Silvina Odete Bustos

Resposta celular associada à expressão de galectina-3 em linhagens de melanoma expostas a irradiação

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bustos, Silvina Odete
Resposta celular associada à expressão de galectina-3 em linhagens de melanoma expostas a irradiação / Silvina Odete Bustos. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.
Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Galectina-3 2.Melanoma 3.Raios ultravioleta/efeitos adversos 4.Sobrevivência 5.MAP quinases reguladas por sinal extracelular 6.Mitocondrias 7.Dano ao DNA/efeitos de radiação 8.Autofagia/efeitos de radiação 9.Proteínas quinases JNK ativadas por mitógeno/efeitos de radiação

USP/FM/DBD-30/14

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

À minha família por estar sempre me acompanhando, apoiando e pelo grande carinho, obrigada mami, papi, nona, Jorge, Teo e Nero.

A minhas amigas e amigos de Argentina que ao longo dos anos continuam sendo pessoas maravilhosas, sempre me apoiam e me esperam de braços abertos.

A Emília e Santiago por estar presentes ao longo dos anos e me fazer rir em todo momento.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pela oportunidade, humildade e o apoio na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Rony Seger e o seu grupo pela ajuda e por ter me mostrado outras formas de fazer pesquisa. Agradeço a Rony pela motivação e por ter sido um excelente guia turístico em Israel e em especial a Guy, Einat e Shira que me ajudaram a passar melhores dias em Israel.

A meus amigos latinos em Israel, Euclides, Karen, Any, Gonzalo e Mariano. Agradeço pela simplicidade e o bom coração que me ajudaram muito nos dias difíceis.

Aos amigos que já não vejo ou que já não estão aqui, mas que sempre estarão em meu coração: Jorge, Luciana, Luiza, Ana.

Aos amigos de Bio Cel do meu coração: Rafa, MM, Re, Carol e Luiza por me acompanhar tanto na vida como na pesquisa. A presença de vocês foi o ingrediente essencial para poder melhorar nos momentos ruins.

A Tharci, Pri, Lu. A, Angélica, pela grande ajuda nos últimos meses da realização deste projeto.

Ao Grupo de Biologia Celular, um grupo numeroso, mas com pessoas sempre dispostas a ajudar e a aprender.

À Profa. Dra. Cristiane Damas Gil pela ajuda e a boa vontade para fazer microscopia eletrônica.

À Ana Lúcia Garippo pela ajuda com microscopia confocal e por ser sempre tão prestativa e agradável.

A todos os funcionários do LIM 24 e do ICESP que sem eles a realização deste projeto não seria possível.

Ao Brasil por ter me recebido e me oferecido essa linda cultura que aprendi a querer e a disfrutar.

A Capes pela bolsa de doutorado e pela oportunidade de fazer doutorado sanduíche em Israel.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e contribuíram em este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 – Processos da carcinogênese 1

1.2 – Câncer de pele 2

1.3 – Resposta celular a radiações não ionizantes 6

1.4 – Radiação UVB e dano ao DNA 8

1.5 – Galectina-3 10

1.5.1 Estrutura de galectina-3 10

1.5.2 Localização e implicações de galectina-3 na carcinogênese 12

1.6 Proteinas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) 18

2. OBJETIVO GERAL 23

2.1 -OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

3. MATERIAL E MÉTODOS 25

3.1 –Cultivo de Células 25

3.2 –Irradiação com UVB 25

3.3 –Ensaio de Ciclo e Morte Celular 26

3.4 –Extração de proteínas 26

3.5 – Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Western blot 27

3.6 –Imunofluorescência 28

3.7 –Detecção de galectina-3 extracelular 28

3.8 –Ensaio em *transwell* com meio condicionado 29

3.9 Ensaio clonogênico 29

3.10 –Ensaio de proliferação 30

3.11–Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células da epiderme expostas a UVB 31

3.12 –Imunoprecipitação 32

3.13 Avaliação do conteúdo de vacúolos acídicos 33

3.14 Avaliação da massa mitocondrial e do conteúdo lisosomal 33

3.15 Microscopia eletrônica de transmissão 34

3.16 Ensaios com LY290042 34

3.17 Inibição de JNK 35

3.18 Extração de DNA e determinação do numero de copias de DNA mitocondrial por PCR quantitativa em tempo real 36

3.19 Ensaios de siRNA 37

3.20 Isolamento mitocondrial para extração de proteínas 38

3.21 Análises estatísticas 38

CAPÍTULO 1 39

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

4.1 – A exposição à luz UVB mostrou indução de morte celular 40

4.2 – Avaliação da expressão de galectina-3 através de *western blot* 41

4.3 – Detecção de Gal-3 extracelular no sobrenadante da linhagem melan-a após irradiação e análise do efeito de Gal-3 no meio extracelular 42

4.4 – Análise do efeito de galectina-3 exógena através do ensaio clonogênico 46

4.5 – Caracterização da localização subcelular de galectina-3 em Melan-a 48

4.6 – Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após a exposição à luz UVB 55

4.7 – Detecção e quantificação de vacúolos acídicos após exposição à luz UVB e estudo de proteínas associadas à autofagia 61

4.8 – A detecção e quantificação do conteúdo lissosomal mostrou maior atividade de degradação na linhagem Tm1 64

4.9 – Avaliação do efeito do inibidor LY290042 no ciclo celular e no processo autofágico da linhagem Tm1 66

4.10 – Avaliação da massa mitocondrial e determinação do número de cópias de mtDNA 69

4.11 – O estudo da ativação de vias de sinal ativadas pelo estresse demonstrou a ativação de JNK em Tm1 75

4.12 – A análise da distribuição de JNK foi diferente entre Tm1 e melan-a após irradiação 77

4.13 – A análise da distribuição de JNK foi diferente entre Tm1 e melan-a após irradiação 82

4.14 – A inibição de galectina-3 em melan-a induziu morte celular após exposição à luz UVB 87

4.15 – A inibição de galectina-3 não modificou os níveis de produção de superóxido em melan-a 90

5. SUMÁRIOS DOS RESULTADOS 91

6. CONCLUSÕES 93

CAPÍTULO 2 94

2. OBJETIVO GERAL 95

2.1 -OBJETIVOS ESPECÍFICOS 95

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 96

3.1 - A avaliação da ativação de MAPKs após diferentes doses de UVB mostrou que essas vias são responsivas ao estímulo induzido pela luz UVB 96

3.2 - Caracterização da expressão de galectina-3 das linhagens em estudo 100

3.3 – O ensaio de coimunoprecipitação evidenciou a interação entre galectina-3 e ERK 105

3.4 – O fracionamento mitocondrial mostrou a presença de ERK na mitocôndria 107

3.5 – O ensaio de siRNA contra galectina-3 mostrou regulação da via de ERK 109

3.6 – A análise de crescimento celular em células silenciadas para galectina-3 revelou uma alteração no perfil de crescimento 113

3.7 – As moléculas de ERK modificaram sua localização após UVB em células LOX silenciadas para galectina-3 116

3.8 – Análises de proliferação e imunofluorescência na linhagem SK-MEL-37 mostraram um perfil de resposta parecido ao observado em células LOX 116

4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS 125

5. CONCLUSÕES 126

6. CONCLUSÃO GERAL 127

COMITÊ DE ÉTICA 128

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA 129

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variânçia

APS: Perssulfato de amônio

CDR: domínio de reconhecimento a carboidratos

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DHR: dihidrorodamina 123

ERK: extracellular signal –regulated kinase

GAL-3: galectina-3

INCA: Instituto Nacional do Câncer

JNK: c-Jun N terminal kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MMPs: Matriz Metaloproteinases

mtDNA: DNA mitocondrial

O_2^-: superóxido

PBS: Tampão fosfato salina

ROS: Reactive Oxigen Species

SAPK: stress-activated protein kinase

SDS: dodecil sódio sulfato

siRNA: small interfering RNA

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

UVB: ultraviolet B light

Resumo

Bustos SO. *Resposta celular associada à expressão de galectina-3 em linhagens de melanoma expostas a irradiação* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2014.

O câncer de pele é um dos mais frequentes entre humanos, sendo o melanoma o tipo menos comum, mas com grande importância devido à agressividade que ele apresenta. Um dos principais agentes etiológicos deste tipo de tumor é a radiação ultravioleta proveniente da luz solar. A fração de radiação ultravioleta B (UVB) gera dano no DNA e induz alterações nas células da pele após a exposição prolongada e sem proteção. A resposta à luz UVB em melanócitos e melanomas é diferente, mostrando a importância do perfil celular. O efeito genotóxico da luz UVB pode alterar a expressão de moléculas como galectina-3 e MAPKs, desencadeando respostas UVB-dependentes. Galectina-3 é uma lectina que reconhece beta-galactosídeos e está envolvida na regulação de diversos processos celulares que modificam a viabilidade celular e a proliferação. Esta molécula é ubiquamente expressa apresentando um comportamento específico dependendo da sua localização subcelular. No presente trabalho mostramos que a distribuição de galectina-3 em melanoma e melanócitos é ampla, encontrando-se tanto no núcleo como no citoplasma, podendo ser modificada após irradiação UVB ou ainda secretada para o meio extracelular. Além disso, observamos que a luz UVB ativa a via de MAPKs, proteínas quinases ativadas por mitógenos envolvidas no crescimento, sobrevivência, diferenciação e resposta a estresse, em melanócitos e em melanomas poucos minutos após a exposição à UVB. Uma maior atividade de p38 e de ERK é evidenciada em melanomas, enquanto que em melanócitos a via de p38 é a mais ativa, corroborando a noção de que a resposta celular à luz UVB difere entre melanócitos e melanoma. As moléculas p38 e JNK são proteínas quinases ativada pelo estresse (SAPK). A via de JNK não é tão responsiva em alguns melanomas, mas ativação desta molécula parece estar envolvida com a sobrevivência celular e a translocação mitocondrial após UVB. Em adição, a inibição de JNK leva ao aumento de morte celular em linhagens melanocíticas irradiadas e não irradiadas, e em melanoma induz morte e aumenta autofagia após irradiação. Esta molécula parece interagir com galectina-3 em modelos murinos, mas não em melanomas humanos, enquanto que ERK interage fisicamente com galectina-3 em melanócitos e melanomas humanos, independente de UVB. Através do silenciamento de galectina-3 pela técnica de RNA de interferência, mostramos o aumento da ativação da via de ERK após irradiação e de proteínas *downstream* de ERK, promovendo a proliferação celular em melanomas nessas condições. Em melanócitos parece existir uma regulação negativa da via de ERK por galectina-3 acompanhada de uma diminuição da viabilidade celular após o silenciamento dessa lectina, independente de UVB. Estes resultados mostram que galectina-3 é uma importante reguladora de eventos associados com sobrevivência e morte celular em melanoma. Por outro lado, em melanomas a ausência de galectina-3 induz aumento da proliferação associada à ativação de ERK, evidenciando a importância do tipo celular na ação de galectina-3.

Descritores: Galectina-3; Melanoma; Raios ultravioleta/efeitos adversos; Sobrevivência; MAP quinases reguladas por sinal extracelular; Mitocondrias; Dano ao DNA/efeitos de radiação; Autofagia/efeitos de radiação; Proteínas quinases JNK ativadas por mitógeno/efeitos de radiação.

ABSTRACT

Bustos SO. *Cellular response associated to galectin-3 expression in exposed irradiation melanoma cells* [thesis]. São Paulo: “Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina”; 2014.

Skin cancer is the most common cancer among humans, melanoma being the least common type but very important due to its aggressive behavior. A major etiologic agent of this type of tumor is ultraviolet radiation from the sunlight. The ultraviolet B rays (UVB) cause DNA damage and induce alterations over the skin cells after prolonged exposition without protection. The UVB response in melanocytes and melanoma cells is different. This shows the importance of the cellular profile. The genotoxic effect of UVB light can alter the expression of molecules such as galectine-3 and MAPKs and also triggers multiple responses UVB-dependent. Galectin-3 is a lectin that recognizes beta-galactosides. It is involved in the regulation of many cellular processes that modify cellular viability and proliferation and presents specific behavior depending on its subcellular localization. In the present study we showed that galectine-3 distribution in melanoma cells and melanocytes is large, lying both in the nucleus and in the cytoplasm. After UVB irradiation this distribution could be modified or even galactine-3 secreted itself into the extracellular space. Moreover, we observed that UVB light activates the mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK) involved in growth, survival, differentiation and stress-response in melanocytes and in melanoma cells just a few minutes after exposure. An increased activity of p38 and ERK was observed in melanomas, while in melanocytes just p38 pathway was highly active, supporting the notion that the cellular response to UVB light differs between melanocytes and melanoma cells. The molecules p38 and JNK are stress-activated protein kinases (SAPK). The JNK pathway is not responsive in some melanoma cells, but the activation of this molecule appears to be involved in cell survival and mitochondrial translocation after being exposed to UVB. Inhibition of JNK leads to increased cell death in irradiated and non-irradiated melanocytic lineage, but in melanoma cells induces cell death and increased autophagy only after irradiation. This molecule seems to interact with galectin-3 in mouse models but not in human melanomas, whereas ERK physically interacts with galectin-3 in human melanocytes and melanoma cells, regardless of UVB exposure. Through the knockdown of galectin-3 by siRNA, we showed increased activation of the ERK and its downstream pathway after irradiation, thus inducing cell proliferation. In melanocytes seems to be a negative regulation of the ERK pathway by galectin-3 accompanied by a decrease in cell viability after its knockdown regardless of UVB exposure. These results show that galectin-3 is an important regulatory molecule of events associated with cell death and survival in melanoma, which has different behavior depending on the cell type.

Descriptors: Galectin-3; Melanoma; Ultraviolet rays/adverse effects; Survival; Extracellular signal-regulated MAP kinases; Mitochondria; DNA damage/radiation effects; Autophagy/radiation effects; JNK mitogen-activated protein kinases/radiationeffects.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processos da carcinogênese

O câncer é uma doença complexa caracterizada pela transformação progressiva de uma célula normal, que acumula alterações genéticas e pode aumentar a capacidade proliferativa e evadir o processo de morte celular. No desenvolvimento tumoral, a presença de alterações genômicas podem inativar genes supressores de tumor e/ou ativar proto-oncogenes. Outro processo importante no desenvolvimento do câncer é a perda de atividade de genes envolvidos no controle da estabilidade genética (por exemplo, genes de reparo). Em conjunto, estes eventos perturbam a fisiologia e a homeostase celular (ruptura do equilíbrio entre proliferação e morte), induzindo à desregulação dos processos celulares, que culmina com a quebra da homeostase tecidual. Portanto, uma célula transformada pode adquirir características como evasão da apoptose, insensibilidade a sinais de bloqueio de proliferação e da resposta imune, potencial de replicação ilimitado, auto-suficiência a fatores de crescimento, reprogramação do metabolismo energético, angiogênese sustentada e capacidade de invadir tecidos e gerar metástases (Hanahan & Weinberg, 2000). A instabilidade genética e a inflamação também podem contribuir em vários estágios do processo de transformação celular (Hanahan & Weinberg, 2011; Kamp *et al,* 2011). Em adultos, este processo pode levar décadas e pode ser acelerado pela exposição a fatores ambientais que causem lesões no genoma de células progenitoras nos diferentes tecidos (Lodish & Darnell, 2002). Entre os fatores ambientais mais comumente relacionados ao desenvolvimento do câncer,

encontram-se as radiações ultravioletas relacionadas ao desenvolvimento dos tumores na pele, dentre eles, o melanoma.

1.2 Câncer de pele

O câncer de pele é um dos tumores mais frequentes na população brasileira. Existem três tipos principais de tumores de pele: carcinoma de células basais (BCC), carcinoma de células escamosas (SCC) e o melanoma cutâneo maligno (CMM). Aproximadamente 4 % dos tumores de pele são do tipo melanoma (Clarheout *et al,* 2006). Apesar de sua baixa incidência, este tumor apresenta grande importância clínica, visto que pode ser altamente agressivo quando diagnosticado em estágios avançados.

O melanoma é o tipo de neoplasia maligna originada nos melanócitos. Os melanócitos são células residentes na camada basal da pele, na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e em leptomeninges (Uang & Zon*,* 2010). Quando identificado em estágios iniciais este tumor pode ser tratável, porém, quando diagnosticado tardiamente, o melanoma tende a apresentar características mais agressivas, podendo originar metástases e apresentar quimioresistência. Em relação à sua epidemiologia, melanomas são mais frequentes em indivíduos caucasianos do que em indivíduos da raça negra. Nestes casos, geralmente está associado a uma maior exposição à luz solar provavelmente, devido a maior sensibilidade deste fototipo de pele à exposição à luz solar (raios ultravioleta A e B, UVA e UVB, respectivamente) (Bonni *et al*, 2002; Rager *et al*, 2005). De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), a estimativa de novos casos de melanoma no Brasil para o ano 2012 foi de

6.230 indivíduos afetados, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres (INCA, 2012).

Clinicamente, os melanomas podem ser classificados de acordo com Clark, Elder & Guerry (Clark *et al,* 1984). Estes autores propuseram um modelo que inclui as mudanças histológicas que acompanham a transformação de melanócitos em melanoma. Segundo este modelo, a progressão do melanoma pode ser dividida em: nevos comuns, nevos atípicos ou displásicos, melanoma de crescimento radial (*radial growth phase*, RGP), melanoma de crescimento vertical (*vertical growth phase*, VGP) e melanoma metastático (Figura 1). Neste modelo, as lesões névicas seriam consideradas lesões não tumorais, marcadoras de exposição no caso dos nevos comuns e eventualmente lesões pré-neoplásicas, no caso dos nevos atípicos.

1- **Nevos comuns:** representam lesões melanocíticas iniciais originadas a partir da proliferação de melanócitos. Estes nevos são locais e apresentam aumento de melanócitos e hiperpigmentação.
2- **Nevos atípicos:** caracterizados por um crescimento aberrante e podem ocorrer a partir de lesões névicas pré-existentes ou de uma nova lesão. Estas lesões são assimétricas, apresentam bordas irregulares, aumento de diâmetro e de cor.
3- **Melanoma de crescimento radial:** células neoplásicas na epiderme e na derme, mas com proliferação ativa apenas na epiderme.
4- **Melanoma de crescimento vertical**: com capacidade proliferativa em camadas distintas das camadas de origem, podendo proliferar na derme ou no tecido subcutâneo.

5- **Melanoma metastático**: pode atingir vasos sanguíneos e linfáticos, através dos quais pode disseminar para outros órgãos, prolifera-se e estabelece-se como foco metastático.

