do gene de galectina-3 nas células Tm1 em resposta ao tratamento com essas drogas foi avaliado por MSP. Exceto em algumas condições (5-Aza-CdR/TSA 50 nM, PB 4 mM e 5-Aza-CdR/PB 3 mM), os dados de metilação foram consistentes com os resultados de expressão, ou seja, nas condições em que não foram observadas expressão do gene de galectina-3

verificamos que o promotor desse gene estava metilado. Entretanto, em determinadas condições não foi possível estabelecer uma correlação entre a presença de expressão e a ausência de metilação. Por exemplo, os tratamentos 5-Aza-CdR/TSA 50 nM, 5-Aza-CdR/PB3 mM e PB 4mM induziram expressão de galectina-3, porém a análise de MSP mostrou que nestas condições o gene de galectina-3 estava metilado. Podemos então especular que: (1) a indução da expressão não está associada com a perda de metilação, podendo ser resultado da inibição das histono-deacetilases pelos inibidores de HDACs TSA e PB; o tratamento com PB 4 mM parece reforçar essa hipótese, (2) os dinucleotídeos presentes nos *primers* do MSP permaneceram metilados após estes tratamentos. Ainda, o aparecimento de bandas tanto na situação metilada quanto na não metilada refletem a heterogeneidade no perfil de metilação dos dinucleotídeos CpG após os tratamentos. Apesar de sensível para detectar o perfil de metilação de uma certa amostra de DNA, a técnica de MSP avalia poucos nucleotídeos (somente aqueles presentes nos *primers* utilizados),²¹⁴ sendo assim, seria interessante realizarmos a construção de novos *primers* contendo diferentes dinucleotídeos CpG para a reação de MSP e também realizarmos o seqüenciamento dessas amostras de maneira a confirmar o perfil de metilação observado por MSP. Como o MSP e o seqüenciamento após tratamento do DNA com bissulfato de sódio são estratégias que avaliam somente o perfil de metilação, nos casos em que as células são tratadas com inibidores de HDACs seria adequado utilizar técnicas que demonstrem as diferenças causadas diretamente pela ação dessas drogas como, por exemplo, uma alteração no perfil de acetilação de histonas. Neste caso seria adequado utilizar a técnica de imunoprecipitação da cromatina (*Chip assay*). No momento estamos realizando ensaios de padronização dessa técnica.

Em conjunto esses resultados sugerem que a metilação é o mecanismo preponderante na inativação da expressão do gene de galectina-3 neste modelo de progressão tumoral de melanoma murino.

Alguns trabalhos têm mostrado uma associação entre uma mudança na expressão de DNA metiltransferases e o aparecimento de um padrão aberrante de metilação em células de câncer ^{252, 253}. Em alguns cânceres a expressão dessas enzimas, principalmente da enzima DNMT1 encontra-se aumentada. A enzima DNMT1 é responsável por manter os padrões pré-estabelecidos de metilação durante o processo de replicação do DNA. A indução da expressão dessa enzima em células de cultura gradualmente provoca hipermetilação de CpG e transformação celular. Somando-se a isso, em um trabalho com células de câncer de bexiga, Fournel e colaboradores (1996) ²⁵⁴ mostraram que a depleção de DNMT1 com inibidores antisense induziu desmetilação e re-expressão do gene supressor de tumor *CDKN2A* que se encontrava silenciado. Em um outro trabalho, Robert e colaboradores (1998) ²⁵⁵ mostraram que a depleção de DNMT1 com RNA de interferência e inibidores antisense resultou numa redução da atividade da enzima, desmetilação global e gene específica e re-expressão de genes supressores de tumor em linhagens de célula de carcinoma de cólon. Ainda, esse grupo mostrou que a depleção específica de DNMT1, mas não de DNMT3A e DNMT3B, aumentou significativamente a capacidade do agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina reativar a expressão de genes supressores de tumor silenciados por metilação. Para verificar se havia uma correlação entre a expressão da enzima DNMT1 e a hipermetilação do promotor do gene de galectina-3, nós avaliamos a expressão do RNAm e o acúmulo dessa enzima no nosso modelo de progressão de melanomas. Análise de PCR em Tempo Real mostrou que as linhagens cujo promotor de galectina-3 encontra-se metilado (linhagens Tm1 e Tm5) apresentavam um pequeno aumento nos níveis de expressão do RNAm dessa

enzima em relação ao nível expresso por melan-a, sugerindo que a transformação maligna da linhagem melan-a está associada a um discreto, porém significativo aumento da expressão da enzima DNMT1. Entretanto, apenas este discreto aumento da expressão do gene de DNMT1 não parece ser suficiente para explicar o padrão de metilação aberrante do gene de galectina-3 observado neste modelo de progressão de melanoma murino. Com relação à proteína, aparentemente não havia diferenças entre as linhagens. Parece que a expressão dessa proteína é muito baixa nessas células, já que não conseguimos detectar sua presença por *Western blot*. Aqui nós mostramos que em nosso modelo de progressão de melanoma murino o padrão de metilação do gene de galectina-3 não parece associado com um aumento nos níveis da proteína DNMT1. Da mesma forma, Saito e colaboradores (2003) ²⁵⁶ não observaram nenhuma associação entre a hipermetilação do DNA de genes alvos e o aumento da expressão dessa DNMT em síndrome mielodisplásica. Esses resultados sugerem que, o padrão aberrante de metilação observado em tumores não é somente o resultado de um aumento da expressão das enzimas metiltransferases de DNA. Especulando-se, pode ser que o padrão de metilação do DNA esteja relacionado com o recrutamento dessas enzimas. De acordo com essa hipótese, algumas moléculas poderiam guiar as DNMTs para seus sítios potenciais de metilação (seqüências repetitivas do DNA, por exemplo) enquanto outras poderiam prevenir essas enzimas de determinados sítios (ilhas de CpG). No câncer ocorreria uma alteração dessas moléculas que provocaria uma redistribuição das DNMTs dos seus sítios alvos normais (regiões de heterocromatina) para sítios inapropriados (ilhas de CpG). Assim, a identificação de outros fatores que estejam envolvidos no processo de metilação é necessária para que se possa compreender os mecanismos responsáveis pelo padrão aberrante de metilação observado em tumores.

Em concordância com o observado no nosso modelo de progressão de melanoma murino, nós observamos que algumas células derivadas de melanoma de crescimento vertical humano apresentam uma redução nos níveis de galectina-3. Em um estudo recente em que o perfil de expressão gênica de uma linhagem de melanoma com baixo potencial metastático foi comparado com o perfil de expressão de uma linhagem de melanoma altamente metastático, Gallagher e colaboradores (2005) ²⁵⁷ mostraram que nas células com alto potencial metastático havia uma redução da expressão de galectina-3 quando comparado com o seu par não metastático, corroborando assim os nossos achados. Recentemente, Waleska Kerllen Martins e Luiz Fernando Lima Reis, utilizando análise de imunoistoquímica, avaliaram a distribuição de galectina-3 em amostras de melanoma de pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo. Análise semi-quantitativa do padrão de distribuição de galectina-3 nas diferentes amostras tumorais mostrou que o padrão de distribuição de galectina-3 nesses tumores é muito heterogêneo, havendo tanto amostras positivas como negativas para marcação com galectina-3. Além disso, verificou-se que a distribuição de galectina-3 é muito heterogênea dentro de uma mesma amostra de tumor, já que amostras de um mesmo paciente apresentavam “nichos” de células tumorais que expressavam quantidades variáveis de galectina-3. Algumas células expressam grande quantidade de galectina-3 enquanto outras células não expressam essa lectina. Em adição, foi observado que algumas amostras de metástase hematogênica apresentavam perda de expressão de galectina-3 (Apêndice 1). Em conjunto esses resultados sugerem que durante a progressão tumoral de melanomas há uma diminuição da expressão de galectina-3 e que esta redução, provavelmente, está associada com a aquisição de um fenótipo mais agressivo.

O padrão de distribuição de galectina-3 encontrado em melanomas também tem sido observado em outros tipos de tumores. Tumores como carcinoma de

ovário e endométrio apresentam uma diminuição da expressão ou acúmulo de galectina-3 ao longo da progressão tumoral.¹³⁶ Recentemente, em um trabalho com amostras de câncer de mama, nós mostramos que uma parcela significativa desses tumores apresentava perda da expressão de galectina-3 e que esta perda estava, ao menos em parte, associada à hipermetilação do promotor do gene de galectina-3 (Apêndice 2). Em concordância, em um trabalho recente, Ruebel *et al.*(2005)²⁵⁸ mostraram que a metilação está envolvida no controle de expressão de galectina-3 em tumores pituitários e em linhagens celulares de carcinoma de mama. Diante disso, resolvemos estender nossas análises de metilação, avaliando o padrão de metilação da região 5' do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano. Assim, avaliamos o perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 em amostras de melanoma humano de pacientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Para essa análise optamos pela técnica do MSP que permite avaliar um grande número de amostras com um custo relativamente baixo em relação ao seqüenciamento após tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Resultados preliminares com 29 amostras de melanoma mostraram que todas as amostras analisadas apresentavam bandas correspondentes a situação não metilada. Apesar de sensível para detectar o perfil de metilação de uma certa amostra de DNA, a técnica de MSP avalia poucos dinucleotídeos, somente aqueles presentes nos *primers* utilizados. Para confirmar os resultados obtidos com o MSP, o perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 foi avaliado por seqüenciamento após tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Em concordância com os resultados do MSP, a análise de seqüenciamento mostrou que todos os dinucleotídeos CpG presentes na região 5' do gene de galectina-3 estavam desmetilados em todas as amostras analisadas. Esses resultados sugerem que o promotor do gene de galectina-3 não se encontra metilado ao longo da progressão tumoral de melanomas humanos, diferentemente do observado em melanoma murino.

Entretanto, essa observação precisa ser melhor investigada, já que avaliamos um pequeno número de amostras. Assim, a análise de metilação da região 5' do gene de galectina-3 em um maior número de amostras, como também a avaliação do acúmulo de galectina-3 nesses tumores são imprescindíveis para determinarmos se há uma correlação entre os níveis de expressão e o perfil de metilação do gene de galectina-3 em melanomas humanos, como observado anteriormente para melanoma murino.