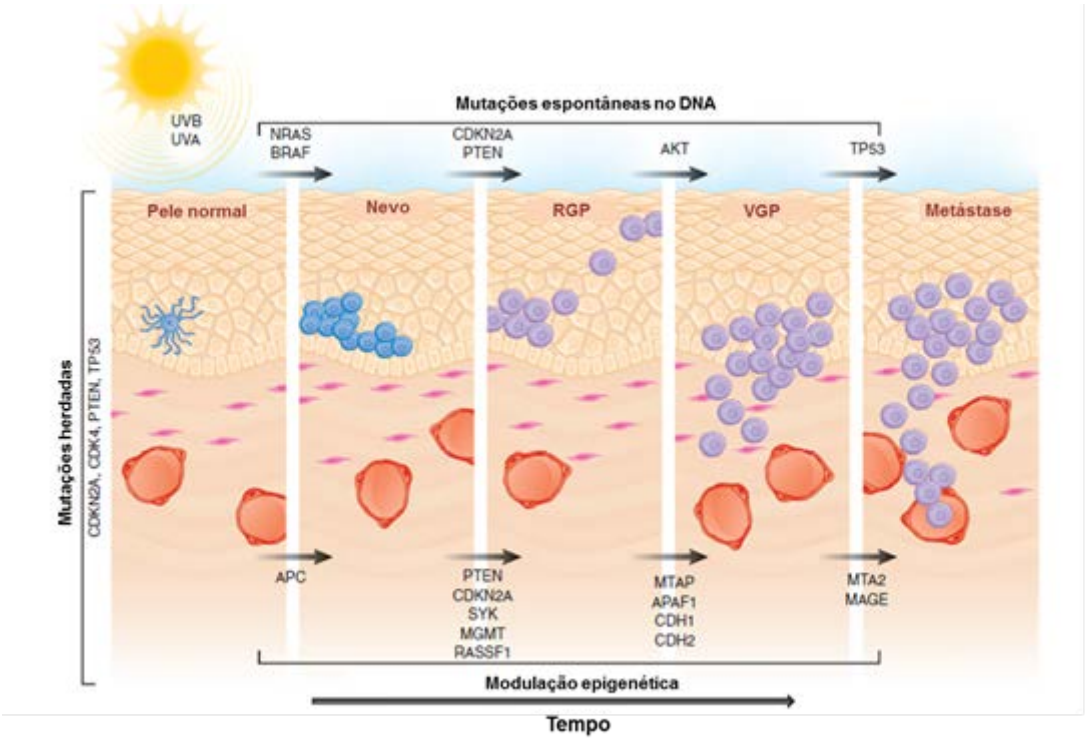


Figura 1: Fases de iniciação e progressão de melanomas. Proliferação aberrante dos melanócitos normais em resposta à radiação UV que, por exemplo, resulta na formação do nevo benigno ou atípico. RGP tem a capacidade de crescer intraepidermalmente, podendo invadir a derme no VGP e culminar com metástase. Apenas a metade dos melanomas é originária de nevos e a progressão pode ocorrer sem passar por todos os estágios. Na Figura apresentam-se algumas mutações que têm sido envolvidas nos diferentes estágios da progressão do melanoma, além disso, eventos epigenéticos possuem um papel importante na iniciação e progressão de melanoma. Adaptado de Zaidi *et al*, 2008.

Como observado para outros tipos tumorais, o melanoma apresenta diferentes fatores de predisposição, tanto genéticos como ambientais (Elwood & Jopson, 1997; Whiteman & Gree, 1999). Os principais fatores de risco são:

familiares com histórico clínico associado a melanomas, presença de nevos e histórico prévio de câncer de pele, presença de doenças como xerodermia pigmentoso e exposição excessiva ao sol (Haluska & Fedi, 1998).

Estes dados evidenciam o claro envolvimento da luz ultravioleta com o desenvolvimento de câncer de pele. Assim, quando a luz UV atinge a superfície da pele ocorre uma reação imediata caracterizada pela foto-oxidação da melanina pré-formada. Esta reação é seguida por outra reação mais tardia que envolve um aumento do número de melanócitos ativos para potencializar a produção de melanossomos (grânulos de melanina). Ácidos nucléicos são importantes alvos da radiação UV, onde mutações no genoma das células afetadas podem gerar instabilidade genômica nos melanócitos. Durante exposições crônicas à luz UV, os queratinócitos e/ou melanócitos podem sofrer mutações ativadoras das vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular sendo um fator inicial ao aparecimento de câncer de pele (Berger *et al*, 2012).

Já foram descritas diversas vias de sinalização relacionadas com o desenvolvimento do melanoma. Entre estas vias, uma bem estabelecida é a via Ras/Raf/MAP-quinase (MAPK), onde estudos demonstraram que a indução da ativação desta via em melanócitos imortalizados é suficiente para induzir tumorigênese (Govindarajan, 2003). Além disso, alterações em moléculas pertencentes a outras cascatas de sinalização podem promover, direta ou indiretamente, a geração do fenótipo tumoral (Albino *et al,* 1989; Talve *et al,* 1997). Outro processo que pode favorecer a formação do melanoma e sua progressão é o efeito da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS apresentam potencial mutagênico e a instabilidade genética observada

nas células tumorais pode ser ocasionada devido à adaptação destas células a uma produção contínua, mas subletal de espécies reativas de oxigênio. Govindarajan e colaboradores (2003) demonstraram que o estresse oxidativo é capaz de induzir a hipermetilação do gene supressor de tumor *CDKN2A*, que codifica $p16^{Ink4a}$ e induz a ativação da via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), pertencente da via Ras/Raf/MAP-quinase. É conhecido que os melanócitos residentes na camada basal da epiderme se encontram em um microambiente relativamente hipóxico. A luz UV, um dos principais agentes etiológicos de melanoma, gera dano no DNA destas células podendo aumentar a proliferação celular e, portanto, a demanda de oxigênio. Este evento, acompanhado com o aumento da síntese de melanina induzida por UV, pode elevar a produção de ROS e ativar vias de sinalização que contribuem com o desenvolvimento de melanoma (Wittgen *et al*, 2007). Portanto, estes dados mostram a importância da investigação de ROS nas vias de proliferação celular do melanoma relacionadas com UV.

1.3 Respostas celulares às radiações não ionizantes

Dependendo da quantidade de energia, uma radiação pode ser descrita como ionizante ou não ionizante. Esta última possui relativamente baixa energia, e nela, encontramos a radiação ultravioleta, (UVR), que é dividida em três espectros: UVC (220-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC e grande parte da radiação UVB são bloqueadas pela camada de ozônio, e apenas o espectro completo de UVA e uma fração de UVB (~5%) atingem a superfície terrestre. Porém, a depleção da camada de ozônio tem operado como um fator agravante no aumento da radiação solar UVB que

chega à superfície terrestre (Besaratinia *et al,* 2007; Cortat *et al*, 2013). Portanto, se assume no momento, que ao contrário da luz UVA e UVB, a luz UVC não apresenta importância na carcinogênese cutânea induzida pelo sol, pois é completamente absorvida pelo oxigênio atmosférico.

Nas células, os processos fotobiológicos são dependentes do comprimento de onda da luz ultravioleta, sendo possível observar diferenças entre a ação da luz UVB e UVA na habilidade de induzir danos no DNA, ativar vias de sinal e o sistema imune, por exemplo, (Gilchrest, 2013, para revisão). O dano no DNA induzido por UVB são associados com a geração direta de fotoprodutos, enquanto que a UVA atua indiretamente através do dano oxidativo das bases do DNA. Apesar da baixa incidência de luz UVB, este tipo de irradiação é capaz de atuar como um potente carcinógeno e pode estar envolvida nos processos de carcinogênese da maioria das neoplasias humanas associadas à radiação UV, como por exemplo, o melanoma (Fabo *et al,* 2004). O grupo de Fabo e colaboradores (2004) demonstraram que a irradiação com doses fisiologicamente relevantes de UVA não é efetiva na indução do melanoma e que a luz UVB esta associada na melanomagênese. Embora nos últimos anos diversos estudos suportem a ideia da luz UVB como a radiação mais importante na iniciação de melanoma, novos estudos questionam o papel da irradiação UVA. Recentemente, o mesmo grupo demonstrou que a luz UVA também esta envolvida na indução de melanoma, sendo dependente da presença de melanina. Porém, os autores reportaram que a luz UVB foi mais efetiva e rápida na indução do melanoma, sendo este processo, independente da presença de melanina e associada ao dano direto do DNA por parte da UVB (Noonan, 2012). Portanto, estes dados sugerem que tanto a luz UVA quanto a

luz UVB estão envolvidos na geração de melanoma, mas que a UVB opera de forma mais efetiva.

Nas células, encontramos diferentes moléculas capazes de absorver a UV, entre elas aminoácidos, DNA e melanina. A melanina e aminoácidos como o triptofano podem absorver grandes quantidades de UVB antes que a radiação atinja as moléculas de DNA e produzam danos no mesmo (Meyskens *et al,* 2001). Em geral, os níveis aumentados de ROS em melanomas são causados principalmente pela exposição à radiação UVA, com a consequente biossínteses de melanina. Ao mesmo tempo, a própria biossíntese de melanina leva a produção de ROS resultando na ativação de ciclos de retroalimentação (Jenkins & Grossman, 2013).

Nos últimos anos, a incidência de câncer de pele, principalmente do melanoma, tem aumentado em grande parte devido a uma mudança comportamental dos indivíduos, no qual é observada uma maior exposição aos raios solares seguido de uma menor proteção aos mesmos. Baseados nestas observações, e em evidencias que demonstram o papel de UVB na iniciação do melanoma através do dano direto no DNA, novos estudos que acrescentem um maior conhecimento sobre a resposta celular induzida por UVB em melanócitos/melanoma torna-se de grande importância.

1.4 Radiação UVB e dano ao DNA

A luz UVB pode induzir diretamente lesões pró-mutagênicas ao DNA, as quais são classificadas como dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (Cadet, 2012). Além disso, a luz UVB pode levar indiretamente a quebras na dupla fita de DNA (DSBs), formadas

como consequência na tentativa de reparar o dano induzido no DNA pela radiação. Em adição, a luz UVB também pode induzir, em pequena medida, dano oxidativo (Miura *et al*, 2007; Song *et al*, 2009). Em conjunto, todos estes danos podem atuar como indutores de apoptose (Kinner & Wu 2008, Batista *et al* 2009*,* Pustisek *et al,* 2011). A formação de fotoprodutos pode modificar de maneira importante a estrutura da fita de DNA, podendo induzir apoptose para eliminar a célula com este dano no DNA. No entanto, antes de induzir morte celular a célula ativa a maquinaria de reparo do DNA na tentativa de reparar o dano. Alternativamente, se essas lesões genéticas não são reparadas por estes mecanismos de reparo, são originadas mutações que podem afetar as funções fisiológicas da célula (Iyama *et al*, 2013).

Como citado anteriormente, as espécies reativas de oxigênio são naturalmente geradas como um resultado do metabolismo do oxigênio celular, desempenhando importantes funções nas vias de transdução de sinal e na regulação gênica. Contudo, quando as células sofrem algum tipo de estresse ambiental, como exposição à luz UV, os níveis de ROS podem aumentar excessivamente, podendo induzir danos às estruturas celulares. (Ziech *et al*, 2011). Um sensor importante da sinalização redox e do mantimento do metabolismo celular é a autofagia. O processo autofágico serve para prevenir o acúmulo dessas proteínas e organelas danificadas pelo estresse permitindo a renovação de estruturas e proteínas. (Lee *et al*, 2012). A autofagia pode atuar como um mecanismo adaptativo de sobrevivência celular, mas ao mesmo tempo pode induzir morte celular. Assim como ROS, o estresse e o dano gerado pela UVB pode desencadear uma resposta autofágica (Strozky & Kulms, 2013). Outra ferramenta importante para contrabalancear o efeito

deletério de ROS, são as enzimas antioxidantes distribuídas em vários compartimentos subcelulares (Fuchs-Tarlovsky, 2013), incluindo as mitocôndrias (Kowaltoski *et al,* 2009, Cardoso *et al,* 2012).

A mitocôndria desempenha um importante papel na indução de estresse oxidativo, pois além de ser uma fonte importante de ROS, é um dos primeiros alvos de atuação destas espécies reativas (Figueira *et al*, 2013). Nesta organela ocorre a fosforilação oxidativa, processo no qual reações de óxido-redução em cadeia levam à produção de adenosina trifosfatada (ATP). O oxigênio é o aceptor final dos elétrons nesta cadeia; normalmente o O_2 é reduzido levando à produção de água, mas em algumas ocasiões é reduzido de forma incompleta, gerando um radical superóxido (O_2^-). A partir da transferência de um segundo elétron ao O_2^- é produzido o peróxido de hidrogênio, um potente oxidante citotóxico capaz de receber um terceiro elétron proveniente de íons metálicos para formar radicais hidroxilas (OH^-). Este último pode induzir a formação de produtos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos.

Sabe-se que os níveis de danos oxidativos e a presença de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) são maiores quando comparados ao danos no DNA nuclear. Essa diferença observada, provavelmente deve-se ao fato da proximidade do mtDNA com a membrana interna da mitocôndria, local onde ocorre a formação dos radicais livres (Costa *et al*, 2011). Além disso, a mitocôndria não possui mecanismos de reparo do DNA tão eficientes como os que atuam no DNA nuclear (Gasiev & Shaikhaev, 2008).

Como descrito previamente, sabe-se que a luz UVB é um potencial indutor de dano celular podendo gerar adutos de DNA, estresse celular, assim

como alterar a expressão de determinadas moléculas (Black *et al,* 2011; Huang *et al,* 2013). Pietro e colaboradores (2006) sugerem o envolvimento da luz UVB na ativação de galectina-3 e outro estudo demonstrou que a presença desta proteína em queratinócitos expostos a UVB induz a proteção contra a morte celular induzida por UVB (Saegusa *et al*, 2008).

1.5 Galectina-3

1.5.1 Estrutura da galectina-3

A galectina-3 (Gal-3) é uma proteína da família das galectinas, classificadas como lectinas com afinidade primária a β-galactosídeos. Os membros da família das galectinas compartilham um domínio com alto grau de similaridade, o qual possui a atividade de ligação a carboidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*) (Dumic *et al,* 2006). Até o momento, foram descritos 15 tipos de galectinas em mamíferos, sendo classificadas em três grupos distintos: protótipo, quimera e com repetições em *tandem* (Hirabayashi *et al*. 1993; Liu *et al.* 2005; Elola *et al.* 2007;). A Gal-3 possui uma massa molecular de 29 a 32 kDa e é caracterizada por ser a única galectina tipo quimera constituída por uma extremidade amino- terminal (ND), com 7-14 repetições de uma sequência similar ao colágeno, rico em glicina, tirosina e prolina. Esta região da molécula possui sítios de fosforilação e outros determinantes importantes para a secreção por uma via não-clássica ainda pouco conhecida (Cooper & Barondes, 1999; Keller *et al,* 2007; Van Stijn *et al,* 2009). O domínio CRD é constituído por 130 aminoácidos que formam uma estrutura globular com 5-6 folhas beta pregueadas. Na Gal-3 humana, este

domínio contém o motivo NWGR (Asp-Trp-Gly-Arg), homólogo ao domínio BH1 da família gênica Bcl-2. Existem indícios de que a Gal-3 possa interagir com elementos da família Bcl-2, exercendo um potencial papel anti-apoptótico quando translocada para a mitocôndria (Akahani *et al,* 1997; Liu *et al,*1996). A Gal-3 é expressa em diferentes tecidos, incluindo células do sistema imune, fibroblastos, neurônios e células epiteliais (Markowska *et al,* 2011) e esta envolvida em diferentes processos biológicos como apoptose, migração e adesão celular. Inicialmente, a Gal-3 foi caracterizada como uma molécula de adesão celular capaz de atuar na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, mas sabe-se que a Gal-3 desempenha diversas funções na célula e que estas funções são dependentes de sua localização. Dentre estas funções, a Gal-3 pode aumentar a fagocitose dos neutrófilos e intervir na sinalização celular. Para nosso conhecimento, existem muitos estudos demonstrando o papel da Gal-3 na carcinogêneses (Newlaczyl, 2011, para revisão).

1.5.2 Localização e implicações de galectina-3 na carcinogênese

Atualmente, existem diversos dados da literatura que demonstram o papel multifuncional de Gal-3 (Figura 2). Esta molécula é ubiquamente expressa e capaz de desempenhar funções intra e extracelulares. A distribuição de Gal-3 entre o núcleo e o citoplasma ou em outros locais depende do tipo celular e do estado proliferativo. A localização também pode ser regulada por diferentes processos como, por exemplo, a fosforilação (Larsen *et al*, 2011).

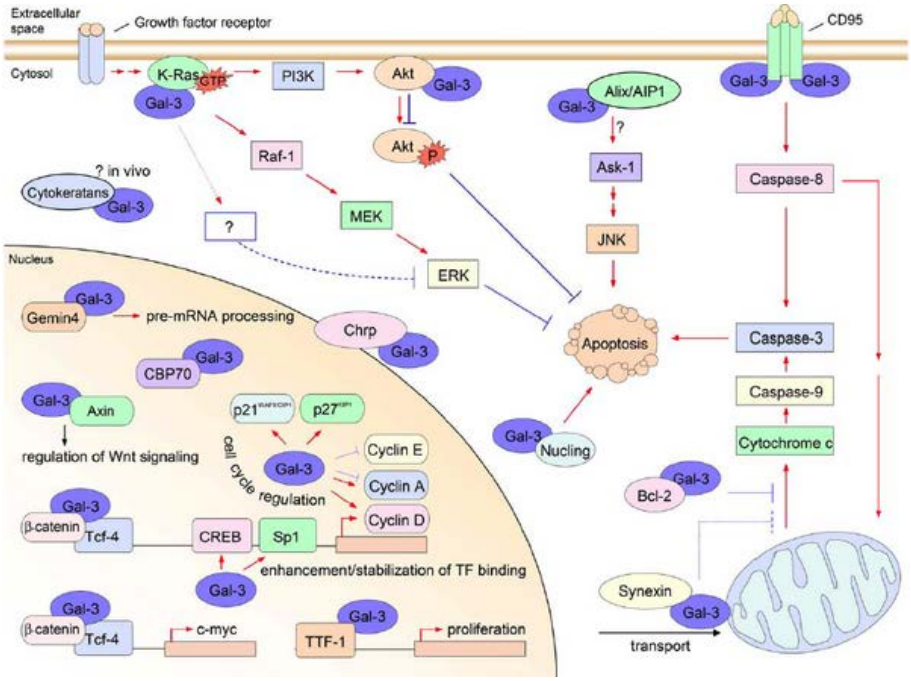


Figura 2 – **Função intracelular de galectina-3**. Setas vermelhas indicam efeitos positivos, setas azuis indicam efeitos negativos. No espaço extracelular há diversos receptores que interagem com Gal-3 e modulam a adesão, angionêse, por exemplo, (Dumic *et al*, 2006).

No citoplasma, a Gal-3 é capaz de manter a homeostase mitocondrial atuando como inibidor apoptótico e promotor tumoral (Matarrese *et al,* 2001). Yu e colaboradores (2002) demonstraram que a Gal-3 é recrutada pela sinexina (também denominada anexina VII, proteína de união a fosfolipídios e cálcio) para a mitocôndria, impedindo a liberação do *citocromo c* para o citoplasma e inibindo a via de ativação de morte iniciada pelas caspases através da interação com Bcl-2. Kim e colaboradores (2008) demonstraram que a ATP sintase mitocondrial interage com Gal-3 em células de câncer de cólon, diminuindo a produção de ATP nestas células. Enquanto o papel de Gal-3 intracelular parece estar associado à proteção ao estresse, mantendo a homeostase mitocondrial, a presença extracelular de galectina-3 induz a

produção de superóxido, podendo atuar como indutora de estresse oxidativo (Suzuki *et al,* 2008).

Gal-3 parece também estar relacionada com a degradação lisossomal. Recentemente, foi demonstrado que a Gal-3 apresenta colocalização com Lamp-1 após o tratamento com um agente indutor da ruptura (desestabilizador) da membrana lisossomal. Além disso, foi observado que LC3, uma proteína essencial no processo autofágico, colocaliza-se com a Gal-3 em condições de estresse oxidativo (Maejima *et al*, 2013). Outro estudo anterior reportou que c-Abl interage com Gal-3 e fosforila esta molécula, impedindo a degradação lisossomal e consequentemente, interferindo na resposta celular induzida por galectina-3 (Li *et al*, 2010).

No núcleo, no entanto, esta proteína parece desempenhar um papel pró-apoptótico ainda não muito bem estabelecido. A Gal-3 também participa de processos essenciais, como *splicing* de pré-mRNA e atua também na expressão gênica. Apesar das importantes funções que esta molécula parece exercer no núcleo, ainda não está bem esclarecido como é realizado seu transporte até esse compartimento celular (Dagher *et al*, 1995). Sabe-se, no entanto, que o sinal de localização nuclear reside no CRD (resíduos 253-256, correspondente a sequência IXLT) (Davidson *et al,* 2006) e existem evidências de que em alguns tipos celulares Gal-3 parece ser co-transportada com a β-catenina (Weinberg *et al,* 2007), sugerindo seu envolvimento com a via Wnt no controle da compartimentalização nuclear de galectina-3. Outra função de Gal-3 no núcleo é o envolvimento na metástase através da regulação de diferentes genes como AP-1. Através da interação com a AP-1, Gal-3 leva ao aumento de

MMP-1 e daí à proteólise de colágenos, permitindo a migração celular (Dye *et al,* 2013).

Gal-3 tem sido descrita como envolvida na inibição e na estimulação da proliferação celular. Song e colaboradores (2013) mostraram que a indução da expressão de Gal-3 em câncer de pâncreas contribui na progressão e no aumento da proliferação através da ativação da via Ras. Entretanto, outros estudos demonstraram que a Gal-3 também pode regular negativamente a proliferação celular. Em um trabalho utilizando linhagens de câncer de próstata com indução de expressão de Gal-3 foi observado que a presença desta molécula nestas células induziu uma diminuição da proliferação e crescimento celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Ellerhorst *et al,* 2002). Mais recentemente, Xue e colaboradores (2013) demonstraram que a Gal-3 induz apoptose em células Jurkat através de sua interação com *O*- e *N*-glicanos de CD45.

No meio extracelular, a Gal-3 liga-se a glicolipídios e glicoproteínas de superfície e da matriz extracelular, mediando adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Dumic *et al*, 2006, para revisão). Ainda no espaço extracelular, promove a ligação cruzada dos glicoconjugados presentes na superfície celular provocando a ativação de vias de sinais associadas à proliferação e a apoptose (Newlaczyl, 2011, para revisão). Em melanoma, Gal-3 demonstra a participação em processos de invasão e metástase, (Braeuer *et al* 2011, Reticker-Flynn *et al*, 2013). Atualmente, estudos têm demonstrado o envolvimento da Gal-3 como estimuladora da formação de túbulos capilares *in vitro*, assim como sua participação no processo de angiogênese *in vivo* (Nanjia-Makker *et al,* 2000). Recentemente, D'Haene e colaboradores (2013) demonstraram que a Gal-3 e a Gal-1 induzem angiogênese via ativação de

VEGFR1 (Receptor do fator de crescimento endotelial vascular tipo 1). Outro trabalho demonstrou que Gal-3 une o receptor do VEGF na membrana plasmática e estimula a atividade pró-angiogênica modulando a transdução de sinal do VEGFR (Markowska *et al*, 2010, 2011).

Gal-3 pode sofrer também modificações pós-traducionais que podem influenciar o padrão de expressão gênica de genes específicos, como o gene codificador da proteína mitótica ciclina D1 (*CCND1*) e modular o potencial tumorigênico nessas células (Mazurek *et al*, 2005). Além deste mecanismo, Gal-3 também ativa diferentes componentes de vias moleculares podendo regular a sinalização intracelular. Dentre as moléculas reguladas por Gal-3, encontramos a K-Ras. A Gal-3 atua como um *scaffold* intracelular de K-Ras ligada a GTP na membrana plasmática, possibilitando o aumento da ativação da via Ras e contribuindo na malignidade do carcinoma de tiróide (Levy *et al*, 2010).

A literatura é controversa quanto à expressão de Gal-3 em neoplasias. Em carcinomas de células escamosas foram observados níveis de expressão diminuídos de Gal-3, enquanto que, em melanomas esses níveis, apresentaram aumento de expressão ao longo de sua progressão (Prieto *et al,* 2006).

A localização celular da Gal-3 parece estar relacionada com a progressão do melanoma. Um estudo de Prieto e colaboradores (2006) mostrou que os melanócitos acumulam Gal-3 ao longo de sua progressão. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que melanomas originários de lesões com um padrão de exposição intermitente ao sol apresentavam uma expressão intensa de Gal-3 no citoplasma enquanto que a expressão no núcleo era

associada a melanomas originários da exposição crônica e continua ao sol. Essas observações sugerem o envolvimento da luz UV na ativação de Gal-3 e na translocação desta molécula para o núcleo nos casos de exposição crônica ao sol. Em outro trabalho, foi observado um aumento da expressão de Gal-3 em melanomas finos comparado à nevos benignos. No entanto, melanomas espessos apresentam menor expressão de Gal-3 quando comparados à melanomas finos (classificados segundo o índice de Clark e Breslow). Nestes mesmos estudos, altos níveis de expressão de Gal-3 foram associados com uma maior sobrevivência (Brown *et al,* 2012). Em contraste com esses dados, o silenciamento de galectina-3 em células de melanoma resultou na diminuição do potencial tumorigênico dessas células (Mourad-Zeidan, 2008). Estes dados suportam a ideia de que a Gal-3 desempenha diferentes papéis na progressão do melanoma. Contudo, baseados nestes estudos, existe um consenso no qual a Gal-3 deva apresentar um papel regulatório na progressão e metástase em melanomas.

Como já citado anteriormente, a Gal-3 desempenha diversas funções e interage com várias moléculas podendo atuar como um regulador na progressão tumoral intervindo nas cascatas de sinalização de diferentes vias. Neste contexto, dados da literatura sugerem que exista uma possível relação entre Gal-3 e algumas destas quinases. Portanto, torna-se evidente a importância de estudos adicionais que visem o melhor entendimento do papel desta molécula em melanoma, com o objetivo de investigar quais os mecanismos desempenhados por Gal-3 nas vias de proliferação associadas a este tipo de tumor.

1.6 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

As vias de transdução de sinal MAPKs (Proteínas quinases ativadas por mitógenos) são vias ubíquas e evolutivamente conservadas, que integram respostas à estímulos extracelulares, como citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse ambiental, por exemplo (Plotnikov *et al*, 2011). As MAPKs regulam processos celulares fundamentais, como resposta a estresse, motilidade, diferenciação, resposta imune, crescimento, proliferação, sobrevivência e apoptose celular. Uma característica desta via é a ação de três quinases centrais (MAP3K, MAPKK e MAPK), que propagam o sinal através da fosforilação sequencial de quinases, no qual MAP3K fosforila e ativa MAPKK que pode ativar a MAPK terminal. Ao mesmo tempo, a sinalização pode levar a fosforilação de proteínas reguladoras, alvos de MAPK (Yang *et al*, 2013 para revisão).

Existem quatro principais cascatas de MAPK: quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2); jun quinase (JNK); p38 e ERK5, esta última, menos estudada (Figura 3). Geralmente, ERK é ativado por mitógenos enquanto JNK e p38 são ativadas por sinais de estresse extracelular. JNK foi inicialmente identificada como uma mediadora de estresse, portanto é conhecida como SAPK (proteína quinase ativada por estresse). P38 é outra SAPK que se interliga com JNK e compartilha componentes da cascata induzida por estresse de JNK. Tanto SAPK como ERK podem ser ativadas por diferentes formas; ERK não é apenas uma molécula efetora em resposta a sinais mitogênicos podendo ser ativada por UV ou radiação eletromagnética (Chen & Bowden, 1999; Friedmann *et al*, 2007) e ao mesmo tempo, JNK pode ser ativada por

outros estímulos como, por exemplo, pró-inflamatórios ou fatores de crescimento (Kyriakis, 2012).

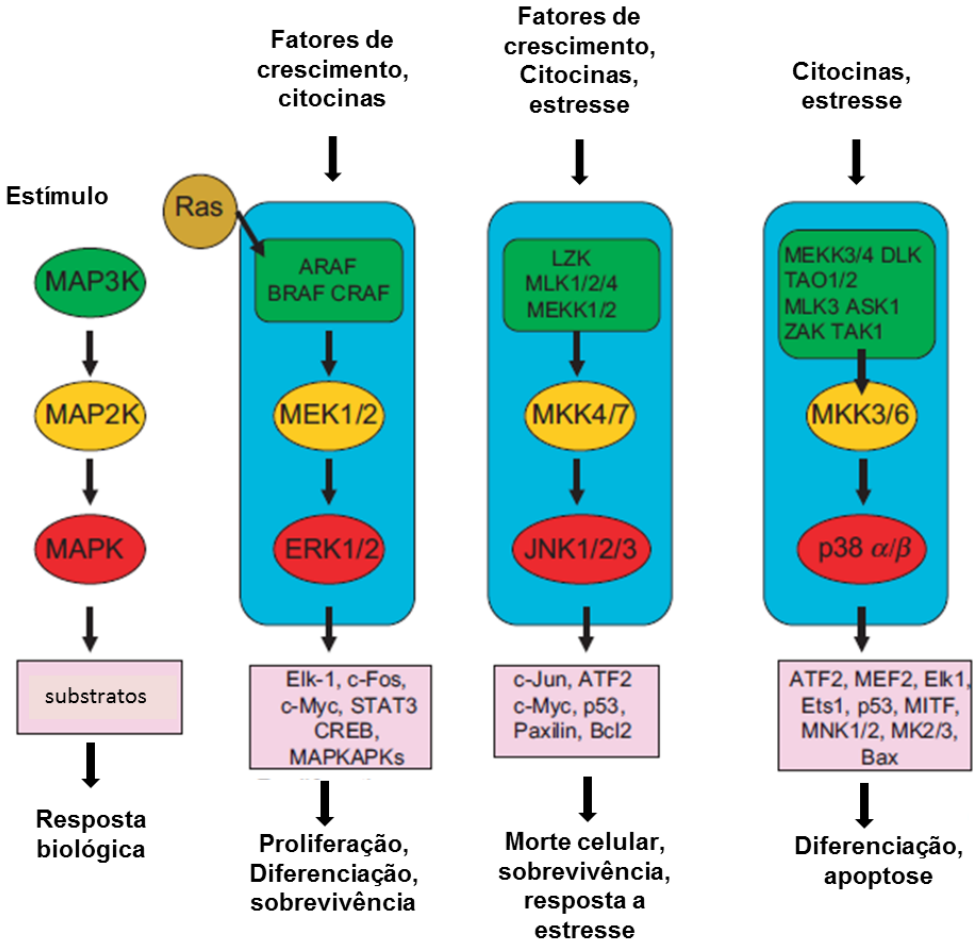


Figura 3 – Representação esquemática das cascatas clássicas de MAPK. Principais módulos de sinalização da via MAPK mostrando os estímulos que ativam cada via e a função associada. Modificado de Lopez-Bergami, 2011.

Como mencionado anteriormente, as MAPKs regulam diversos processos fisiológicos, sendo assim, a perda da regulação destas vias pode estar relacionada com doenças, como o câncer. Uma alta porcentagem de melanomas apresentam mutações em vários genes que codificam proteínas da

via Ras/Raf/MAPK. Dentre estas mutações, a mais frequente, aproximadamente 50%, é a mutação V600E do gene *BRAF* (Solus, 2013 para revisão). A ativação de ERK (que se encontra *downstream* a BRAF) foi também observada em tumores cujos componentes da cascata não se encontravam mutados, indicando que a cascata de ERK1/2 parece desempenhar um papel na carcinogênese induzida por oncogenes não relacionados diretamente com esta via (Plotnikov *et al*, 2011). Em adição, ERK parece desempenhar um importante papel em melanomas, encontrando-se ativo em 90% dos casos de melanoma (Oba, 2011). A localização de ERK parece ser crítica para o desempenho de sua função, pois foi mostrado que a inibição da translocação nuclear de ERK pode bloquear a progressão de alguns processos celulares (Plotnikov *et al,* 2011, para revisão).

A via de JNK quinase foi inicialmente descrita como envolvida na oncogênese através da observação na qual JNK participa da ativação do fator de transcrição AP-1. Esta via tem sido menos estudada em melanomas, porém, dados prévios da literatura têm demonstrado efeitos contraditórios de sua ação no desenvolvimento de melanoma. Em adição, outros resultados revelaram determinadas funções de JNK com um isotipo específico. Existem três genes que codificam a proteína JNK com doze isoformas derivadas de produtos de *splicing* alternativo (Zhang *et al,* 2002*).* Além disso, o papel de p38 em melanomas, que atua em conjunto com JNK, também é controverso, porém evidências experimentais suportam a ideia de que p38 atue como um supressor de tumor. As diferentes funções desempenhadas por estas proteínas podem ser resultado de suas meia-vidas nos diferentes tipos celulares. Assim, a ativação prolongada de JNK e p38 induzem apoptose, enquanto que a

ativação transitória leva à sobrevivência celular (Chuan *et al*, 2000). Além disso, estas três vias de sinalização estão interligadas existindo a possibilidade de balanço entre elas (Lopez-Bergami, 2011).

Ensaios utilizando camundongos *knockout* para galectina-3 (gal-3 -/-) revelaram uma diminuição nos níveis protéicos e de RNAm de JNK1, sugerindo uma possível regulação de JNK por parte de galectina-3 (Kim *et al,* 2003; Chen *et al*, 2006). Outra linha de evidência revelou que a Gal-3 interage com K-Ras desencadeando a ativação de Ras e, portanto, podendo interferir na ativação desta via (Elad-Sfadia *et al*, 2004). Em um estudo utilizando queratinócitos *knockout* para Gal-3 e irradiados com UVB, foi observado um aumento da ativação de JNK quando comparados com queratinócitos normais. Em adição, a inibição de Gal-3 aumentou a ativação da via ERK associada ao aumento no número de eventos apoptóticos. Neste mesmo estudo, a Gal-3 apresentou um papel anti-apoptótico através da inibição de ERK e da ativação de AKT (Saegusa *et al*, 2008).

Como apresentado anteriormente, evidencias da literatura sugerem que níveis aumentados de ROS podem contribuir com o desenvolvimento de melanoma. Ao mesmo tempo, alterações em moléculas de adesão na pele podem induzir aumento na proliferação dos melanócitos favorecendo o desenvolvimento do melanoma. Desta forma, o estudo do estresse celular e transformação maligna dos melanócitos, principalmente nos estágios iniciais são cruciais para compreensão dos mecanismos envolvidos na formação do melanoma.

Um trabalho anterior realizado por nosso grupo estabeleceu um modelo de progressão tumoral de melanoma murino associado ao estresse celular. Este modelo consiste de (1) uma linhagem imortalizada obtida a partir de melanócitos de camundongos C57BL/6 não tumorigênica, denominada melan-a (Ma), (Bennet *et al*, 1987) e (2) duas linhagens tumorais que representam o melanoma de crescimento vertical (Tm1, Tm5) e são tumorigênicas quando inoculadas em camundongos (Oba-Shinjo *et al,* 2006). As linhagens Tm1 e Tm5 foram obtidas a partir de melan-a através de ciclos sequenciais de impedimento de ancoragem. Ao longo da progressão, foram observadas alterações moleculares e morfológicas que levaram ao fenótipo maligno observado nas linhagens metastáticas. De forma interessante, Tm1 e Tm5 apresentam uma redução nos níveis de proteínas envolvidas na degradação de ROS (De Souza *et al*, 2006) encontrando-se num estado pró-oxidativo relacionado com alterações epigenéticas e com a ativação de vias de sobrevivência dependentes de ROS. Além disso, a linhagem Melan-a apresenta expressão da proteína Gal-3, que será objeto deste estudo. No entanto, a expressão da Gal-3 é perdida nas linhagens Tm1 e Tm5 ao longo da progressão através da metilação do promotor do gene *Lgals3* (Machado *et al*, 2014). Sendo assim, estas linhagens parecem ser um bom modelo para investigar o papel de ROS e de vias de sobrevivência celular em resposta a radiação UV durante a progressão do melanoma. Portanto, o modelo de progressão tumoral de melanoma murino citado anteriormente constitui um sistema apropriado para avaliar o papel de galectina-3 associado à resposta a UVB em melanoma, devido à perda da expressão deste gene ao longo da progressão tumoral.

2.OBJETIVOS

Avaliar o envolvimento de galectina-3 na resposta celular associada à exposição de células (melanócitos/melanomas) a luz UVB com o objetivo de investigar o seu papel na progressão do melanoma. Além disso, também será explorada sua possível implicação na modulação de espécies reativas de oxigênio e autofagia assim como sua associação com a via de sinalização de JNK.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Avaliar os níveis protéicos de Gal-3 frente ao agravo genotóxico induzido por UVB utilizando a metodologia de *western blot*.

2.1.2. Caracterizar a localização e o transporte intracelular de Gal-3 em linhagens submetidas à irradiação UVB através de imunofluorescência e microscopia eletrônica.

2.1.3 Analisar o efeito da adição de galectina-3 exógena na linhagem Melan-a e Tm1 expostas à UVB.

2.1.4. Investigar se a exposição à luz UVB e a presença de Gal-3 nas linhagens estaria correlacionada com o aumento/diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).

2.1.5. Avaliar o número de cópias de mtDNA após a exposição das linhagens a UVB, assim como avaliar o impacto da irradiação sobre a biogênese mitocondrial através da metodologia de qRT-PCR.

2.1.6 Verificar o efeito de inibidores autofágicos após a exposição das linhagens a UVB.

2.1.7. Avaliar a ativação das vias JNK e p38 dependentes na presença e ausência de Gal-3 em linhagens expostas à luz UVB e, ao mesmo tempo, analisar a possível associação entre Gal-3 e a via JNK.

2.1.9 Verificar o efeito da inibição de expressão (*knockdown*) de Gal-3 através de RNAi, influenciando os índices de morte celular, espécies reativas de oxigênio em linhagens expostas à luz UVB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo de células

Foram utilizadas as linhagens do modelo experimental citado acima, Melan-a e Tm1. Estas linhagens foram cultivadas em RPMI 1640 pH 7,2 (Sigma-Aldrich®) suplementando com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) e 200nM de PMA (phorbol 12-miristato 13-acetato). As linhagens humanas LOX, A2358 (melanoma BRAF V600E) e A1317 (BRAF selvagem) foram cultivadas com meio RPMI 1640 (Gibco®) pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®). A linhagem SK-MEL-37 (BRAF V600E) foi cultivada com meio MEM suplementado com 10% de SFB. Os melanócitos humanos obtidos de prepúcio de neonato foram cultivados com meio 245F (Invitrogen®) pH 7,2 suplementado com HMGS (Invitrogen®). Todas as culturas celulares foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2.

3.2 Irradiação com UVB

Previamente a irradiação, o meio de cultura foi removido e foi adicionada solução balanceada de Hanks (HBSS). No momento da irradiação, a lâmpada TL20W/12 emissora de UVB foi acionada dentro do fluxo laminar. Para verificar as doses aplicadas foi utilizado um sensor de luz UV. A energia emitida foi calculada pela fórmula J = r x t onde J (Joule), r (resultado do sensor) e t (tempo de exposição em segundos). Foi realizada uma curva dose-resposta e a partir dos resultados obtidos foi escolhida uma dose aproximada de luz UVB de 6,6 mJ/cm^2 a qual foi utilizada nos ensaios. No entanto, para o estudo de MAPK foram utilizadas diferentes doses, mencionadas nos resultados.

3.3 Ensaios de ciclo e morte celular

Cerca de $0,5x10^5$ células foram cultivadas em placas de 12 poços. O ensaio foi feito e as células foram tripsinizadas, fixadas em etanol 70% e mantidas à –20ºC até o momento da análise por citometria de fluxo (citômetro FACScalibur, Becton Dickson®). O processo de morte celular foi avaliado pela utilização de iodeto de propídeo (PI), que se incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA de uma população de células. A quantificação de morte celular foi realizada através da porcentagem de células com quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóides $=H_0$). Para avaliar as diferentes fases do ciclo G_0G_1 e SG_2M foram utilizados dados do mesmo ensaio com PI. A análise dos dados foi realizada pelo programa Cell Quest® PRO (Becton Dickson®).