Nossos dados com melanoma murino suportam a noção de que a perda de galectina-3 causada pela ocorrência de metilação na região 5' do gene contribuiu para a transformação completa dessas células. De fato a perda de expressão de galectina-3 pelas células tumorais parece ser um mecanismo importante para a aquisição e manutenção do fenótipo transformado em melanoma murino. Luciana Nogueira de Sousa Andrade (Tese de doutoramento, 2007) mostrou recentemente que quando células melan-a, que expressam galectina-3, e células Tm1 transfectadas com o gene de galectina-3 são injetadas no coxim plantar de camundongos C57BL/6 estas deixam de acumular galectina-3 nas primeiras 24 horas após a injeção. Uma questão que pode ser levantada é: como a perda de uma molécula associada a vários processos biológicos que favorecem a progressão do câncer pode contribuir para a transformação maligna de melanomas? Uma hipótese seria de que a perda de galectina-3 facilitaria a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*). O aumento no nível de ROS levaria a um aumento da instabilidade genética que por sua vez favoreceria a transformação dessas células. Um estudo de Matarrese e colaboradores (2000) demonstrou que galectina-3 está envolvida no balanço oxidativo. Neste estudo eles mostraram que a expressão de galectina-3 consegue proteger as células dos efeitos de ROS. Esse grupo sugere que galectina-3 esteja agindo em eventos iniciais da sinalização de morte celular interferindo em uma via de apoptose que

está associada com a perturbação da homeostase mitocondrial e com subsequente formação de ROS.²⁵⁹ Em um estudo recente, em que foi realizada uma análise comparativa entre as proteínas e transcritos das células que compõem o modelo de progressão de melanoma murino em estudo, nós mostramos que a transformação maligna completa dessas células foi acompanhada por uma redução significativa nos níveis de expressão de moléculas envolvidas na degradação de ROS. Neste estudo nós mostramos que pelo menos dois genes que estão implicados no metabolismo de ROS tem sua expressão completamente perdida ao longo da progressão tumoral: o gene de galectina-3 e metalotioneína-2.¹⁶⁰ Em adição nós verificamos que a perda de galectina-3 pelas células Tm1 e Tm5 foi acompanhada pela perda de expressão de dois genes supressores de tumor que se encontram freqüentemente inativados em melanomas: *p16^{INK4a}* e *p19^{ARF}* (dados não mostrados).

Ainda, com base nos dados obtidos por Marilena da Costa (Tese de mestrado, 2003) de que a indução da expressão de galectina-3 em Tm1, após transfecção dessas células com o gene de galectina-3, provocou uma acentuada diminuição no seu crescimento celular, nós especulamos que o silenciamento desse gene por metilação representa uma vantagem seletiva para o crescimento dessas células e conseqüentemente para a progressão de melanoma murino.

Neste trabalho, o padrão de metilação do promotor do gene de galectina-3 foi avaliado em um modelo celular de progressão de melanoma murino e em amostras de melanoma humano. Através dessas análises, observamos que a região promotora e primeiro éxon do gene de galectina-3 encontram-se completamente metilados ao longo da progressão de melanoma murino e que a presença de metilação está diretamente relacionada com a ausência de mRNA e da proteína em células que simulam estágios avançados da progressão de melanoma murino (Tm1 e Tm5). Nós mostramos aqui que a transformação maligna completa

destas células foi acompanhada pelo silenciamento seletivo de galectina-3 por metilação, mas não por galectina-1, já que essas células expressam e acumulam essa lectina. De maneira semelhante ao observado com galectina-3, essa lectina apresenta a região 5' do seu gene imersa em uma ilha de CpG, tornando esse gene passível de ser controlado transcricionalmente por metilação. Como mencionado anteriormente, alguns trabalhos têm mostrado que a expressão desse gene é controlada por metilação em alguns tipos de tumores.²³⁰

Diante do exposto aqui fica claro que a hipermetilação do gene de galectina-3 é um evento importante na tumorigênese deste modelo de melanoma murino. Entretanto ainda não está claro quais mecanismos determinam que as ilhas de CpG presentes na região 5' desse gene sejam mais susceptíveis a metilação que as ilhas de CpG na região 5' do gene de galectina-1. Por que genes com mesmo “potencial” para sofrer metilação são metilados em um tipo de câncer e “protegidos” de metilação em outros tipos de câncer?

Estudos adicionais são necessários para identificar os fatores que determinam que o gene de galectina-3 seja silenciado durante a progressão de melanoma murino. E ainda, para determinar de que maneira o silenciamento desse gene favoreceria a progressão desse tipo de tumor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Neste trabalho mostramos que:

1. O promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 murina apresenta uma ilha de CpG que se encontra totalmente metilada nas linhagens de melanoma de crescimento vertical (Tm1 e Tm5) e desmetilada na linhagem de melanócito ou melanoma de crescimento radial (melan-a).

2. O tratamento da linhagem Tm1 com o agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina provocou um decréscimo significativo nos níveis de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 murina.

3. A diminuição nos níveis de metilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 verificada após o tratamento da linhagem Tm1 com 5-Aza-2'-deoxicitidina levou a uma re-expressão do RNAm e da proteína.

4. O tratamento da linhagem Tm1 com os inibidores de histona-deacetilase (Tricostatina e 4-ácido-fenilbutírico) em combinação com 5-Aza-2'-deoxicitidina não aumentou os níveis de expressão do gene de galectina-3 quando comparado com o nível obtido após o tratamento com 5-Aza-2'-deoxicitidina e ainda, em determinadas condições, reverteu o efeito obtido com o tratamento com 5-Aza-2'-deoxicitidina.

5. As linhagens Tm1 e Tm5 apresentaram um discreto aumento nos níveis de expressão da enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1) em relação a linhagem melan-a.