3.4 Extração de proteínas

As células foram lavadas com PBS a 4°C ou *buffer* A (beta-glicerolfosfato 500mM, EGTA 15mM, Ortovanadato 1mM, EDTA 10mM e 1mM DTT) e soltas com tripsina ou com *cell scraper*, centrifugadas e resusspendidas em tampão RIPA (137mM NaCl, 20mM Tris pH 7,4, 10% Glicerol, 1% Triton, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 2mM de EDTA) seguida da adição dos inibidores de proteases e fosfatases (1mM Na_3VO_4, 1mM de PMSF, 2µg/mL de aprotinina). As células foram mantidas por 15 minutos a 4°C e em seguida, centrifugadas a 4°C durante 15 minutos a 13000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com o manual do fabricante utilizando-se o kit Reagente BCA (BioAgency®). Para leitura das

amostras, foram utilizados os filtros de 562nm do leitor de microplacas (Bio-RAD®).

3.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Western Blot

As proteínas foram separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos proteicos foram separadas em gel de poliacrilamida, com a seguinte composição: Tris 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0,03% em, N, N, N tetra metilenodiamina (TEMED, Sigma®); o gel de empilhamento continha Tris 0, 125 m pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0, 045% e TEMED. Em seguida, os extratos protéicos separados foram transferidos para a membrana de PVDF (*Hydrophobic polyviniylidene difluoride*, GE ®) em tampão Tris 25 mM, metanol 20% por uma hora e meia a 100 V e a 4ºC.

Após a transferência, os sítios proteicos inespecíficos foram bloqueados com leite 5% em PBS–Tween 0,1% ou em TBS-BSA 3% com Tween 0,1%. Após esta etapa, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra a proteína de interesse *O.N*. a 4ºC ou contra β-actina, GAPDH ou β-tubulina por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário especifico conjugado a peroxidase por 1 hora. A revelação da membrana foi feita utilizando-se a solução de ECL (*enhanced chemiluminiscence*) necessária para uma detecção precisa das proteínas. A revelação foi realizada em câmera escura ou pelo o sistema de imagem digital Image Quant LAS 4000, GE ®. Para determinar o peso das proteínas em estudo, foi utilizado um padrão de peso molecular conhecido.

3.6 Imunofluorescência

Cerca de $3x10^4$ células foram plaqueadas em placa de 24 poços em condições estéreis. Após 24hs, o meio de cultivo foi trocado pela solução HBSS 1X e as células foram irradiadas com UVB. 2, 4, 8 e 24 horas após irradiação as células foram fixadas com paraformaldeído (2-4%) durante 15 minutos, lavadas com PBS 1X e depois foi adicionado PBS/Triton 0,2% por 5 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com PBS/BSA 5% por 1 hora. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS/BSA 1% e incubados em câmera úmida *O.N*. Após três lavagens com PBS 1X, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 488 (verde), 546 (laranja) ou 633 (vermelho), de acordo com a origem do anticorpo primário. Depois, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e foi adicionado DAPI (azul) diluído com PBS/BSA 1% por 15 minutos. Nos experimentos de colocalização foi adicionado no meio de cultivo Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen®) por 45 minutos, na concentração de 200nM.Também foi utilizado Lisotracker Green (Invitrogen®) na concentração de 1,5µM. Por fim, as lâminas foram montadas com glicerol/PBS 1X fresco 1:1 e a análise foi realizada em microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta / UV e as colocalizações foram analisadas pelo programa Zeiss LSM Image Browser Versão 4.2.0.121.

3.7 Detecção de galectina-3 extracelular

Cerca de $2x10^6$ células foram plaqueadas em placas de 60 mm^2. Após 24hs, as células foram expostas a luz UVB e mantidas em meio de cultura suplementado ou não. Seguido da irradiação, 8 e 24h após, o meio foi

recuperado e armazenado a -20°C. Para concentrar as amostras foram utilizadas colunas com filtro de 15mL com uma capacidade de concentrar produtos de até 100kDa (Amicon, Millipore®). Foi adicionado 1ml de água deionizada para umedecer a membrana e centrifugada por um minuto a 4000g a 4°C. Após esta etapa, adicionou-se 6ml do meio de cultura obtido no experimento e centrifugou-se durante 9 minutos, obtendo 1,5 ml de meio como resultado da concentração. Como descrito anteriormente, a separação protéica foi realizada através de *western blot* separando as amostras que não foram mantidas com SBF das que haviam sido mantidas com SBF. Foram utilizados dois géis de poliacrilamida a 12% e 30 µg das amostras foram aplicadas em cada linha de ambos os géis, como indicado. Ambos os géis foram submetidos à corrida eletroforética, porém, um gel foi utilizado para a transferência e o outro gel foi corado com azul de coomassie 0,05% para evidenciar o carregamento das amostras.

3.8 Ensaio em *transwell* com meio condicionado

Foram utilizadas placas tipo *transwell* com filtro 0,4µM. Neste ensaio, um grupo de células foi utilizado como controle e plaqueado em placa de 6 poços (duas triplicatas) enquanto que, o segundo grupo foi plaqueado no filtro do *transwell*. Este último grupo foi dividido em dois grupos, células irradiadas ou não irradiadas. Após irradiação o *transwell* foi transferido para a placa do primeiro grupo com o objetivo de manter as células da placa em contato com o meio condicionado das células previamente irradiadas no *transwell*. Os *transwells* restantes, não irradiados, foram também transferidos para a placa de 6 poços, em contato com a outra triplicata durante 24 horas. Depois desse

período, as células aderidas nas placas foram tripsinizadas e analisadas com iodeto de propídeo (PI) no citometro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickson®).

3.9 Ensaio clonogênico

Foram plaqueadas $2x10^5$ células, em triplicata, de melan-a e Tm1 em em placa de 6 poços e após o tratamento com 100mM de galectina-3 exógena por 24h, as células foram irradiadas. Após isso, as células foram soltas, contadas e 600 células foram plaqueadas em placas de 60 mm e mantidas em cultura até o aparecimento de clones. Depois de aproximadamente 12 dias, as células foram fixadas com formaldeído 3,7%, coradas com cristal violeta 0,1%, lavadas com agua destilada e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, foi realizada a contagem dos clones e as análises estatísticas.

3.10 Ensaio de proliferação

As células de melanoma humano foram plaqueadas em placa de 12 poços ocupando 15% da área do poço. Após 6 horas de adesão, as placas correspondentes ao tempo “zero ou inicial” foram retiradas e as células restantes foram tratadas. As placas erstantes foram irradiadas com UVB e 24 e 48 horas após as placas foram fixadas com formaldeído 4% durante duas horas, lavadas com PBS 1X e mantidas a 4ºC. Uma vez que todas as placas foram fixadas foi realizada a lavagem com borato de sódio 0,1M pH 8,5 e a adição de azul de metileno 1% por 10 minutos. Em seguida, os poços foram lavados algumas vezes com água destilada até lavagem total do corante e as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, foi feita a diluição da coloração de azul de metileno pela adição de 700

µl de HCL 0,1M em cada um dos poços. Em seguida, 200 µl da solução de azul de metileno foram transferidos em placa de 96 poços em triplicata e a leitura foi realizada em um leitor de placas com um comprimento de onda a 595nm.

3.11 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células da epiderme expostas à luz UV

As linhagens de melanoma murino foram plaqueadas, $0,5x10^5$, em placas de 12 poços e mantidas em condições de cultivo normais (segundo descrito acima) ou em condição de baixa ou alta glicose para aumentar o metabolismo celular, 5mM e 15mM, respectivamente, com o objetivo de evidenciar produção de espécies reativas de oxigênio. Após 24 horas de irradiação, as células foram incubadas com DHR123 (dihidrorodamina) 15 µM em meio de cultura por 30 minutos a 37°C protegidas da luz. Em seguida, as células foram deaderidas com PBS-EDTA e tripsina, centrifugadas a 2000 rpm durante 4 minutos e lavadas com PBS. Depois da centrifugação as células foram ressuspendidas em 200 µl de PBS e analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACScalibur Becton Dickson). Uma amostra com cloreto cobaltoso ($CoCl_2$ 100 µM) e células não marcadas foram utilizadas como controle. O cloreto cobaltoso é um metal pesado tóxico capaz de induzir a produção de ROS.

Para determinar a geração de superóxido foi utilizado o indicador de superóxido MitoSOX a 5µM (Life Technologies®). O MitoSOX foi adicionado nas células por 30 minutos e após a incubação as células foram lavadas e deaderidas para posterior análise por citometria de fluxo. Este reagente não é

oxidado por outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio pelo que é específico para a detecção de superóxido.

3.12 Imunoprecipitação

Com o objetivo de observar possíveis interações entre galectina-3 e MAPKs, foram realizados ensaios de imunoprecipitação. As células foram plaqueadas em placas de 100mm de diâmetro e após 24 horas o meio foi removido e foi adicionado *starvation medium* (meio suplementado com 0,1% de soro). Após este período, as células foram irradiadas (doses indicadas nos ensaios) e 40µl de *beads* cobertas com proteínas A/G, por amostra foram adicionados e lavadas três vezes com PBS. Depois das lavagens, as *beads* foram ressuspendidas em 500 µl de PBS e o anticorpo primário foi adicionado (1,2 µl de anti-Gal-3) e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. Também foram utilizados como controles um anticorpo irrelevante (não especifico) e o anticorpo específico da proteína alvo sem amostra.

Após a irradiação, foi feita a extração de proteínas com *buffer* H (Beta-gliceraldeído 50mM pH7,3, EGTA 1,5mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Ortovanadato de Sódio 0,1mM, aprotinina 10µg/ml, PMSF 1mM) e sonicadas na potência 6 (0,03 W) durante 6 segundos por duas vezes (Fischer Scientific). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, as *beads* foram lavadas com PBS, ressuspendidas em *buffer* H e 100 µl de solução de *beads* foram adicionadas em cada tubo. Após esta etapa, 400 µl de cada extrato protéico com a mesma quantidade de proteína total, foi adicionado nos tubos e incubado a 4ºC durante 2 horas. Após

2hs, foi adicionado buffer de amostra no extrato remanescente e armazenado a -20°C.

Depois de duas horas de incubação as *beads* foram lavadas duas vezes com 500µl de Co-IP *buffer* (20 mM Hepes pH 7,4, 2 mM EGTA, 20 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl,0,1% Triton) e uma vez com 0,2 M NaCl e centrifugadas a velocidade máxima durante 1 minuto a 4ºC. O excesso de *buffer* foi removido cuidadosamente e foram adicionados 70 µl de tampão de amostra. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e armazenadas a -20°C.

3.13 Avaliação do conteúdo de vacúolos acídicos

As células foram plaqueadas em placa de 12 poços e depois de aderidas foram irradiadas com luz UVB, 6,6mJ/cm^2. Alguns poços foram reservados para ter um controle em *starvation,* privado de soro. Após o tempo de 24 horas pós-irradiação as células foram incubadas por 15 minutos com Laranja de Acridina 5µg/ml a 37°C em PBS e protegidas da luz. As células foram soltas com PBS-EDTA, centrifugadas e ressuspendidas em 200 µl de PBS para análise por citometria de fluxo.

3.14 Avaliação da massa mitocondrial e do conteúdo lisossomal

Cerca de $1x10^5$ células foram plaqueadas em placa de 12 poços e irradiadas com uma dose de 6,6 mJ/cm^2 e 24 horas após, as células foram incubadas com Lisotracker Green a 1µM ou Mitotracker Green a 150nM (Invitrogen®). As células foram incubadas com estes marcadores separadamente durante 40 minutos a 37°C e protegidas da luz.

Posteriormente, as células foram soltas, centrifugadas e após as lavagens com PBS foram analisadas por citometria de fluxo.

3.15 Microscopia eletrônica de transmissão

Cerca de $2x10^6$ células da linhagem Melan-a foram plaqueadas em placas de $100mm^2$ irradiadas e após 8 e 24 horas as células foram soltas com PBS e *cell scraper*. As células foram centrifugadas e incluídas em glutaraldeído 0.5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1% (pH 7.4) por 12 horas a 4 ºC. As amostras foram mantidas em uma diluição de 10% do fixador a 4ºC até o processamento do material realizado em colaboração coma Profa. Sonia Oliani, UNIFESP, São José do Rio Preto. As amostras foram processadas para as técnicas de imunoeletrônica assim como para ultraestrutura. Depois da desidratação e inclusão foram realizados cortes ultrafinos utilizados para imunocitoquimica. As telas de níquel foram incubadas com anticorpo anti-Gal-3 M3/38 concentrado ou na diluição de 1:20. Depois, as telas foram contrastadas com acetato de uranila e uma solução contendo citrato de sódio, nitrato de chumbo e hidróxido de sódio. As amostras destinadas para ultraestrutura foram incluídas em araldite pura, cortadas e contrastadas para serem visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP-EPM.

3.16 Ensaios com LY290042

Com o objetivo de inibir o processo autofágico foi utilizado o composto LY290042 (inibidor de autofagia) diluído em DMSO em uma concentração de 20 µM. Para este ensaio, foram plaqueadas $0,5x10^5$ células da linhagem Tm1

em placa de 12 poços, irradiadas e mantidas em meio de cultura com LY290042 (Sigma®) por 6 e 24 horas. Após estes períodos, as células foram soltas e fixadas em etanol 70% para posterior análise por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. Outras amostras foram destinadas para incubação com Laranja de Acridina 5 µg/ml para avaliar o conteúdo de vacúolos autofágicos. Também foram plaqueadas $2x10^5$ células em placas de 6 poços e submetidas a estas mesmas condições experimentais para a extração de proteínas.

Também foi realizado o ensaio clonogênico com a adição de LY290042. Cerca de $2x10^5$ células da linhagem Tm1 foram plaqueadas em placas de 6 poços e divididas em dois grupos experimentais, o controle/irradiado e o controle/irradiado com adição de LY290042. O inibidor foi adicionado, 20 µM, e 6 horas após as células foram irradiadas. O ensaio foi realizado segundo o item 3.8.

3.17 Inibição de JNK

As células foram plaqueadas em placas de 12 e 6 poços considerando um grupo controle e outro irradiado. A inibição foi realizada com o composto SP600125 (Santa Cruz, Biotechnology®) um inibidor reversível e seletivo de JNK1, 2 e 3. O mesmo foi diluído em DMSO e em meio RPMI 1640 na hora do tratamento em uma concentração final de 20 µM. Após de irradiação, as células foram soltas para realizar diferentes ensaios: análise de ciclo e morte celular, avaliação do conteúdo de vacúolos autofágicos e extração de proteínas 2, 6 e 24 horas após de exposição a UVB.

3.18 Extração de DNA e determinação do número de cópias de DNA mitocondrial por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Cerca de $2x10^5$ células foram plaqueadas em triplicata em placas de 6 poços e depois de aderidas foram irradiadas com UVB. O DNA foi extraído, 3 e 24h após a irradiação, com o kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen®) de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de DNA obtida foi quantificada por espectrofotometria (Nanodrop 1000, ThermoCientific®), sendo posteriormente realizada a qPCR.

O gene B2m (beta 2-microglobulina), foi utilizado como controle e o gene *mt-Nd1*, um gene mitocondrial que codifica a NADH dehydrogenase 1 foi utilizado como alvo. Ambos os genes são de origem murinho. A Tabela 1 mostra as sequências dos *primers* e a temperatura de anelamento:

Tabela 1. Sequências dos primers e temperatura de anelamento para amplificação dos genes B2m e mt-Nd1 por qPCR.

Primer	Forward	Reverse	T.A.
B2m	5´-ATGGGAAGCCGAACATACTG-3´	CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT	61ºC
Nd1	CCTATCACCCTTGCCATCAT	GAGGCTGTTGCTTGTGTGAC	60ºC

T.A.=temperatura de anelamento.

Para esta reação, foi utilizada a tecnologia de *SYBRGreen* (LifeTechnologies®) e os dados da reação foram analisados pelo s*oftware Rotor Gene 3000* (Corbett Life Science®). Para determinar a expressão diferencial do gene *ND1* foi realizada a quantificação relativa em relação ao gene normalizador através do modelo matemático proposto por Pfaffl (2001).

3.19 Ensaio de siRNA

Para os ensaios de silenciamento do transcrito de *Lgals3,* $2x10^5$ células foram plaqueadas em placas de 60 mm e divididas em duas condições experimentais, siRNA *scramble*/controle e siRNA especifico contra *Lgals3.* Depois da adesão celular, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com meio OPTI-MEM da (Invitrogen®) sem adição de SFB. Posteriormente, as células foram incubadas com siRNA anti-*Lgals3* ou siRNA controle conjugados com Lipofectamina 2000 (Invitrogen®), Oligofectamina (Invitrogen®), ou DharmaFECT (Dharmacon®). Após 6 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2, retirou-se o OPTI-MEM e adicionou-se o meio de cultura especifico para a linhagem suplementado com SFB. Após 48 horas, as células foram soltas e utilizadas para plaquear os ensaios de: extração proteica, ensaio de proliferação e imunofluorescência.

A concentração do siRNA foi dependente da linhagem celular utilizada, variando de 25nM-35nM. As sequências dos siRNAs utilizados contra galectina-3 foram:

Gal-3 murina: 5’ UUU CCU GAU UAG UGC UCC ACC CGC CGC 3’ e 3’ AAA GGA CUA AUC ACG AGG UGG GCG G 5’ (IDT®)

Gal-3 humana: ON-TARGET plus SMART pool LGALS3 (3958) (Dharmacon®).

3.20 Isolamento mitocondrial para extração de proteínas

Para cada condição, controle e irradiada, foram plaqueadas cerca de $5x10^6$ células em duas placas de $100mm^2$. Após adesão as células foram irradiadas ou não e após 50 minutos da exposição à UVB, as células foram

removidas com tripsina ou *cell scraper* e lavadas duas vezes com PBS gelado. Após esta etapa, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi descartado. No mesmo tubo foram adicionados 500 µl de *buffer* HIM gelado (200 mM Manitol; 70 mM sacarose; 10 mM HEPES; 1mM EDTA; pH 7.5 com KOH) e após 20 minutos no gelo a solução foi homogeneizada 20 vezes com ajuda de uma seringa de 27 Gy. Em seguida, o homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C e o sobrenadante obtido foi transferido para um um tubo novo. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fração superior resultante é a fração citoplasmática e o *pellet* a fração mitocondrial. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo com tampão de amostra e o *pellet* foi lavado e centrifugado com HIM *buffer* por 10 minutos a 9000 rpm a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em um volume de 30-60 µl u de HIM *buffer*.

As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE e anticorpos específicos contra tubulina e TOM 20 foram utilizados para verificar a separação e pureza da fração citoplasmática e da fração mitocondrial, respectivamente.

3.21 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas com o auxilio do software GraphPad Prism® versão 4.03. O nível de significância foi $\alpha = 0{,}05$.

CAPÍTULO 1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A exposição à luz UVB mostrou indução de morte celular

Antes de avaliar o envolvimento de galectina-3 na reposta de melanomas frente ao agravo gerado por UVB, foi realizado ensaio de morte celular para verificar a sensibilidade destas células à exposição à UVB. A morte celular foi quantificada através da marcação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Na Figura 1 observamos que a luz UVB foi capaz de induzir morte celular em melan-a 24 e 48 horas após irradiação, mas após 48 horas o grande aumento sugere que o dano celular foi elevado. A linhagem tumoral Tm1 não mostrou diferenças na porcentagem de células hipodiplóides 24 horas após irradiação, mas após 48 horas foi evidenciado o aumento de células hipodiplóides. Na Figura 1 observamos que após 24 horas de irradiação UVB há indução de morte celular apenas em melan-a. No entanto, há indução de morte celular em Tm1 após 48 horas de irradiação UVB, mas a porcentagem de células em morte celular apresentada por melan-a é superior à apresentada por Tm1. A luz UVB é considerada um carcinógeno ambiental capaz de induzir lesões que interferem na transcrição e na replicação celular podendo ativar uma resposta pró-apoptótica (Ortolan & Menck, 2013). O resultado obtido neste ensaio mostra que de fato a luz UVB é capaz de induzir morte celular e que a linhagem melan-a é mais sensível do que Tm1 frente a este tipo de estímulo.

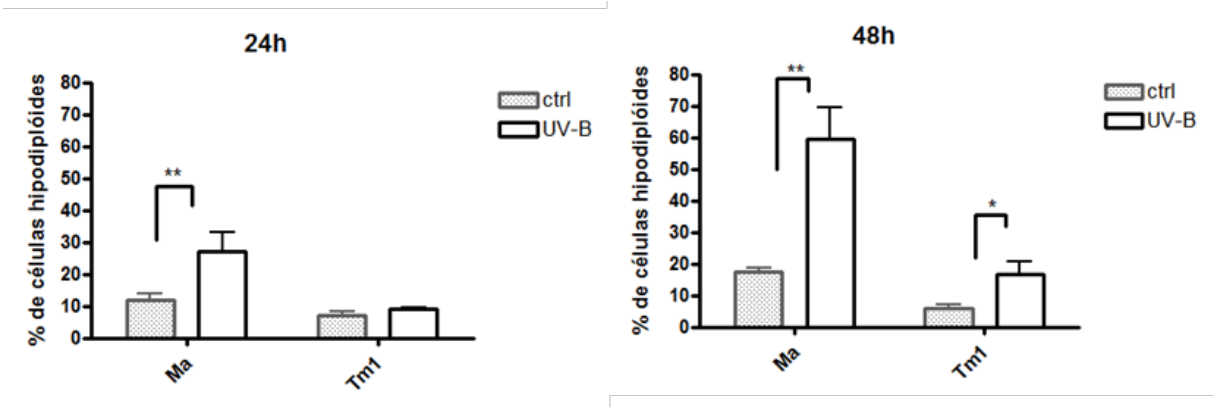


Figura 1 - Análise de morte celular de células melan-a e Tm1 após irradiação com UVB. Análise 24 e 48 horas após de irradiação com uma dose de aproximadamente 6,6mJ/cm^2. A porcentagem de células hipodiplóides foi avaliada através da marcação com iodeto de propídeo. *ANOVA* **p<0,01.*p<0,05. Legenda: ctrl (controle). Experimento representativo n=3.

4.2 Avaliação da expressão de galectina-3 através de *western blot*

Para avaliar os níveis proteicos de galectina-3 nas linhagens melan-a e Tm1, realizamos imunomarcação por *western blot* em extratos protéicos de células controle, não irradiadas, e de células irradiadas com UVB. Como em 24 horas observamos sensibilidade diferencial entre melan-a e Tm1 à UVB, utilizamos tempos 4,8 e 24 horas de exposição (Figura 2).

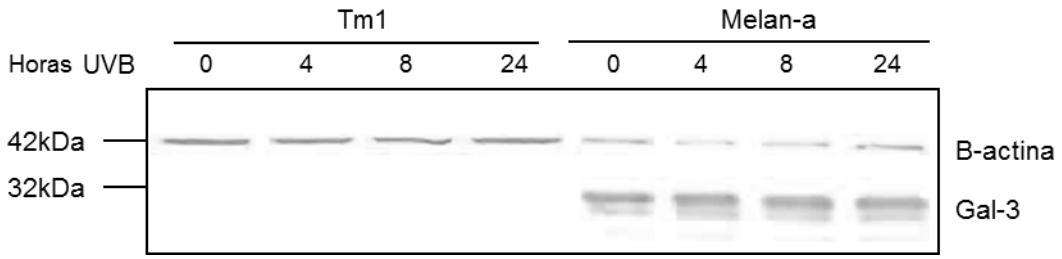


Figura 2 - **Galectina-3 é expressa em melan-a e não em Tm1.** Avaliação da expressão de galectina-3 através de *western blot* em extratos proteicos de células melan-a e Tm1 expostas ou não a luz UVB por 4, 8 e 24 horas. β-actina foi utilizada como controle de carregamento proteico. (UVB: 6,6mJ/cm^2).

Não se observou expressão de galectina-3 na linhagem Tm1, corroborando o modelo experimental descrito anteriormente, onde mostrou-se a perda de Gal-3 durante o processo de geração das linhagens tumorigênicas, entre elas Tm1. Como descrito em trabalho do nosso grupo, o promotor de galectina-3 encontra-se metilado na linhagem Tm1, podendo ser este o evento responsável pelo controle da expressão de Gal-3 (Machado *et al*, 2014). Além disso, o tratamento de células Tm1 com altas concentrações de 5'-aza-2-deoxicitidina, um inibidor de metiltransferases do DNA, resultou na reexpressão de Gal-3.

Em melan-a confirmamos a expressão basal de galectina-3, no entanto, não foram observadas modificações nos níveis proteicos de galectina-3 após irradiação. Este resultado sugere que a luz UVB não está envolvida na alteração da expressão de galectina-3 após este estímulo.

4.3 Detecção de Gal-3 extracelular no sobrenadante da linhagem melan-a após irradiação e análise do efeito de Gal-3 no meio extracelular

Embora não tivessem sido observadas alterações na expressão de Gal-3 intracelular em melan-a, como descrito anteriormente, Gal-3 também é secretada e neste caso pode apresentar função pró-apoptótica. Uma vez observada a indução de morte celular em melan-a 24 horas após exposição à UVB (Figura 1), verificamos se UVB alteraria os níveis extracelulares de Gal-3, podendo estar relacionada com esta indução de morte celular.

Para tal expusemos estas células a luz UVB e 8 e 24 horas após exposição recolhemos o meio de cultura e realizamos um gel SDS-PAGE aplicando as amostras obtidas. Devido ao fato do soro poder interferir na obtenção dos dados e na quantificação proteica, foram processados dois tipos de amostras, aquelas em que as células foram cultivadas com meio suplementado com soro e aquelas que foram cultivadas privadas de soro (0,1% de soro fetal bovino). Foi observado um aumento na expressão de Gal-3 24 horas após irradiação com UVB, sugerindo que a secreção de galectina-3 é aumentada após esta irradiação. Este aumento pode ser melhor visualizado nas amostras com baixa adição de soro (Figura 3). O gel de carregamento corado com azul coomassie mostrou que a quantidade de proteínas aplicadas no gel é semelhante.

Dados da literatura demonstram que Gal-3 secretada ao meio extracelular é capaz de se unir a glicoproteínas de superfície, como o complexo CD29/CD7 em células T, e induzir a ativação de vias de sinalização, a liberação de *citocromo c* e a ativação da caspase-3 (Nangia-Makker *et al*, 2008). Sugere-se que a função de Gal-3 pode ser resultado do balanço entre a atividade anti-apoptótica de Gal-3 endógena e a atividade pró-apoptótica de Gal-3 exógena. Portanto, o efeito apoptótico pode ser dependente da presença ou ausência de Gal-3 no citoplasma das células (Nakahara *et al*, 2005). E nossos dados mostram que embora UVB não altere os níveis intracelulares de Gal-3, esta irradiação induz o aumento da secreção desta proteína podendo resultar na morte celular de células melan-a.

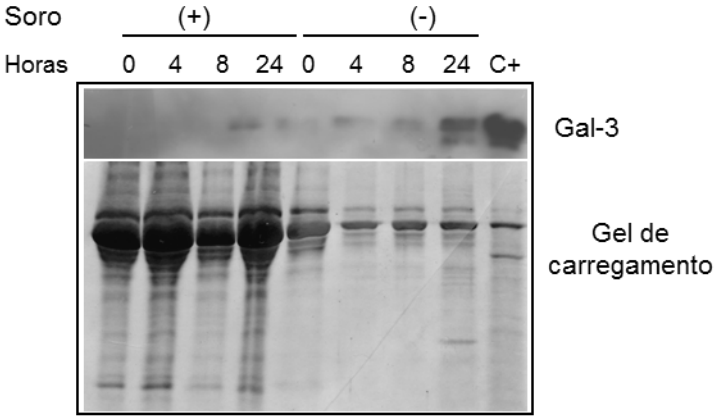


Figura 3 - **Irradiação UVB induz a secreção de Gal-3 em melan-a.** Detecção de galectina-3 extracelular no sobrenadante da linhagem melan-a após 24 horas de irradiação com UVB. Na parte superior observa-se a expressão de galectina-3 0, 4, 8 e 24 horas após exposição à UVB na presença ou ausência de soro. Na parte inferior se observa o carregamento de amostra no gel corado com azul coomassie. Legenda: C+ (controle positivo – melan-a). (UVB: 6,6mJ/cm^2).

Para avaliar se a secreção de galectina-3 em melan-a era responsável pelo aumento da porcentagem de células hipodiplóides após irradiação com UVB, realizamos um ensaio em *transwell* plaqueando células melan-a no filtro do *transwell* e em placa de 6 poços, como descrito. As células melan-a foram cultivadas por 24 horas na presença ou ausência de meio condicionado proveniente de células melan-a irradiadas com UVB (24 horas e 6,6mJ/cm^2). Após este período, foi realizada marcação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. A partir desta análise pudemos observar que não havia diferença na porcentagem de células hipodiplóides entre as células que foram mantidas em contato com meio condicionado e as células que ficaram aderidas na placa em contato com células não irradiadas (Figura 4).

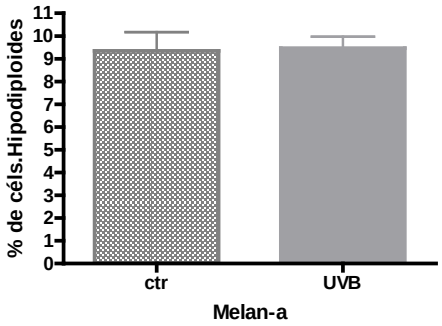


Figura 4 - **Gal-3 extracelular induzida por UVB não está envolvida na indução de morte celular em resposta a esta irradiação.** Avaliação da morte celular de células melan-a cultivadas na presença ou ausência de meio condicionada proveniente de células melan-a irradiadas com UVB (UVB: 6,6mJ/cm^2). Porcentagem de células hipodiplóides obtidas através da marcação com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo.

A secreção de galectina-3 também tem sido associada com a adesão e o espalhamento celular em câncer de mama (Baptiste *et al*, 2007), assim como na diferenciação celular (Yu, 2012 para revisão). O resultado obtido no experimento com meio condicionado mostrou que a secreção de Gal-3 observada na linhagem melan-a não está envolvida no processo de morte celular. Assim como em células T, diferentes tipos celulares apresentam ligantes extracelulares específicos para Gal-3 associados com apoptose. Possivelmente, em nosso modelo de melanoma murino a Gal-3 secretada não possui um ligante adequado e, desta maneira, não é capaz de induzir a ativação de vias de sinalização, impedindo uma resposta apoptótica através desta via. Outra possibilidade é que a Gal-3 seja secretada com o objetivo de atuar como imunomoduladora após a exposição à UVB, pois o trabalho de Liu e colaboradores mostra que a secreção de galectina-3 ao meio extracelular induz o aumento dos níveis de superóxido, o qual atua como modulador da

função de monócitos (1995). No entanto, é impossível evidenciar este efeito sem a existência do microambiente tumoral.

4.4 Análise do efeito de galectina-3 exógena através do ensaio clonogênico

Como a secreção de Gal-3 ao espaço extracelular após irradiação UVB não foi suficiente para a indução de morte de melan-a, e sabendo que Gal-3 é uma proteína solúvel, resolvemos adicionar Gal-3 exógena no intuito de aumentar a oferta desta proteína a células cultivadas. Talvez, uma maior quantidade de Gal-3 no meio extracelular module a resposta celular de indução a morte após UVB. Ao mesmo tempo, verificamos se a adição de Gal-3 em Tm1 era capaz de ativar vias relacionadas à morte ou sobrevivência.

Suzuki e colaboradores (2008) demonstraram que mastócitos tratados com galectina-3 exibem um potencial pró-apoptótico através da indução de estresse oxidativo e modificações da permeabilidade mitocondrial. Neste trabalho, a indução de apoptose por parte de Gal-3 foi através da união desta proteína ao receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE), via o domínio de reconhecimento de carboidratos de Gal-3.

Como observado, a Figura 5 mostra que a adição de galectina-3 recombinante não induz morte celular ou uma maior resistência após exposição à luz UVB tanto em melan-a, quanto em Tm1. Portanto, o tratamento com Gal-3 em nossas linhagens não induziu uma resposta celular associada com sobrevivência ou apoptose.

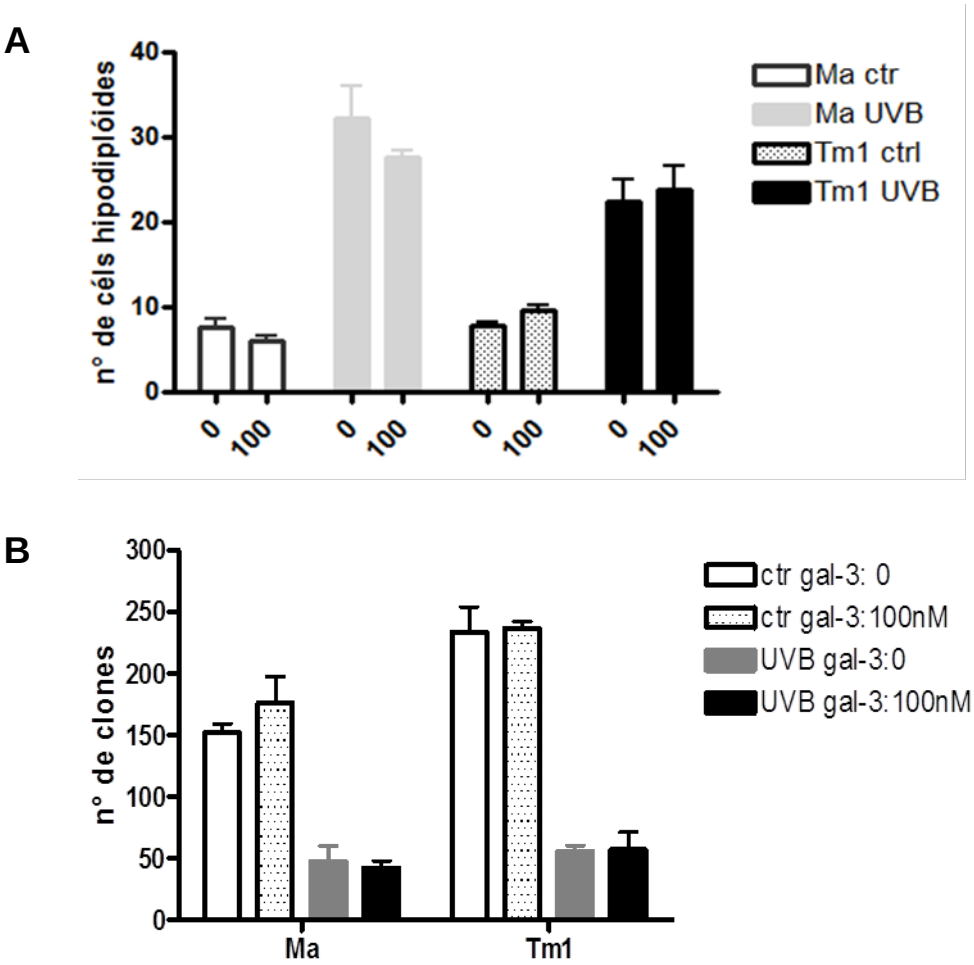


Figura 5 – A adição de Gal-3 exógena não altera a resposta de morte ou sobrevivência celular frente ao agravo gerado por UVB. Análise da resposta à adição de galectina-3 exógena. (A) quantificação da porcentagem de células hipodiplóide em melan-a e Tm1 irradiadas ou não com UVB (24 horas após UVB e 6,6mJ/cm^2) na presença ou ausência de galectina exógena (100nM) (B) ensaio clonogênico utilizando as mesmas condições anteriores. Experimento representativo n=3.

Embora não fossem observadas diferenças significativas, os dois gráficos mostram uma tendência na resposta à adição de Gal-3 exógena em ambas as linhagens. Na Figura 5(A) observa-se que a adição de Gal-3 em melan-a, tanto no grupo controle quanto no irradiado, induz uma pequena diminuição na porcentagem de células hipodiplóides. Ao mesmo tempo, na Figura 5(B) é possível observar aumento do número de clones após a adição

de Gal-3, sugerindo que melan-a é mais resistente ao efeito genotóxico da luz UVB na presença de galectina-3 exógena. No entanto, na linhagem Tm1 a Figura 5(A) mostra que a adição de galectina-3 em Tm1 tende a aumentar a porcentagem de células hipodiplóides, enquanto na Figura 5(B) não notamos nenhum efeito no número de clones em resposta à adição exógena de galectina-3.

A concentração de galectina-3 escolhida neste ensaio foi a mesma que a utilizada no trabalho de Suzuki, anteriormente citado. Portanto, a ausência de uma resposta notória em nosso experimento pode ser reflexo da ausência de ligantes específicos para galectina-3 na superfície extracelular de melan-a e Tm1 ou efeito da ação conjunta de Gal-3 intracelular e a extracelular, no caso de melan-a.

4.5 Caracterização da localização subcelular de galectina-3 em Melan-a

Como discutido anteriormente além da localização intra ou extracelular, a compartimentalização celular de Gal-3 é crucial para a determinação de sua função. Portanto, apesar de não ter sido observada alteração na expressão de Gal-3 em respota à UVB, esta poderia levar a alterações na compartimentalização desta proteína que poderiam estar relacionadas com a sensibilidade de melan-a a UVB. Para caracterizar a distribuição de galectina-3 em melan-a, foram realizadas ensaios de imunofluorescência a fim de poder observar a distribuição de Gal-3 na célula em estudo. Como mencionado na introdução, Gal-3 é uma molécula ubíqua no espaço intracelular, de fato, podemos notar na Figura 6 a ampla distribuição de galectina-3 em melan-a. Pode-se observar a Gal-3 nas células controle e nas

células irradiadas tanto no núcleo como no citoplasma, sendo esta proteína mais abundante nesta última região celular. Embora não tenha sido observada diferença na localização de galectina-3 após irradiação com UVB (4,8 e 24 horas), visualizou-se um aumento da expressão de Gal-3 a partir de 4 horas de exposição à UVB.

Como foi descrito que Gal-3 pode ser translocada para a mitocôndria e regular a produção de espécies reativas de oxigênio (Kim *et al*, 2008) e vias associadas com a função mitocondrial (Yu *et al*, 2002; Fukumori *et al*, 2006), realizamos a marcação das mitocôndrias com Mitotracker Red® com o objetivo de verificar a localização desta proteína. Na fotomicrografia correspondente a 24 horas após irradiação é possível visualizar uma possível colocalização de Gal-3 com a mitocôndria, através da marcação amarelada na região perinuclear, causada pela sobreposição da marcação de Gal-3 (verde) com as mitocôndrias (vermelho).