6. Em amostras de melanoma humano o promotor do gene de galectina-3 encontra-se completamente desmetilado.

Em conclusão esses resultados indicam que a hipermetilação do promotor e primeiro éxon do gene de galectina-3 está envolvida no controle transcricional desse gene ao longo da progressão tumoral de melanoma murino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res.* 10: 303-312, 2000.
2. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene.* 20: 3042-3052, 2003.
3. American Cancer Society. ACS Key statistics 2006. What are the key statistics about melanoma? (http://www.cancer.org/docroot/stt/stt_0.asp).
4. Hall HI, Jamison P, Fulton JP, Clutter G, Roffers S, Parrish P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. *J Am Acad Dermatol.* 4: 624-30, 2003.
5. Instituto Nacional do Câncer. (<http://www.inca.gov.Br>).
6. Mackie RM, Freudenberger T, Aitchison TC. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet.* 2: 487-490, 1989.
7. Reintgen DS, McCarty KM Jr, Cox E, Seigler HF. Malignant melanoma in black American and white American populations. A comparative review. *JAMA.* 15: 1856-1859, 1982.
8. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int. J. Cancer.* 73: 198-203, 1997.
9. Whiteman DC, Green AC. Melanoma and sun exposure: where are we now? *Int J Dermatol.* 7: 481-489, 1999.
10. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene.* 20: 3099-3112, 2003.
11. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 17: 1341-1348, 1999.
12. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 6: 459-63, 2000.
13. Finkel, E. Sorting the hype from the facts in melanoma. *Lancet.* 351: 1866, 1998
14. Haluska FG, Hodi FS. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 16: 670-682, 1998.
15. Holly, E. A., Kelly, J. W., Shpall, S. N., Chiu, S. H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J. Am. Aca. Dermatol.* 17: 459-468, 1987.
16. Kraemer, K. H., Herlyn, M., Yuspa, S. H., Clark, W. H., Townsend, G. K., Neises, G. R., Hearing, V. J. Reduced DNA repair in cultured melanocytes and nevus cells from a patient with xeroderma pigmentosum. *Arch. Dermatol.* 125: 263-268, 1989.
17. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 12: 1147-1165, 1984.
18. Jost LM. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of cutaneous malignant melanoma *Ann Oncol.* 7: 1012-1013, 2003.
19. Meier, F., Satyamoorthy, K., Nesbit, M., Hsu, M. Y., Schitteck, B., Garbe, C., and Herlyn, M. Molecular events in melanoma development and progression. *Front. Biosci.*, 3: 1005-1010, 1998.
20. Castellano M, Parmiani G. Genes involved in melanoma: an overview of INK4a and other loci. *Melanoma Res.* 5: 421-432, 1999.
21. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer.* 2: 157-163, 1998.
22. Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie, R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature.* 6817: 207-211, 2001.

23. Iida J, Pei D, Kang T, Simpson MA, Herlyn M, Furcht LT, McCarthy JB. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *Biol Chem.* 22: 18786-94, 2001.
24. Friedl P, Brocker EB, Zanker KS. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun.* 6: 225-36.
25. Johnson, J. P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 345-357, 1999.
26. Hsu, M. Y., Meier, F. E., Nesbit, M., Hsu, J. Y., van Belle, P., Elder, D. E., and Herlyn, M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am.J.Pathol.*, 156: 1515-1525, 2000.
27. Barth, A. I., Nathke, I. S., and Nelson, W. J. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 683-690, 1997.
28. Bienz M. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol.* 15:R64-7, 2005.
29. Gottardi, C. J., Wong, E., and Gumbiner, B. M. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta- catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J.Cell Biol.* 153: 1049-1060, 2001.
30. Hsu, M. Y., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., and Herlyn, M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1: 188-194, 1996.
31. Omholt K, Platz A., Kanter L., Ringborg U., Hansson, J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res.* 9: 6483-8, 2003.
32. Albino A. P., Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene.* 4: 1363-74, 1989.
33. Gutkind, J. S. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G-Protein coupled receptors. *Science's stke*, 40: 1-13, 2000.
34. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J., Elder, C.J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 17: 1395-413, 1998.
35. Demunter A, Stas M, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *J Invest Dermatol.* 117: 1483-9, 2001.
36. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62: 6997-7000, 2002.
37. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 33: 19-20, 2003.
38. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 63:756-759, 2003.
39. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 122: 337-341, 2004.
40. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* 1439-1445, 2001.
41. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene.* 22: 3113-3122, 2003.
42. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 63: 2881-2890, 2003.
43. Guldberg P, Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* 57: 3660-3663, 1997.
44. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res.* 66: 6546-6552, 2006.

45. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 2110-2115, 1999.
46. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*. 64: 7002-7010, 2004.
47. Pollock PM, Trent JM. The genetics of cutaneous melanoma. *Clin Lab Med*. 20: 667-690, 2000.
48. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 365: 687-701, 2005.
49. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 22: 3092-3098, 2003.
50. Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol*. 41: 550-6, 2002.
51. Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer*. 74: 255-259, 1997.
52. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 353: 2135-2147, 2005.
53. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager MJ. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res*. 61: 5303-5306, 2001.
54. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 92: 713-723, 1998.
55. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 24: 2899-2908, 2005.
56. Sharpless NE, Ramsey MR, Balasubramanian P, Castrillon DH, DePinho RA. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene*. 23: 379-385, 2004.
57. Recio JA, Noonan FP, Takayama H, Anver MR, Duray P, Rush WL, Lindner G, De Fabo EC, DePinho RA, Merlino G. Ink4a/arf deficiency promotes ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Cancer Res*. 62: 6724-6730, 2002.
58. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res*. 18: 150-159, 2005.
59. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 24: 195-222, 2005.
60. Danen, E. H., van Muijen, G. N., van de Wiele-van Kemenade, Jansen, K. F., Ruiter, D. J., and Figdor, C. G. Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells. *Int.J Cancer*. 54: 315-321, 1993.
61. Kramer, R. H., McDonald, K. A., Crowley, E., Ramos, D. M., and Damsky, C. H. Melanoma cell adhesion to basement membrane mediated by integrin-related complexes. *Cancer Res*. 49: 393-402, 1989.
62. Ramos, D. M., Berston, E. D., and Kramer, R. H. Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Res*. 50: 728-734, 1990.
63. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology*. 24: 249-56, 1994.
64. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 85: 683-693, 1996.
65. Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol*. 115: 625-632, 2000.

66. Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol*. 24: 212-218, 1997.
67. Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res. Suppl* 2:S19-26, 1997.
68. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP. Expression of transforming growth factor-beta 2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. Implications for tumor progression. *Am J Pathol*. 145: 97-104, 1994.
69. Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N. W., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, R. C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F.-T., Lotan, R., Mercurio, A. M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirier, F., Raz, A., Rigby, P. W. J., Rini, J. M., and Wang, J. L. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 76: 598, 1994.
70. abius, H. J. Animal lectins. *European Journal of Biochemistry*. 243: 543-576, 1996.
71. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 60: 267-276, 2003.
72. Houzelstein D, Goncalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol*. 21: 1177-1187, 2004.
73. Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta*. 1572: 209-231, 2002.
74. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J*. 19: 433-440, 2004.
75. Barondes, S. H., Cooper, D. N. W., Gitt, M. A., and Leffler, H. Galectins - Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 20807-20810, 1994.
76. Gong, H. C., Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Hogan, V., Mazurak, N., Bresalier, R. S., and Raz, A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res*. 59: 6239-6245, 1999.
77. Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J Biol Chem*. 279: 10841-10847, 2004.
78. Brewer CF, Miceli MC, Baum LG. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 12: 616-623, 2002.
79. Yang RY, Hill PN, Hsu DK, Liu FT. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry*. 37: 4086-4092, 1998.
80. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*. 19: 527-535, 2004.
81. Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 1760: 616-635, 2006.
82. Perillo, N. L., Marcus, M. E., Baum, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med*. 76: 402-412, 1998.
83. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*. 23: 313-320, 2002.
84. Le Marer N. Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells. *Cell Biol Int*. 24: 245-251, 2000.
85. Liu F, Patterson R, Wang J. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1572: 263, 2002.
86. Matarrese, P., Tinari, N., Semeraro, M. L., Natolib, C., Iacobelli, S., and Malorni, W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.*, 473: 311-315, 2000.
87. Fukumori, T., Takenaka, Y., Oka, N., Yoshii, T., Hogan, V., Inohara, H., Kanayama, H. O., Kim, H. R., and Raz, A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res*. 64: 3376-3379, 2004.

88. Yoshii, T., Fukumori, T., Honjo, Y., Inohara, H., Kim, H. R., and Raz, A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J.Biol.Chem.*, 2001.
89. Kim, H. R., Lin, H. M., Biliran, H., and Raz, A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 59: 4148-4154, 1999.
90. Inohara, H. and Raz, A. Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res.* 55: 3267-3271, 1995.
91. Inohara, H., Akahani, S., Kothe, K., and Raz, A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell- cell adhesion. *Cancer Res.* 56: 4530-4534, 1996.
92. Villa-Verde, D. M., Silva-Monteiro, E., Jasiulonis, M. G., Farias-de-Oliveira, D. A., Brentani, R. R., Savino, W., and Chammas, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.* 32: 1434-1444, 2002.
93. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 246: 788-791, 1998.
94. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol.* 156: 3939-3944, 1996.
95. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 83: 667-676, 2001.
96. Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al-Awqati Q. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol.* 151: 1235-1246, 2000.
97. Ochieng J, Warfield P, Green-Jarvis B, Fentie I. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. *J Cell Biochem.* 75: 505-514, 1999.
98. Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology.* 12: 329-337, 2002.
99. Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 1213-1217, 1995.
100. Song S, Byrd JC, Mazurek N, Liu K, Koo JS, Bresalier RS. Galectin-3 modulates MUC2 mucin expression in human colon cancer cells at the level of transcription via AP-1 activation. *Gastroenterology.* 129: 1581-1591, 2005.
101. Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini 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.
102. Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation *Exp Cell Res.* 245: 294-302, 1998.
103. Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64: 6363-6367, 2004.
104. Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene.* 21: 8001-8010, 2002.
105. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 6737-6742, 1996.
106. Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 7: 661-668, 2001.
107. Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int J Oncol.* 18: 787-792, 2001.
108. Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, Xu XC. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate.* 50: 64-70, 2002.
109. Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, Kikuchi A, Kuwano H, Raz A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 65: 3535-3537, 2005.
110. Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 164: 893-902, 2004.
111. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57: 5272-5276, 1997.

112. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 156: 1073-1083, 2000.
113. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 277: 15819-15827, 2002.
114. Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T, Raz A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. *Cancer Res.* 65: 7546-7553, 2005.
115. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem.* 268: 26712-8, 1993.
116. Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS, Raz A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4395-4406, 2004.
117. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 63: 8302-8311, 2003.
118. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J.* 19: 441-449, 2004.
119. Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys.* 349: 7-20, 1998.
120. senberg, I. M., Iyer, R., Cherayil, B., Chiodino, C., and Pillai, S. Structure of the murine Mac-2 gene. Splice variants encode proteins lacking functional signal peptides. *J.Biol.Chem.*, 268: 12393-12400, 1993.
121. Yamazaki K, Kawai A, Kawaguchi M, Hibino Y, Li 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: 1077-1084, 2001.
122. Fogel S, Guittaut M, Legrand A, Monsigny M, Hebert E. The tat protein of HIV-1 induces galectin-3 expression. *Glycobiology.* 9: 383-387, 1999.
123. Hebert E, Monsigny M. Galectin-3 mRNA level depends on transformation phenotype in ras-transformed NIH3T3 cells. *Biol Cell.* 81: 73-76, 1994.
124. Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 7324-7328, 1990.
125. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 21: 5427-5440, 2002.
126. Toyota, M. and Issa, J. P. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis.* 21: 329-333, 2000.
127. Esteller, M., Fraga, M. F., Paz, M. F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F. J., Calasanz, M. J., Galm, O., Guo, M., Benitez, J., and Herman, J. G. Cancer epigenetics and methylation. *Science.* 297: 1807-1808, 2002.
128. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 349: 2042-2054, 2003.
129. Danguy, A., Camby, I., and Kiss, R. Galectins and cancer. *Biochim.Biophys.Acta*, 1572: 285, 2002.
130. Xu, X. C., el-Naggar, A. K., Lotan, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.* 147: 815-822, 1995.
131. Saggiorato E, Cappia S, De Giuli P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, Angeli A, Orlandi F. Galectin-3 as a presurgical immunocyto-diagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 5152-5158, 2001.
132. Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, Fromm S, Glossmann J, Hanisch FG, Monig SP, Schroder W, Flucke U, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. Increased galectin-3 expression in gastric cancer:

correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. *Tumour Biol.* 21: 258-266, 2000.

133. Cindolo L, Benvenuto G, Salvatore P, Pero R, Salvatore G, Mirone V, Prezioso D, Altieri V, Bruni CB, Chiariotti L. galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. *Int J Cancer.* 84: 39-43, 1999.

134. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, 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: 776-787, 1997.

135. Castronovo, V., van den Brule, F. A., Jackers, P., Clausse, N., Liu, F.-T., Gillet, C., and Sobel, M. E. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J.Pathol.* 179: 43-48, 1996.

136. van den Brule, F. A., Berchuck, A., Bast, R. C., Liu, F. T., Gillet, C., Sobel, M. E., and Castronovo, V. Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas. *Eur.J.Cancer.* 30A: 1096-1099, 1994

137. Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett.* 195: 111-119, 2003.

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

139. Mazurek N, Sun YJ, Price JE, Ramdas L, Schober W, Nangia-Makker P, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of genes. *Cancer Res.* 65: 10767-75, 2005.

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

141. van den Brule, F. A. et al. Antisense galectin-3 alters thymidine incorporation in human MDA-MB435 breast cancer cells. *Int J. Oncol.* 11: 261-264, 1997.

142. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* 63: 3805-11, 2003.

143. Mataresse, P et al. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int. J. Cancer.* 85: 545-554, 2000.

144. Le Marer N, Hughes RC. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 168: 51-58, 1996.

145. O'Driscoll L, Linehan R, Liang YH, Joyce H, Oglesby I, Clynes M. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP), in vitro. *Anticancer Res.* 22: 3117-3125, 2002.

146. Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene.* 23: 7527-7536, 2004.

147. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 156: 899-909, 2000.

148. Brustmann H, Riss D, Naude S. Galectin-3 expression in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrial tissues. *Pathol Res Pract.* 199: 151-158, 2003.

149. Endo K, Kohnoe S, Tsujita E, Watanabe A, Nakashima H, Baba H, Maehara Y. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 25: 3117-21, 2005.

150. Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology.* 113: 1906-1915, 1997.

151. Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A, Kubo T. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 6: 4635-40, 2000.

152. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett.* 212: 233-239, 2004.
153. Shibata T, Noguchi T, Takeno S, Takahashi Y, Fumoto S, Kawahara K. Impact of nuclear galectin-3 expression on histological differentiation and vascular invasion in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 13: 235-239, 2005.
154. Mathieu A, Saal I, Vuckovic A, Ransy V, Vereerstraten P, Kaltner H, Gabius HJ, Kiss R, Decaestecker C, Salmon I, Rummelink M. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 18: 1264-71, 2005.
155. Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology.* 40: 80-87, 2002.
156. Vereecken P, Zouaoui Boudjeltia K, Debray C, Awada A, Legssyer I, Sales F, Petein M, Vanhaeverbeek M, Ghanem G, Heenen M. High serum galectin-3 in advanced melanoma: preliminary results. *Clin Exp Dermatol.* 31: 105-109, 2006.
157. Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. *Am J Pathol.* 168: 1666-75, 2006.
158. Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, Johnson MM, Lopez A, Diwan AH, Lazar AJ, Shen SS, Zhang PS, Reed JA, Gershenwald JE, Raz A, Bar-Eli M. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. *Clin Cancer Res.* 12: 6709-15, 2006.
159. Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, Jasiulionis MG. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia.* 8: 231-241, 2006.
160. de Souza GA, Godoy LM, Teixeira VR, Otake AH, Sabino A, Rosa JC, Dinarte AR, Pinheiro DG, Silva WA Jr, Eberlin MN, Chammas R, Greene LJ. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. *Proteomics.* 6: 1460-1470, 2006.
161. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21, 2002.
162. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293: 1068-1070, 2001.
163. Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene.* 21: 5361-5379, 2002.
164. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet.* 38: 285-303, 2001.
165. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 321: 209-213, 1986.
166. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 11995-9, 1993.
167. Cross SH, Bird AP. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev.* 5: 309-14, 1995.
168. Jones P. A. and Baylin S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.* 3: 415-428, 2002.
169. Baylin SB. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science.* 277: 1948-1949, 1997.
170. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 3: 253-266, 2003.
171. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 23: 185-188, 1999.
172. Herman J. G., Latif F., Weng Y., Lerman M. I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D. S., Gnarr J. R., Linehan W. M., and . Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 91: 9700-9704, 1994.
173. Plass C. and Soloway P. D. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur.J.Hum.Genet.* 10: 6-16, 2002.
174. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 93: 4059-4070, 1999.

175. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 3: 226-231, 1993.
176. Singal R, Ferris R, Little JA, Wang SZ, Ginder GD. Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells *Proc Natl Acad Sci.* 94: 13724-9, 1997.
177. Prokhortchouk E, Hendrich B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene.* 21: 5394-9, 2002.
178. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 99: 451-454, 1999.
179. Tyler JK, Kadonaga JT. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell.* 99: 443-446, 1999.
180. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* 62: 7213-7218, 2002.
181. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16: 168-174, 2000.
182. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 21: 5400-13, 2002.
183. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet.* 10: 687-692, 2001.
184. Stirzaker C, Millar DS, Paul CL, Warnecke PM, Harrison J, Vincent PC, Frommer M, Clark SJ. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.* 57: 2229-2237, 1997.
185. Dodge JE, List AF, Futscher BW. Selective variegated methylation of the p15 CpG island in acute myeloid leukemia. *Int.J.Cancer* 78: 561-567, 1998
186. Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* 35: 476-483, 1999.
187. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 57: 3347-3350, 1997.
188. Kohonen-Corish MR, Cooper WA, Saab J, Thompson JF, Trent RJ, Millward MJ. Promoter hypermethylation of the O(6)-methylguanine DNA methyltransferase gene and microsatellite instability in metastatic melanoma. *J Invest Dermatol.* 126: 167-171, 2006.
189. Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A, Schneider-Stock R. DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 240: 69-75, 2006.
190. Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet.* 2006;47(4):365-75.
191. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 22;91(24):11733-7.
192. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(15):3730-40.
193. Yang X, Yan L, Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2001 Jun;8(2):115-27.
194. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica.* 2002 Dec;87(12):1324-41.
195. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997 Aug 15;90(4):1403-9.
196. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene.* 2002 Aug 12;21(35):5450-61.
197. Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006 Feb;126(2):422-31.

198. van Doorn R, Gruis NA, Willemze R, van der Velden PA, Tensen CP. Aberrant DNA methylation in cutaneous malignancies. *Semin Oncol*. 2005 Oct;32(5):479-87.
199. Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, Kikuchi K, Otsuka F, Sugimura T, Ushijima T. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer Sci*. 2004 Dec;95(12):962-8.
200. Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene*. 2004 May 13;23(22):4014-22.
201. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983 Jan 6;301(5895):89-92.
202. Kim YI, Giuliano A, Hatch KD, Schneider A, Nour MA, Dallal GE, Selhub J, Mason Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*. 1994 Aug 1;74(3):893-9.
203. Bedford MT, van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res*. 1987 Oct 15;47(20):5274-6.
204. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14412-7.
205. Toyota, M. and Issa, J. P. The role of DNA hypermethylation in human neoplasia. *Electrophoresis*, 21: 329-333, 2000.
206. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Feb 28;111(1):47-54.
207. Alves G, Tatro A, Fanning T. Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene*. 1996 Oct 17;176(1-2):39-44.
208. Singer MF, Krek V, McMillan JP, Swergold GD, Thayer RE. LINE-1: a human transposable element. *Gene*. 1993 Dec 15;135(1-2):183-8.
209. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, Ehrlich M. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;89(1-2):121-8.
210. Jurgens B, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5698-703.
211. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 9;93(14):7149-53.
212. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 162: 156-159, 1987.
213. Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
214. Clarck, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., Fromer, M. High sensivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Acids Res*. 22, 2990-2997, 1994.
215. Lowry et al., *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951
216. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970. .
217. Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9821-9826, 1996.
218. Lahm, H., André, S., Hoefflich, A., Fischer, J. R., Sordat, B., Kaltner, H., Wolf, E., Gabius, H. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 127(6): 375-86, 2001.
219. Vitzthum, F., Geiger, G., Bisswanger, H., Brunner, H., Bernhagen, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal. Biochem*. 276(1): 59-64, 1999.

220. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: 2002-2007, 2001.
221. Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M. P., Herman, J. G., and Baylin, S. B. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat.Genet.*, 31: 141-149, 2002.
222. Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G., and Davidson, N. E. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61: 7025-7029, 2001.
223. Rosenberg, I.M., Iyer, R., Cherayil, B., and Pillai, S. Structure of murine Mac-2 gene: splice variants encode proteins lacking functional signal peptides. *J. Biol. Chemistry*, 268: 12393-12400, 1993.
224. Lantry, L. E., Zhang, Z., Crist, K. A., Wang, Y., Kelloff, G. J., Lubet, R. A., and You, M. 5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model. *Carcinogenesis*, 20: 343-346, 1999.
225. Juttermann, R., Li, E., and Jaenisch, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91: 11797-11801, 1994.
226. Clark, S. J., Harrison, J., and Molloy, P. L. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene*, 195: 67-71, 1997.
227. Mancini, D. N., Singh, S. M., Archer, T. K., and Rodenhiser, D. I. Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene*, 18: 4108-4119, 1999.
228. Holler, M., Westin, G., Jiricny, J., and Schaffner, W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev.*, 2: 1127-1135, 1988.
229. Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(7):2066-70.
230. Salvatore P, Benvenuto G, Pero R, Lembo F, Bruni CB, Chiariotti L. Galectin-1 gene expression and methylation state in human T leukemia cell lines. *Int J Oncol.* 2000 Nov;17(5):1015-8.
231. Moisan S, Demers M, Mercier J, Magnaldo T, Potworowski EF, St-Pierre Y. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia.* 2003 Apr;17(4):751-9.
232. Iizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Apr;13(2):154-60.
233. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):41-5.
234. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Jun;64(2):435-59.
235. Ng, H. H. and Bird, A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem.Sci.*, 25: 121-126, 2000.
236. Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jenuwein T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):77-80.
237. Hendrich B, Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;249:55-74.
238. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
239. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Apr;1(4):287-99.
240. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 2;92(15):1210-6.
241. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 29;97(18):10014-9.

242. Sambucetti LC, Fischer DD, Zabludoff S, Kwon PO, Chamberlin H, Trogani N, Xu H, Cohen D. Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *Biol Chem.* 1999 Dec 3;274(49):34940-7.
243. Gore SD, Weng LJ, Figg WD, Zhai S, Donehower RC, Dover G, Grever MR, Griffin C, Grochow LB, Hawkins A, Burks K, Zabelena Y, Miller CB. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002 Apr;8(4):963-70.
244. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat.Genet.*, 21: 103-107, 1999.
245. Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5:245-53, 1996.
246. Lee H, Lee S, Baek M, Kim HY, Jeoung DI. Expression profile analysis of trichostatin A in human gastric cancer cells. *Biotech Lett.* 24: 377-381, 2002.
247. Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett.* 499:199-204, 2001.
248. Verdel A, Khochbin S. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases.Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem.* 274:2440-5, 1999.
249. Liu L, Shack S, Stetler-Stevenson WG, Hudgins WR, Samid D. Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *The Journal of Investigative Dermatology*, 103: 335-340, 1994.
250. Taylor CW, Hersh EM. Chemotherapy of advanced melanoma in Malignant Melanoma. Leong SP. *Advances in Treatment.* R. G. Landes Company, Austin: 81-96, 1992.
251. Takahashi H, Parsons PG. In vitro phenotypic alteration of human melanoma cells induced by differentiating agents: heterogeneous affects on cellular growth and morphology, enzymatic activity, and antigenic expression. *Pigment Cell Res.* 3:223-232,1990.
252. El-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB. High expression of DNA methyltransferases gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3470-3474, 1991.
253. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1,3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27: 2291-2298, 1999.
254. Yoder JA, Yen R.-Y, Vertino PM, Bestor TH, Baylin SB. New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5) methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 271: 31092-31097, 1996.
255. Mertineit C, yoder J, Taketo T, Laird D, Trasler J, Bestor T. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development.* 125: 889-897, 1998.
256. Aoki E, Ohashi H, Uchida T, Murate T, Saito H, Kinoshita T. Expression levels of DNA methyltransferase genes do not correlate with p15INK4B gene methylation in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 17: 1903-4. 2003.
257. Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, Kelly ZD, Nolan IM, Fox EJ, Culhane AC, McArdle L, Fraga MF, Hughes L, Currid CA, O'Mahony F, Byrne A, Murphy AA, Moss C, McDonnell S, Stallings RL, Plumb JA, Esteller M, Brown R, Dervan PA, Easty DJ. Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis.* 26: 1856-67, 2005.
258. Ruebel KH, Jin L, Qian X, Scheithauer BW, Kovacs K, Nakamura N, Zhang H, Raz A, Lloyd R. V. Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors. *Cancer Res.*, 65: 1136-1140, 2005.
259. Matarrese P, Tinari N, Semeraro ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett.* 473:311-315, 2000.

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1

Expressão de galectina-3 em lesões pigmentadas

Figura 1. Análise semi-quantitativa da distribuição de galectina-3 em amostras de melanoma humano. A expressão de galectina-3 foi avaliada por imunohistoquímica. As amostras com *score* acima de 3 foram consideradas positivas para marcação com galectina-3. *Score* refere-se a intensidade de marcação *versus* a distribuição de galectina-3 nas células tumorais. Dados de projeto colaborativo com Walesca K. Martins e Luiz Fernando Lima Reis do Hospital do A.. C. Camargo.

Figura 2. Exemplo da distribuição de galectina-3 em melanoma humano. A expressão de galectina-3 em diferentes amostras de melanoma de pacientes do Hospital do Câncer A. C. Camargo foi avaliada por imunohistoquímica. Como mostrado na figura, há tumores que acumulam galectina-3 (Painéis A, B, D, F e G) e tumores cuja expressão de galectina-3 é perdida (Painéis C, E e H). Aumento de 100X.

8.1 APÊNDICE 2

Figura 1. Perfil de metilação da região 5' do gene de galectina-3 em casos de carcinoma de mama. O perfil de metilação do gene de galectina-3 em amostras de carcinoma de mama de pacientes do Hospital A. C. Camargo foi avaliado por MSP. (A) exemplo de amostras metiladas. (B) exemplos de amostras não metiladas. As linhagens celulares MCF-7 e SKBR3 representam controles da reação de MSP. MCF-7 (controle não metilado) e SKBR3 (controle metilado).

Figura 2: Análise imunohistoquímica de galectina-3 em alguns casos de carcinoma ductal invasivo de mama. A, B, C, D estão em diferentes estádios, respectivamente, 1, 2, 3 e 4, sendo que todos expressam galectina-3 e não estão metilados. E, F, G, H não expressam galectina-3, sendo E correspondente a um caso não metilado, enquanto que F, G, H apresentam metilação do promotor de galectina-3. Nota-se ainda positividade nuclear focal na célula neoplásica num dos casos metilados (seta, figura H, 400x HPF). Esses pertencem a estádio 3 e 4. A,B,D,E,F,G E H representam 100x HPF e C, 200x HPF. Todas as imagens foram digitalizadas utilizando programa Nikon ACT-1.