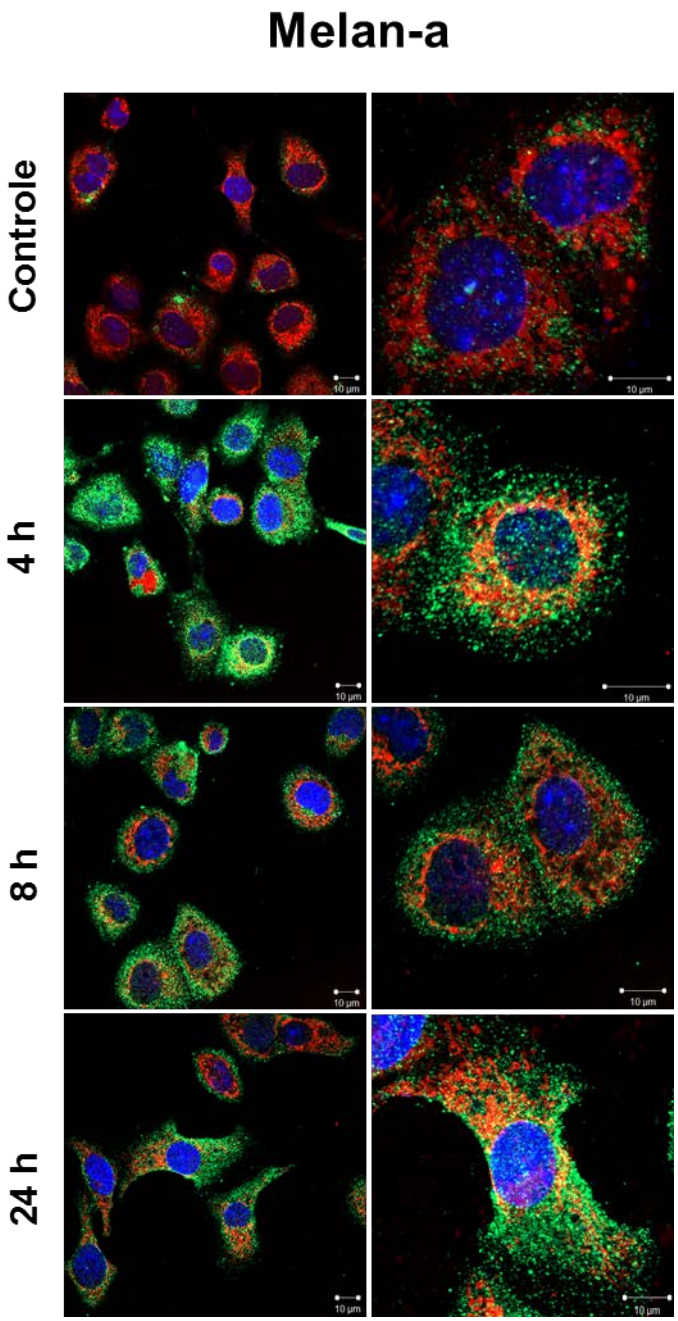


Figura 6 – Distribuição celular de Gal-3 em melan-a e Tm1. No painel observa-se a localização de galectina-3 em melan-a irradiadas com UVB (4 8 e 24 horas). Esquerda: imagens obtidas em microscópio confocal (aumento de 400x). Direita: zoom 2x. Vermelho: Mitotracker. Azul: DAPI. Verde: Gal-3. (UVB: 6,6mJ/cm^2).

Para confirmar se havia colocalização de galectina-3 com mitocôndrias após estímulo com UVB (8 e 24 horas e 6,6mJ/cm^2) , foram feitas

preparações para microscopia eletrônica de transmissão. Também processamos amostras para obter imagens da ultraestrutura de melan-a com o objetivo de observar as características morfológicas da célula em repouso, controle (7A), a fim de comparar estas com as células melan-a irradiadas (7B). Nas imagens de ultraestrutura notamos uma maior vacuolização nas células expostas a luz UVB, em alguns casos com conteúdo celular, sugerindo degradação e/ou renovação de moléculas e estruturas celulares em resposta ao dano genotóxico induzido por UVB. Além disto, estas micrografias também demostram que a luz UVB induz uma resposta protetora em melan-a após irradiação, evidenciado pelo aumento de melanossomos, produtores de melanina (Figura 6B).

Através da imunoeletrônica confirmou-se o dado obtido com imunofluorescência (Figura 7C), de que Gal-3 se encontra principalmente no citoplasma celular, estando também presente no núcleo e na membrana nuclear, após 8 e 24 horas de irradiação UVB. Ainda, verificamos a presença de galectina-3 nas mitocôndrias das células tanto em repouso quanto nas células irradiadas (7C, D), portanto, a localização de Gal-3 não foi alterada pela ação da luz UVB. Porém, parece existir maior marcação de galectina-3 nas mitocôndrias de células controle do que nas expostas à UVB, ao contrario do observado na Figura 6, onde se verificou uma possível colocalização de Gal-3 e mitocôndrias após 24 horas de exposição à UVB. Esta observação pode ser efeito de um possível aumento na massa mitocondrial pós-irradiação sem aumento nos níveis intracelulares de Gal-3, como demonstrado na Figura 2. Além disso, a presença de galectina-3 também foi observada dentro de vacúolos (Figura 7D), 24 horas após irradiação e, ao mesmo tempo uma

diminuição desta proteína nas mitocôndrias. Portanto, a diminuição de moléculas de Gal-3 na mitocôndria após UVB pode estar associada com a degradação desta proteína. Para poder avaliar se a UVB tem algum efeito na diminuição desta molécula na região mitocondrial ou na translocação de Gal-3 para essa organela, estudos morfométricos tornam-se necessários.

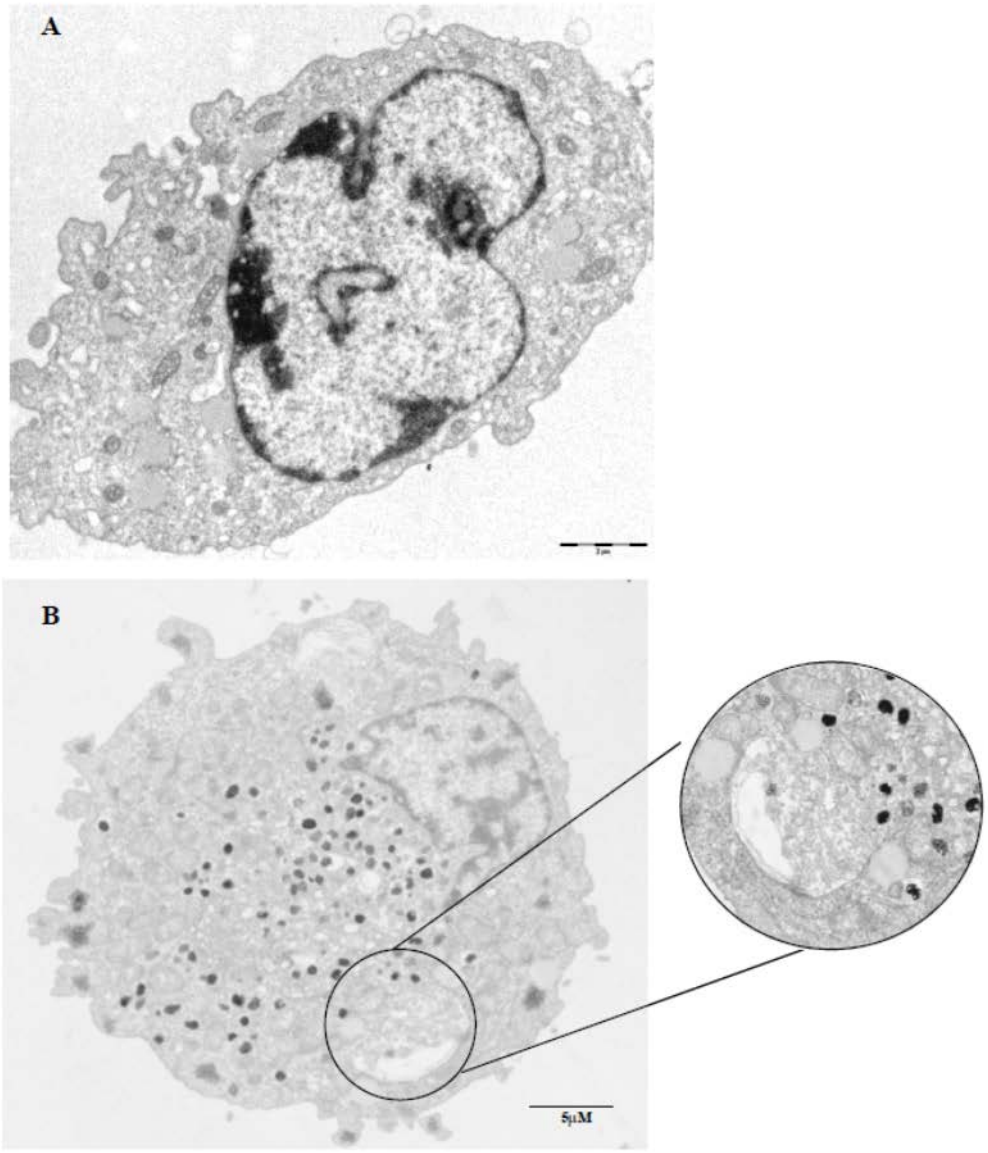


Figura 7 - **Ultraestrutura da linhagem melan-a.** (A) Controle, (B) células melan-a irradiadas com UVB (6,6mJ/cm^2) em detalhe a presença de vacúolos, além disso as células irradiadas demonstraram a presença de estruturas arredondadas escuras, melanossomos. A barra mostra o aumento das microfotografias, 0,5µM.

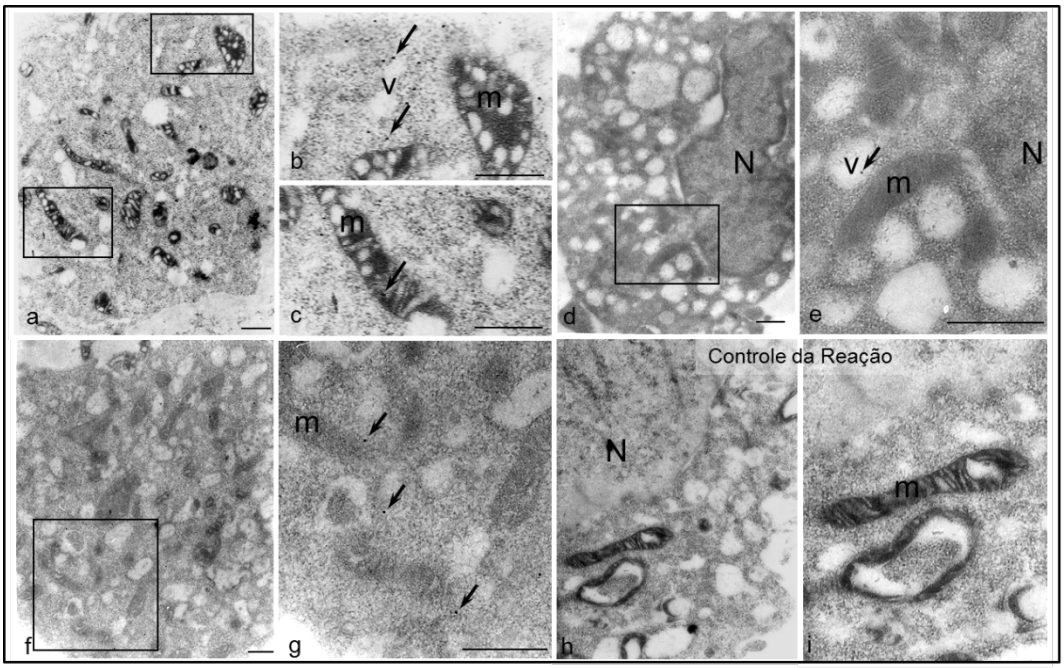


Figura 7 C – **Expressão de Gal-3 nas células Melan-a.** Na condição controle (**a-c**), a expressão da Gal-3 (setas) foi intensa, observada no citoplasma, mitocôndrias (m), membrana dos vacúolos (v) e núcleo (N). Após 8 (**d, e**) e 24h (**f, g**)**,** a expressão da proteína foi menos intensa. Nenhuma imunorreatividade foi observada no corte utilizado como controle da reação (**h, i**). Barras: 0,5 µm.

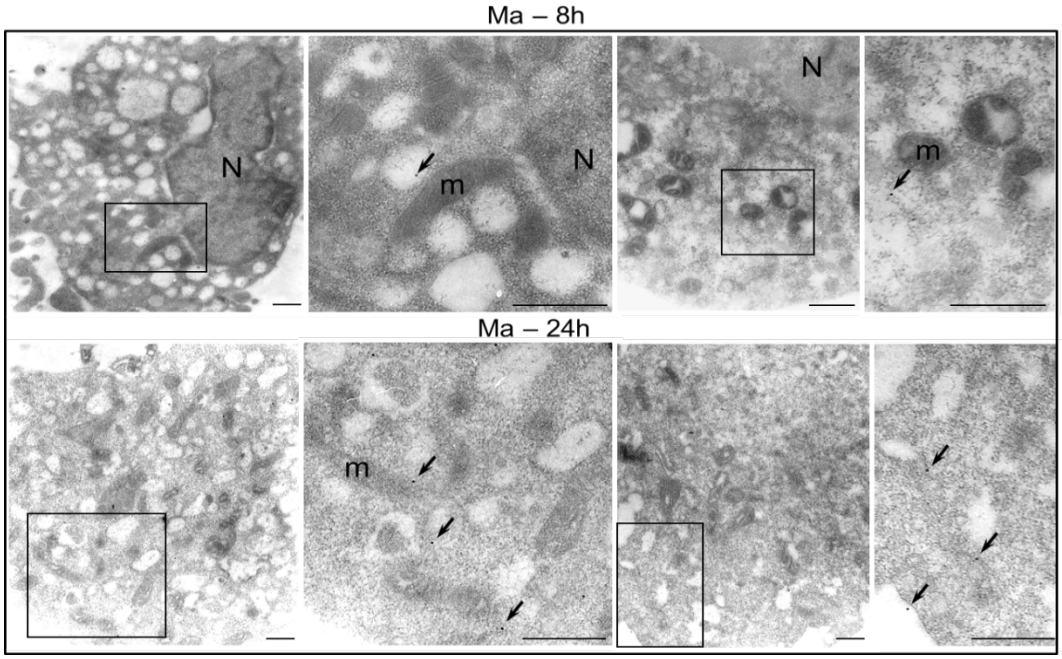


Figura 7 D - **Expressão de Gal-3 em melan-a 8 e 24 horas após irradiação UVB** (6,6mJ/cm^2). Núcleo (N), mitocôndria (m). Barras: 0,5 µm. As setas indicam marcação de Gal-3.

4.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após a exposição à luz UVB

Devido ao fato de galectina-3 poder estar envolvida tanto na geração quanto na proteção do estresse oxidativo e que a exposição à UVB pode gerar estresse genotóxico e, em menor medida, estresse oxidativo, decidimos conferir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS: *reactive oxygen species*) em melan-a e Tm1 após UVB. Para avaliar a produção de ROS utilizamos inicialmente o marcador DHR123 (Dihidrorodamina123), um marcador geral de ROS que uma vez oxidado se transforma em rodamina 123, que é fluorescente e pode ser quantificada por citometria de fluxo. A análise da produção de ROS mostrou que a linhagem tumoral Tm1 apresenta níveis de ROS superiores aos de melan-a quando expostas a luz UVB (Figura 8). Portanto, a luz UVB foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis de ROS em Tm1, no entanto, não foram observadas diferenças para melan-a. Com o objetivo de acelerar o metabolismo celular para tentar observar de forma mais clara qual era a resposta gerada nas células em estudo realizamos a adição de glicose. A adição de glicose (15mM) em Tm1 aumentou ainda mais os níveis de ROS, mas nem mesmo com este estímulo observamos alteração nos níveis de ROS em melan-a (Figura 8). Os dados com baixa glicose não foram mostrados, pois não se observaram grandes diferenças quando comparado com a condição de alta glicose.

O DHR123 é uma boa ferramenta para a detecção de diferentes espécies reativas, mas não é possível determinar a produção de superóxido através da utilização deste composto. O superóxido é uma de espécie reativa

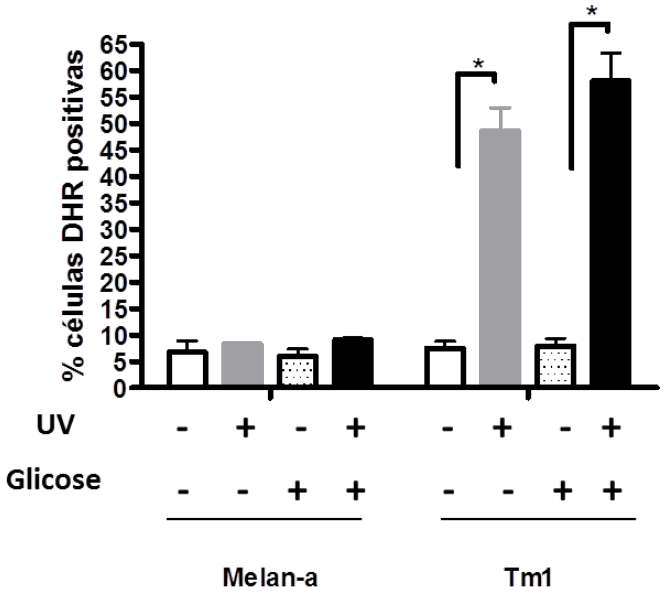


Figura 8 – **A exposição à UVB induz acúmulo de ROS em TM1 e não em melan-a.** Avaliação por citometria de fluxo da produção de espécies reativas de oxigênio através de DHR-123. O gráfico mostra células positivas para DHR123. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, * $p<0,01$. (UVB (6,6mJ/cm^2). Experimento representativo n=3.

formada pela redução da molécula de oxigênio por um único elétron e é incapaz de produzir dano direto no DNA, mas indiretamente pode reagir e amplificar a produção de espécies reativas participando da produção de radicais peróxidos com alto potencial oxidante e um importante papel na indução de dano das estruturas celulares. Embora não foi discutido anteriormente, as imagens de eletrônica (Figura 7D) mostraram a alteração de estruturas mitocondriais 24 horas após irradiação. A partir deste dado e sabendo que a mitocôndria é produtora de superóxido, decidimos avaliar se o conteúdo de superóxido era alterado após irradiação UVB. Para tal, fomos quantificar o conteúdo de superóxido produzido nas linhagens em estudo após

da irradiação utilizando o composto denominado mitoSOX^{TM}. Este composto entra em células vivas e se liga seletivamente à mitocôndria, sendo rapidamente oxidado apenas por superóxido e não por outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. Este produto oxidado é fluorescente e pode ser quantificado por citometria de fluxo. A Figura 9 mostra que em melan-a a luz UVB induziu um aumento nos níveis de superóxido 24 horas após a irradiação. As diferenças no índice médio de fluorescência (MFI) foram significativas apenas em melan-a. Interessantemente, a luz UVB não induziu modificações nos níveis de superóxido em Tm1, mas foi observado que os níveis basais desse radical em Tm1 são maiores aos observados para melan-a e mantidos depois da irradiação (Figura 9). O resultado obtido através da utilização de DHR123 (Figura 8) mostrou que a linhagem Tm1 teve um aumento nos níveis de outras espécies reativas após irradiação, e não de superóxido, no entano, melan-a mostrou um padrão contrário ao observado para Tm1. Cada uma das linhagens possui um background diferente, pois o resultado apresentado mostra que a linhagem tumorigênica Tm1 apresenta uma resposta celular diferencial frente à irradiação por UVB quando comparado com melan-a, não tumorigênica. De alguma forma, melan-a foi mais responsiva à indução de superóxido pela ação da UVB do que a produção de outras espécies reativas.

Sabe-se que a linhagem Tm1 é menos eficiente em eliminar espécies reativas devido a uma menor expressão das enzimas envolvidas na degradação de ROS (Souza *et al*, 2006). Baseado nesses achados é possível imaginar que o aumento de ROS observado em Tm1 24 horas após UVB está associado com a regulação dessas enzimas. Como mostrado, não houve diferenças nos níveis de superóxido, mas os níveis basais deste radical foram

altos na linhagem Tm1. Este resultado pode ser explicado pela baixa expressão da enzima SOD-2 (superóxido dismutase mitocondrial), na linhagem Tm1. Talvez, a UVB não induziu aumento de superóxido em Tm1 devido a que os níveis de esta espécie reativa nas células em repouso são muito altos. O aumento de superóxido em melan-a, mas não de outros tipos de espécies reativas, pode estar relacionado com o aumento da fosforilação oxidativa, ou defeitos mitocôndrias causada pela irradiação. Esse evento também pode estar associado com um aumento no número de mitocôndrias, baseado na observação da aparente redução de Gal-3 nas mitocôndrias após irradiação UVB (Figura 7). Por outro lado, sabe-se que a exposição à UV induz a produção de melanina com o intuito de proteger a pele do dano no DNA e produz o aumento dos níveis de ROS (Jenkins *et al,* 2013). O superóxido também pode ser utilizado como substrato no processo de melanogênese, portanto aumento evidenciado em melan-a sugere que esse radical pode estar atuando como um protetor dos melanócitos a exposição por UVB, como evidenciado nas imagens de ultraestrutura (Videira *et al*, 2012). Ainda, o aumento de superóxido em outros tipos celulares tem sido indicado como um produto da secreção de galectina-3 ao espaço extracelular (Liu *et al*, 1995).e vimos que as células melan-a secretam Gal-3 em reposta à irradiação UVB (Figura 3).

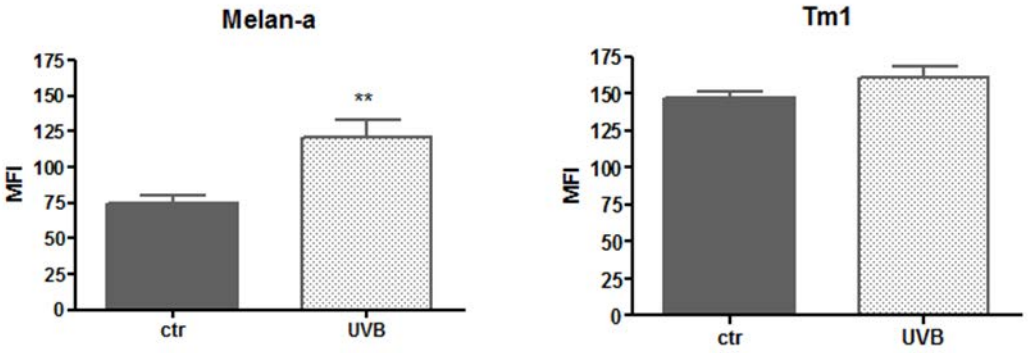


Figura 9 – **A exposição à UVB induz acúmulo de superóxido em melan-a e não em TM1.** Avaliação da produção de superóxido através do marcador mitoSOX^{TM}. Observe-se o aumento dos níveis de superóxido em melan-a após 24 horas de irradiação e os níveis constantes em Tm1. MFI (intensidade média de fluorescência). Legenda: Teste *t* **p<0,01. (UVB (6,6mJ/cm^2). Experimento representativo n=3.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio funcionam também como segundos mensageiros (Wang *et al*, 2010), portanto, a diferença observada entre melan-a e Tm1 com relação tanto aos níveis quanto ao tipo de ROS induzida em resposta à UVB, pode estar associada a distintas respostas celulares. Estas podem atuar como indutoras de eventos contrastantes, por exemplo, induzir morte em melan-a e ativar vias de sobrevivência em Tm1, o que poderia explicar a diferença de sensibilidade à UVB apresentada por estas linhagens (Figura 1). Uma via de sinalização que poderia explicar esta diferença de sensibilidade frente à UVB no nosso modelo, é a via mediada pelo fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). Este fator de transcrição é um regulador dos melanócitos e um oncogene em melanomas, estando envolvido na indução da pigmentação, reparo do DNA assim como na migração, sobrevivência, proliferação e metástase de melanomas. Muitos

genes são regulados transcricionalmente por MITF, dentre estes, genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Portanto, é possível que ao longo da progressão a expressão deste fator esteja alterada gerando uma resposta a UVB diferente entre linhagens tumorais e não transformadas.

Recentemente, Shoag e colaboradores (2013) demonstraram que o co-activador-1α (PGC-1) induz a ativação de MITF tanto em melanócitos como em melanomas expostos a luz UV. As proteínas PGC-1 são reguladores centrais da biogênese mitocondrial atuando como moduladoras do metabolismo energético através da ativação transcricional de proteínas mitocondriais e enzimas de detoxificação. Na mesma linha, outro estudo mostrou que melanomas com alto níveis de expressão de PGC-1 são capazes de aumentar o metabolismo energético mitocondrial e a detoxificação de ROS (Vazquez *et al*, 2013). Ainda, PGC-1 foi necessário para a progressão e sobrevivência de melanomas e induziu um aumento de expressão de MITF contribuindo com o feedback regulatório entre PGC-1 e MITF (Ronai, 2013). Interessantemente, em trabalho liderado pelo grupo de Heraldo Possolo de Souza, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mostrou-se que as linhagens Tm1 e Tm5 expressam altos níveis de PGC-1, assim o estudo deste sistema torna-se importante na caracterização da resposta à luz UV observada em Tm1 em relação aos níveis de ROS observados (trabalho submetido para publicação)

Para analisar o efeito biológico de ROS nesta linhagem a utilização de n-acetilcisteína (NAC) seria uma ótima ferramenta para estudar se a produção de ROS após irradiação em Tm1 pode ser neutralizada ou diminuída e associar esses eventos com morte ou sobrevivência induzida por ROS. Outra

abordagem interessante seria determinar se a geração de ROS nestas células é dose-dependente quando irradiadas com UVB.

4.7 Detecção e quantificação de vacúolos acídicos após exposição à luz UVB e estudo de proteínas associadas à autofagia

Ao longo da progressão as células tumorais são capazes de ativar diferentes mecanismos de sobrevivência. Um processo amplamente estudado nos últimos anos e de grande destaque na biologia tumoral é a autofagia.

O estresse genotóxico induzido por UV, assim como outros sinais pró-apoptóticos como o estresse oxidativo, podem induzir autofagia, processo catabólico de degradação lisossomal (Kiffin *et al*, 2006; Lee *et al*, 2012). Este processo é fundamental para manter a homeostase celular e remover proteínas mal enoveladas, organelas e outras moléculas danificadas (Marino, *et al* 2012). A autofagia possui um papel complexo no desenvolvimento e na progressão tumoral. Inicialmente a autofagia foi descrita como um mecanismo de morte celular (Tsujimoto *et al*, 2005; Kroemer *et al*,2008), mas recentemente, vários autores demonstraram que a autofagia também funciona como um processo citoprotetor.

Com o objetivo de verificar se a luz UVB era capaz de induzir autofagia no nosso modelo realizamos a detecção e quantificação do conteúdo de vacúolos acídicos após irradiação pela marcação com laranja de acridina e análise por citometria de fluxo. A Figura 10 mostra que a luz UVB é uma potente indutora de vacúolos acídicos produzindo o aumento destes, quando comparado com o grupo controle. As duas linhagens mostraram um aumento no número de vacúolos acídicos após irradiação, sendo este maior em Tm1. A

identificação da geração de vacúolos acídicos com laranja de acridina após a exposição à UVB sugere que o evento autofágico pode estar ativado em resposta ao dano induzido por UVB. Como apresentado na introdução, a atividade autofágica é importante para controlar o dano oxidativo, sendo também sensível à regulação redox (Dodson *et al*, 2013). Portanto, o aumento observado no número de vacúolos pode estar associado com o aumento nos níveis de ROS, previamente analisados. Ao mesmo tempo o grande aumento de vacúolos observado em Tm1 pode ser um mecanismo de sobrevivência apresentado por esta linhagem, pois Tm1 não mostrou altas porcentagens de morte celular após UVB, quando marcado com iodeto de propídeo (Figura 1). Em melan-a também foi evidenciada a presença de vacúolos, mas a porcentagem foi menor tanto no controle quanto na condição exposta a UVB. Este dado sugere que se o processo de autofagia em resposta à UVB desempenha função de sobrevivência, esta é induzida em melan-a em menor intensidade que em TM1, favorecendo a sensibilidade desta linhagem à morte induzida frente ao dano gerado por UVB.

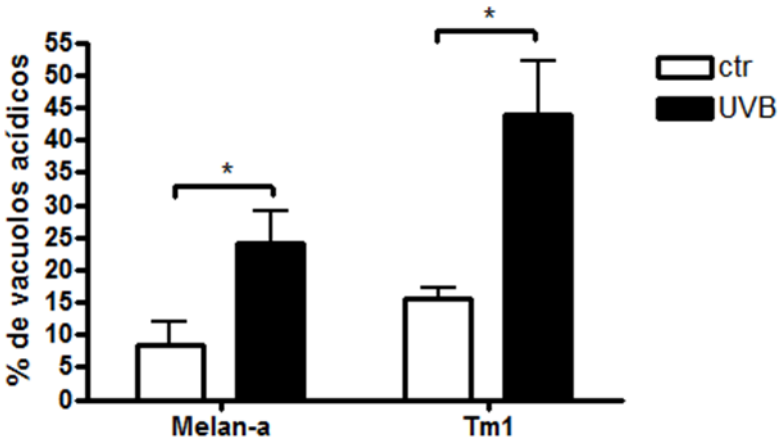


Figura 10- Acúmulo de vacúolos acídicos em resposta à irradiação com UVB. Identificação e quantificação da porcentagem de vacúolos acídicos, através de marcação com laranja de acridina, em células irradiadas, ou não, com luz UVB (6,6mJ/cm^2). *Two-Way ANOVA*, Legenda: * $p<0,05$.

A resposta diferencial entre melan-a e TM1 pode ser resultado do *background* destas células, tumorigênica e não tumoral. Tm1 é uma linhagem tumoral e em resposta ao dano associado à UVB pode ativar vias e processos que favoreçam a sobrevivência celular enquanto em melan-a a autofagia pode ser uma resposta para induzir morte celular de células danificadas por esta irradiação. Outra possibilidade é que melan-a aumente o número de vacúolos em menor intensidade que em Tm1 com o objetivo de renovar moléculas e estruturas celulares para evitar a proliferação de células lesadas.

A avaliação inicial de autofagia através da marcação com laranja de acridina sugeriu o envolvimento deste processo no perfil diferencial de melan-a e TM1 à UVB. No entanto, sabe-se que laranja de acridina não é um marcador específico de autofagia, pois este é um marcador lisotrópico que apresenta afinidade com organelas acídicas, onde é protonado formando agregados e emitindo fluorescência vermelha. Desta forma, laranja de acridina é um marcador de vacúolos autofágicos tardios (fusionados com lisossomos), e que pode marcar outros compartimentos acídicos como lisossomos. Portanto, também foi verificada a expressão de beclina-1 após tratamento com UVB. beclina-1 é uma proteína envolvida no processo autofágico que se associa com fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) de tipo III para iniciar a formação do autofagosoma. No caso da linhagem Tm1 observou-se um acúmulo dos níveis de beclina-1 24 horas após de irradiação, enquanto em melan-a foi observada uma discreta diminuição da expressão desta proteína (Figura 11). Este resultado se correlaciona com os dados obtidos na citometria com laranja de acridina (Figura 10), sugerindo que a autofagia é induzida emTm1 em maior intensidade que em melan-a em resposta à irradiação UVB.

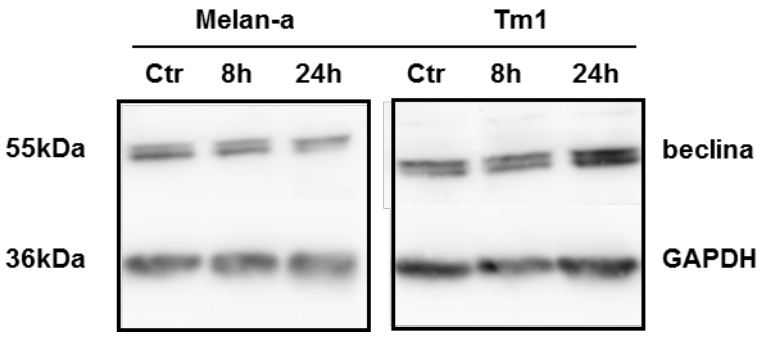


Figura 11 – **Aumento da expressão de beclina-1 em resposta à UVB em TM1.** Detecção de beclina-1 em extratos proteicos de melan-a e de Tm1, mostrando o acúmulo de beclina-1 em Tm1. GAPDH como controle de carregamento. Ctr: controle. 8h, 24h: horas após irradiação UVB (6,6mJ/cm^2). Foram aplicados 30μg de proteína em cada poço.

4.8 A detecção e quantificação do conteúdo lissosomal mostrou maior atividade de degradação na linhagem Tm1

Depois de observar que a luz UVB induz autofagia em melan-a e Tm1 e demonstrar que beclina-1 aumenta 24 horas após UVB em Tm1, resolvemos estabelecer qual era o grau de degradação nestas linhagens.

A autofagia segue uma série específica de eventos. Basicamente, a autofagia se inicia pela formação do fagoforo o qual sofre elongação para engolfar porções de citoplasma contendo o material a degradar. Depois de engolfar todo o material o fagoforo é fechado e o autofagossomo é formado. A autofagia culmina com a fusão do autofagossomo e o lisossomo dando origem ao autofagolisossomo, local onde o material é finalmente degradado pelas hidrolases lisosssomais (Dodson *et al*, 2013).

O *lisotracker® green* é um marcador acidotrópico seletivo utilizado como indicador de organelas acídicas, sugerindo atividade lisossomal. Através da análise por citometria e a marcação com *listotracker* demostramos que o

conteúdo de estruturas acídicas na linhagem Tm1 aumenta em grande magnitude quando expostas a UVB (Figura 12). Diferente do observado em Tm1, não houve aumento na detecção do *lisotracker* em melan-a sugerindo que a atividade degradativa nesta linhagem é baixa ou que o processo transcorre em tempos diferentes aos de Tm1. A autofagia culmina com a degradação do material no lisossomo; talvez os tempos de estudo (6 horas, não mostrado, e 24 horas) não foram os adequados para evidenciar o aumento de tais estruturas acídicas em melan-a. O resultado obtido em Tm1 coincide com o observado na detecção de vacúolos autofágicos sugerindo que esta linhagem é ativa na degradação do material celular seguido da exposição à luz UVB. Isto é um indício de que, possivelmente, Tm1 é capaz de renovar as estruturas celulares ou moléculas após o dano induzido pela UVB no intuito de sustentar a sobrevivência das células. Novamente, podemos notar uma resposta diferente entre melan-a e Tm1 mostrando que o background da célula tumoral torna-a mais resistente aos efeitos danosos da UVB. Ainda, não é possível determinar se a presença/ausência de galectina-3 é importante na modulação destes processos.

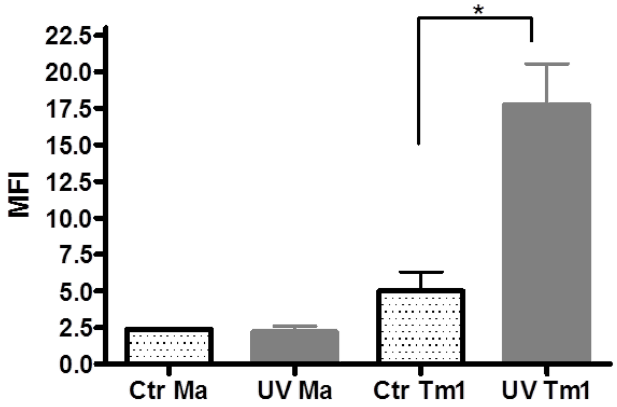


Figura 12- **TM1 acúmula estruturas acídicas em resposta à UVB.** Avaliação do conteúdo de estruturas acídicas através do marcador *lisotracker® green*. Observe-se o acúmulo de estruturas acídicas em Tm1 após da irradiação Leganda: ctr (controle não irradiado); UV (células irradiadas com UVB (6,6mJ/cm^2); *p<0,01. MFI (índice médio de fluorescência).Ensaio representativo n=3.

4.9 Avaliação do efeito do inibidor LY290042 no ciclo celular e no processo autofágico da linhagem Tm1

O LY2090042 atua como um inibidor da autofagia através da inibição de fosfatidil inositol-3 quinase (PI3K), molécula envolvida nas etapas iniciais da autofagia e uma molécula central na regulação da proliferação celular, viabilidade e senescência (Hu *et al*, 2000). Como a linhagem Tm1 mostrou uma maior atividade autofágica e degradativa utilizamos esta estratégia para analisar qual era a resposta de Tm1 frente à inibição da autofagia na tentativa de confirmar o papel deste processo em Tm1.

Inicialmente, foi realizada a inibição com LY290042 seguido da irradiação com UVB e a análise foi realizada 2,6 e 24 horas após irradiação. Não foram evidenciadas diferenças 2 e 6 horas após irradiação, mas após 24 horas observamos que o ciclo celular de Tm1 foi alterado. Em ausência do

inibidor, 24 horas após irradiação notamos que Tm1 sofre uma queda no índice G0G1/SG2M enquanto, na presença do inibidor as células aumentaram este índice. Ao observar as células em repouso mais a adição do LY290042, notamos um grande aumento na quantidade de células em fase G0G1 sugerindo parada do ciclo celular nesta fase. Ao comparar os dados de 2 horas com os das 24 horas notamos que existe uma tendência diferente no índice G0G1/SG2M, caracterizado pela redução da razão nos controles e o aumento da mesma nos grupos irradiados (Figura 13 A). Anteriormente, mostramos que células Tm1 não irradiadas possuem níveis basais de autofagia (Figura12). No gráfico de ciclo celular observamos que o LY290042 induz uma importante parada do ciclo em G0G1 no grupo controle de Tm1 após 24 horas de inibição, sugerindo que o inibidor diminuiu autofagia e, portanto as células param em G0G1 no intuito de reparar ou repor essas moléculas que seriam degradadas. No entanto, é importante considerar que a inibição da via de PI3K, e não a inibição de autofagia mediada por esta via pode alterar a progressão do ciclo celular. Casagrande e colaboradores (1998) demonstraram que LY290042 pode induzir parada em G1 produzindo quase a completa inibição da proliferação em células de melanoma. Este e outros trabalhos que demonstram a indução de apoptoses seguida da utilização de inibidores autofágicos suportam a idéia de autofagia atuando como um processo citoprotetor e sugere que os dados obtidos no ensaio anterior podem ser resultado do efeito da indução de morte após inibição deste processo (Boya *et al*, 2004 para revisão). Na análise de porcentagem de células hipodiplóides, Figura 13 B, observamos que em Tm1 o inibidor não teve efeito sobre a indução de morte celular. Com o objetivo de verificar se de fato o inibidor estava funcionado avaliamos o

conteúdo de vacúolos após inibição e irradiação. A Figura14 mostra que de fato o LY290042 inibe autofagia, mas o bloqueio não foi completo com a concentração de 20µM utilizada. Outras concentrações foram testadas sem ter sucesso absoluto na inibição da autofagia. Outra abordagem específica para determinar atividade autofágica e estabelecer se existe inibição da autofagia seria monitorar a abundância de LC3-II. Após o estímulo autofágico LC3 conjuga-se com fosfatidiletanolamina (LC3-II) e é translocado desde o citoplasma ou o núcleo para a membrana do autofagossomo (Krebiehl *et al*, 2010). Portanto, a utilização desta ferramenta permite monitorar o processo da formação do autofagossomo até a degradação lisossomal.

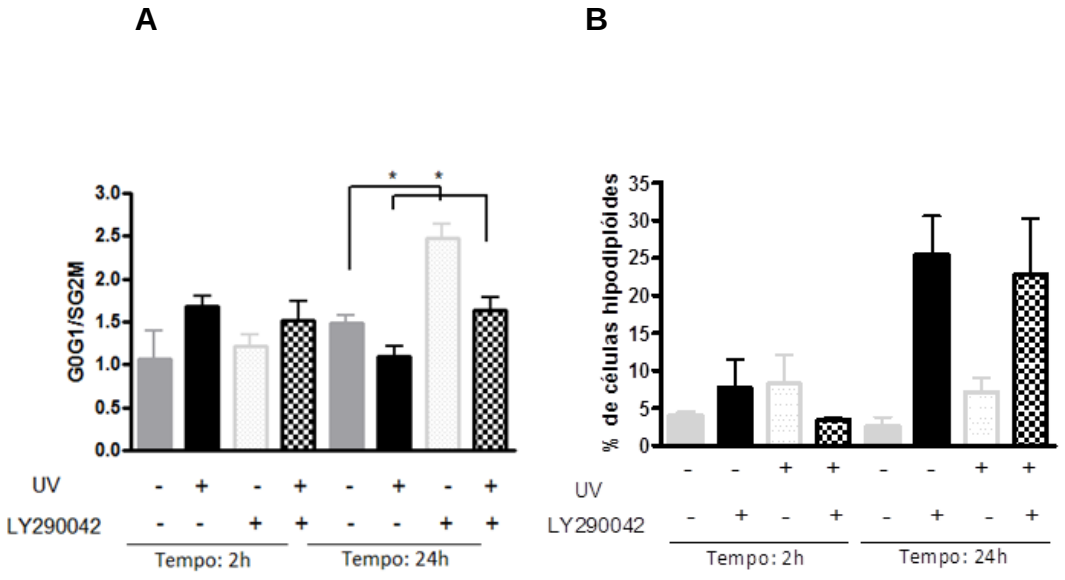


Figura 13 – **Alteração do ciclo celular após inibição da autofagia em Tm1.** A: análise do ciclo celular em Tm1 após 2 e 24 horas de irradiação. B: análise da população hipodiplóide em Tm1. Legenda: Ctr: grupo não irradiado. LY: LY209942, 20µM. *p<0,05. UVB (6,6mJ/cm^2). Experimento representativo n=3.

Devido ao fato da inibição da autofagia ter sido baixa, pode ser que os resultados observados nas análises anteriores não sejam totalmente

informativos. Com o objetivo de melhorar o estudo foi utilizado outro inibidor, a 3-metiladenina (age de modo similar a LY290042 inibindo PI3K), mas os resultados não foram claros (dados não mostrados). Para dar uma resposta exata sobre o papel da autofagia em Tm1 é necessário utilizar outros inibidores ou a combinação deles, por exemplo, a cloroquina, um agente lisossomotrópico capaz de inibir as enzimas lisossomais e a fusão do autofagossomo.

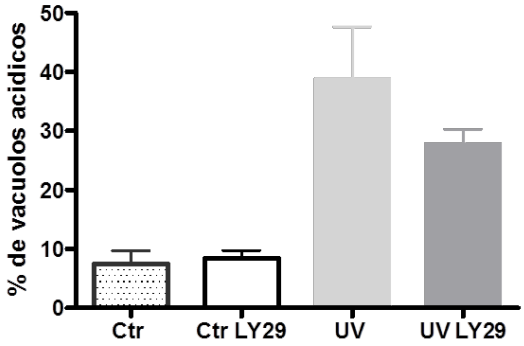


Figura 14 – O inibidor LY290042 não bloqueia efetivamente o processo autofágico em Tm1 24 horas após irradiação. Avaliação da ação do inibidor LY290042 através de citometria de fluxo e laranja de acridina. Não observamos diferenças significativas na porcentagem de vacúolos acídicos em Tm1 após 24 h do tratamento. Legenda: Ctr: grupo não irradiado. LY: LY209942, 20µM. *p<0,05.UVB (6,6mJ/cm^2). Experimento representativo n=3

4.10 Avaliação da massa mitocondrial e determinação do número de cópias de mtDNA

Como nas micrografias da figura 7 observamos que a presença de Gal-3 na mitocôndria parecia diminuir 24 horas após irradiação, mas não possuímos a quantificação desses parâmetros, resolvemos avaliar se a luz UVB estimulava a mitocondriogênese. Para tal, determinamos o número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) e o conteúdo da massa mitocondrial utilizando *Mitotracker Green* o qual se torna fluorescente no ambiente lipídico

mitocondrial se ligando especificamente a cardiolipina, independente do potencial de membrana.

Na figura 15 observamos que em ambas as linhagens a luz UVB causou aumento do conteúdo mitocondrial 24 horas após irradiação. O dado é representado como massa mitocondrial devido a que não é possível determinar o número exato de mitocôndrias, pois as mitocôndrias são organelas dinâmicas que sofrem fissão e fusão o que dificulta a correlação da fluorescência com o número de mitocôndrias. É mais correto usar massa mitocondrial como parâmetro devido a que mitocôndrias fusionadas podem aumentar a área captando maior fluorescência, mesmo se apresentando como apenas uma mitocôndria. A massa mitocondrial no grupo controle, em repouso, de Tm1 foi maior do que o observado na linhagem melan-a. No entanto, o aumento do conteúdo mitocondrial após UVB foi parecido em ambas às linhagens. O conteúdo de massa mitocondrial foi também analisado a poucas horas da irradiação, mas não fomos capazes de detectar diferenças através da citometria com Mitotracker, (dados não mostrados). Portanto, a avaliação da massa mitocondrial sugere que a UVB induz mitocondriogênese em melan-a e Tm1 24 horas após irradiação.

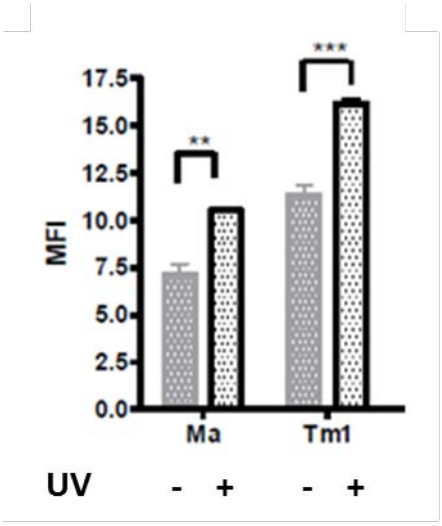


Figura 15- **Aumento do conteúdo mitocondrial após UVB.** Análise da massa mitocondrial após 24 horas de irradiação mostrando o aumento de esta organela depois do tratamento com luz UVB. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando-se o método *Two-Way ANOVA*, Legenda: ***p<0,01; ** p<0,05. MFI (índice médio de fluorescência). UVB (6,6mJ/cm^2).

Depois de observar que a luz UVB é capaz de induzir aumento da massa mitocondrial e sabendo que a biogênese mitocondrial pode ser ativada rapidamente após um estímulo ou em resposta a estresse celular decidimos verificar se de fato a luz UVB estava envolvida na alteração da biogênese mitocondrial através da quantificação do número de cópias de DNA mitocondrial (Gasparre *et al*, 2008). O número relativo de cópias de DNA mitocondrial foi analisado após 3 e 24 horas de irradiação. A Figura 16 mostra que a luz UVB atua como indutora da biogênese mitocondrial através do aumento do número de cópias de mtDNA na linhagem melan-a após 24 horas de irradiação. Estes dados sugerem dois possíveis cenários, um onde o número de mitocôndrias de melan-a é aumentado com o objetivo de montar a maquinaria necessária para induzir morte celular após o estímulo gerado pela luz UVB e, o outro para compensar o dano induzido por UVB no DNA

mitocondrial, associado com a resposta adaptativa à depleção da fosforilação oxidativa (Chatterjee *et al*, 2011).

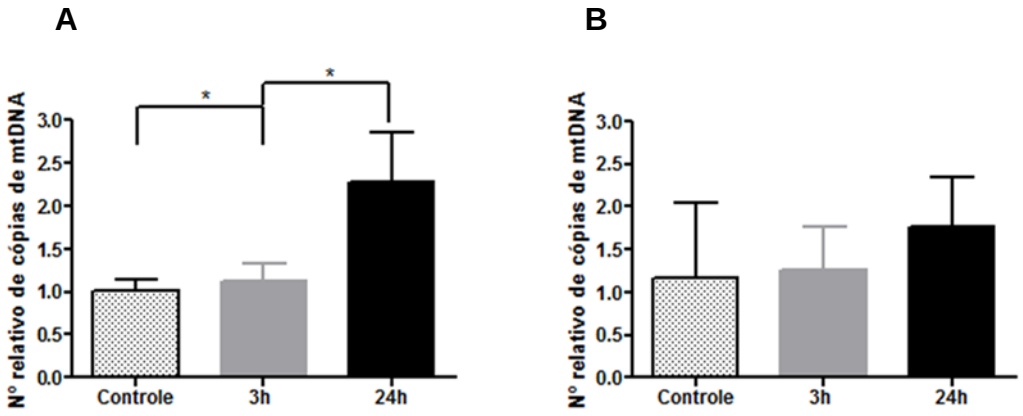


Figura 16 – Aumento do número de cópias de mtDNA em melan-a, 24 horas após irradiação com UVB. Determinação do número de cópias de DNA mitocondrial através de PCR em tempo real. (A) Melan-a (B) Tm1 controle, não irradiada, e 3 e 24 horas após irradiação. Número relativo de cópias: mtDNA/nuclearDNA. UVB (6,6mJ/cm^2);*

A mitocôndria sofre alterações no DNA e mudanças no número de cópias segundo as condições fisiopatológicas, ambientais e a demanda energética (Li *et al*, 2013). Sabe-se que a função mitocondrial é fortemente associada com a quantidade de mtDNA e que altos níveis de ROS relacionam-se com o dano oxidativo do mtDNA e a consequente alteração no conteúdo de mtDNA (Higuchi, 2012, para revisão). Além disso, é comprovado que mutações no mtDNA são comuns em tumores e que o aumento no conteúdo de mtDNA é um evento regulador do câncer em resposta a estresse, associado com a iniciação e progressão de câncer (Feng *et al*, 2011). Para nosso conhecimento, é bem documentado que o conteúdo de DNA mitocondrial varia também segundo o tipo de câncer. Jiang e colaboradores (2006) mostraram um

aumento do mtDNA em câncer de cabeça e pescoço enquanto que em câncer de mama Singh (2009) evidenciou uma diminuição do conteúdo de mtDNA associado a mutações no D-loop, área não codificadora denominada também região controle, associada com a iniciação da replicação mitocondrial. Tal diminuição foi associada com o aumento no risco de desenvolver doença (Chatterjee *et al*, 2011). O dano no mtDNA e as mutações em determinadas regiões podem causar aumento de ROS e disfunção mitocondrial. No caso da linhagem melan-a observamos que o aumento da massa mitocondrial está correlacionado com o aumento no conteúdo de mtDNA. Contudo, os dados obtidos para melan-a sugerem que o aumento de massa mitocondrial nesta linhagem parece estar mais relacionado com ativação do processo de morte do que com uma resposta ao estresse seguida da adaptação celular à nova demanda energética e ao reparo do dano, com objetivo de aumentar as chances de sobrevivência (Lee & Wei, 2005). Enquanto ao aumento no número de cópias mtDNA em melan-a e, baseado nos dados da literatura podemos sugerir que esse aumento pode estar correlacionado com o aumento de ROS, e uma perda da função mitocondrial. É possível que o aumento observado não seja completamente funcional sendo uma resposta de compensação. No caso de Tm1 observamos aumento da massa mitocondrial, mas não encontramos diferenças no conteúdo de mtDNA o que sugere que talvez o dano no mtDNA induzido por ROS após UVB produza a entrada a ciclos de fusão e fissão. As mitocôndrias são organelas dinâmicas que em resposta a diversos estímulos, por exemplo, UVB, mudam a forma, o número, tamanho e a distribuição. Portanto, a resposta observada em Tm1 pode ser produto da iniciação de ciclos de fissão e fusão com o objetivo de redistribuir proteínas e proteger as

células dos efeitos deletérios de mutações no mtDNA. Os níveis de ROS em Tm1 foram maiores do que em melan-a, talvez a grande quantidade de estresse oxidativo agrave o dano mitocondrial induzido por UVB o que leva a entrada a ciclos de fissão e fusão acompanhado da degradação ou manutenção de cópias de mtDNA. Por outro lado, quando as mitocôndrias iniciam a fissão e fusão elas encontram-se em dois estados possíveis, um onde estão agrupadas e outro no qual se observam mitocôndrias isoladas. Quando a mitocôndria está danificada as mesmas são dispostas em um padrão isolado o qual é associado com a degradação seletiva da mitocôndria (mitofagia) (Li *et al*, 2013). Este fato correlaciona-se com o resultado de autofagia em Tm1 no qual evidenciamos um maior aumento na quantidade de vacúolos após UVB. Este fenômeno sugere que o aumento da massa mitocondrial pode ser um evento prévio ao processo de autofagia de mitocôndrias danificadas e um promotor da sobrevivência celular. Em Tm1 observamos que o índice de mtDNA/nuclearDNA não foi em paralelo com o aumento da massa mitocondrial, mas existem estudos que mostram resultados contrastantes entre o número de cópias e aumento da massa mitocondrial (Apostalova *et al*, 2010, para revisão). Isso pode indicar que o aumento da biogênese pode não ser a causa primária do acúmulo mitocondrial. Por outro lado, sabe-se que cada mitocôndria possui de 2-10 copias de mtDNA o qual é replicado ao longo do ciclo celular. A replicação pode acontecer independente do crescimento e da divisão desta organela, portanto, a replicação pode não ser acoplada com o processo de proliferação mitocondrial (Li & Wei, 2004).

Para interpretar melhor esses dados seria preciso realizar ensaios que avaliem a função mitocondrial destas linhagens após UVB.

4.11 O estudo da ativação de vias de sinal ativadas pelo estresse demonstrou a ativação de JNK em Tm1

Após a realização dos ensaios utilizados para examinar os efeitos da UVB e caracterizar a presença de Gal-3 em nossas linhagens, fomos investigar se à luz UVB poderia ativar a via de proteínas ativadas por estresse (SAPK). Como existe relação entre a irradiação UVB e a ativação destas quinases, moléculas envolvidas na carcinogênese e capazes de controlar a progressão do ciclo celular em melanoma (Alexaki *et al*, 2008), avaliamos o perfil de ativação destas moléculas em melan-a e Tm1. A radiação pode iniciar interações moleculares e induzir respostas UV-dependentes como a ativação/supressão de vias de sinalização. Portanto, o estímulo carcinogênico da UV pode transformar melanócitos em melanomas e favorecer a progressão tumoral (Muthusamy & Piva, 2013) através da ação de vias como, por exemplo, JNK e p38 (Zhang & Selim, 2012). Uma vez que as SAPK possuem um papel na biologia do melanoma e que Gal-3 parece regular a expressão de JNK, realizamos ensaios de western blot para estudar a ativação destas vias após irradiação.

A regulação destas proteínas é rápida, pois na Figura 16 podemos observar a ativação de p38 e de JNK em curtos períodos de tempo após irradiação com UVB. No caso de p38 notamos a marcação de duas bandas indicando duas isoformas de p38. A ativação desta molécula foi mínima, sendo mais notável em Tm1 15 minutos após irradiação. O mesmo acontece no caso de JNK, melan-a não mostrou ativação de JNK em nenhum dos tempos, mas a fosforilação de JNK na linhagem Tm1 é bem evidente após 15 minutos de irradiação.

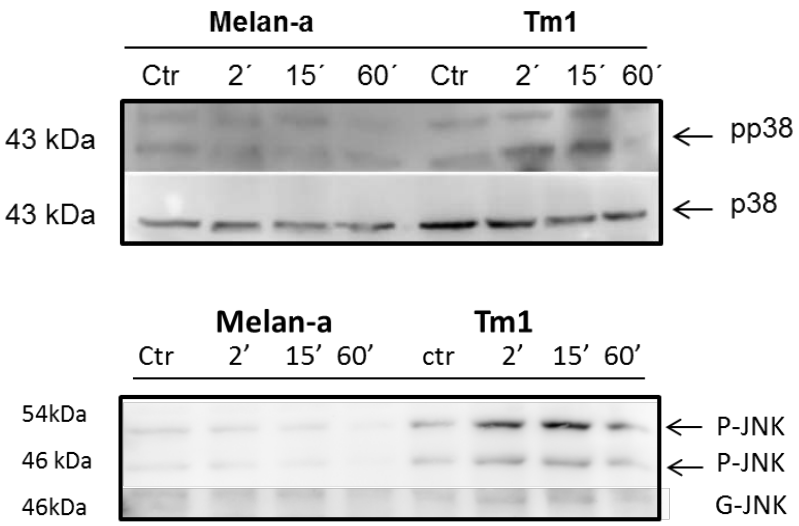


Figura 17 – **Ativação de p38 e JNK em melan-a e Tm1**. Avaliação da ativação da via de p38 e de JNK em melan-a e Tm1 2, 15 e 60 segundos após irradiação. UVB: 6,6mJ/cm^2. As duas bandas observadas em ambas às proteínas indica outras isoformas. Legenda: P-JNK ou PP38: fosforilado. G-JNK: JNK total.

Através da detecção destas proteínas observamos que a célula tumoral, Tm1, é capaz de ativar a via de JNK, mas em melan-a esta via não foi induzida em resposta à UVB.

Como mencionado, Gal-3 é uma proteína multifuncional com capacidade de interagir com diversas moléculas. Dados da literatura mostraram que camundongos gal-3 -/- (*Knockout*) apresentam diminuição dos níveis proteicos e do mRNA de JNK sugerindo que há o envolvimento de Gal-3 na regulação de JNK quinase (Chen *et al*, 2006). Como observamos ativação de JNK após UVB e sabendo que ao contrário de Tm1, melan-a expressa galectina-3, investigamos se Gal-3 poderia estar implicada na regulação de JNK através da interação física com essa molécula após irradiação. A partir de ensaios de imunoprecipitação pudemos observar que galectina-3 interage com

JNK em células melan-a, tanto no controle quanto nas células 60 minutos após serem irradiadas com UVB. Embora tenhamos observado interação entre Gal-3 e JNK, esta interação não parece ser suficiente para ativar JNK, pois, como demonstrado anteriormente, não há acúmulo desta proteína em resposta à UVB na linhagem melan-a (Figura 17). Talvez a presença de galectina-3 em nosso modelo possa estar regulando negativamente a ativação de JNK impedindo a translocação da molécula ou a interação com outros componentes.

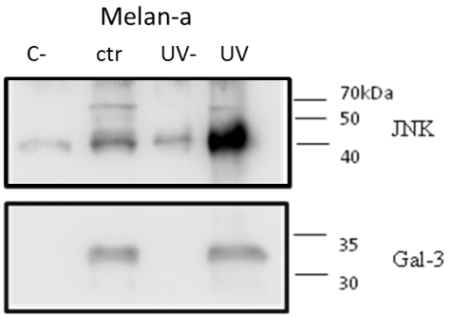


Figura 18- Interação física entre Gal-3 e JNK em melan-a. Imunoprecipitação de galectina-3. As amostras foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 18% e as membranas foram incubadas separadamente com anti-Gal-3 e anti-gJNK. Legenda: C- (controle da reação, não irradiado) e UV-: 1 hora após Irradiação com UVB (6,6mJ/cm^2).

4.12 A análise da distribuição de JNK foi diferente entre Tm1 e melan-a após irradiação

Como observamos ativação de JNK em Tm1, investigamos o papel desta proteína no nosso modelo. Alguns estudos mostram que JNK é translocada ao núcleo após estimulação. Porém, outros dados mostram que JNK pode estar no núcleo de células controle e após o estímulo ser exportadas fora do núcleo (Zehoari & Seger, 2013). Realizamos ensaios de imunoflorescência e nas imagens marcadas para gJNK (total) pudemos

observar que tanto em melan-a como em Tm1 a distribuição de JNK é principalmente no núcleo das células, em células não irradiadas (Figura 19 A e B). Após irradiação a marcação de gJNK foi menos intensa (Figura 19 A e B). No entanto, ao compararmos a marcação para pJNK entre as linhagens, observamos uma localização diferencial desta proteína entre melan-a e Tm1 25 e 60 minutos após irradiação com UVB. Em melan-a a ativação de JNK é baixa, pois a marcação foi fraca tanto na célula controle como após UVB (Figura 19A). Além disso, a localização de pJNK foi observada no núcleo e no citoplasma, mas em menor quantidade que em Tm1. Já em Tm1 observamos uma marcação nuclear de pJNK em células controle sendo modificada para uma localização citoplasmática 1 hora após UVB (Figura 19 B e 20). Nas células Tm1 irradiadas a marcação foi clara e evidenciada tanto no núcleo como no citoplasma e em algumas ocasiões esta molécula colocalizou com mitocôndria (Figura 20).

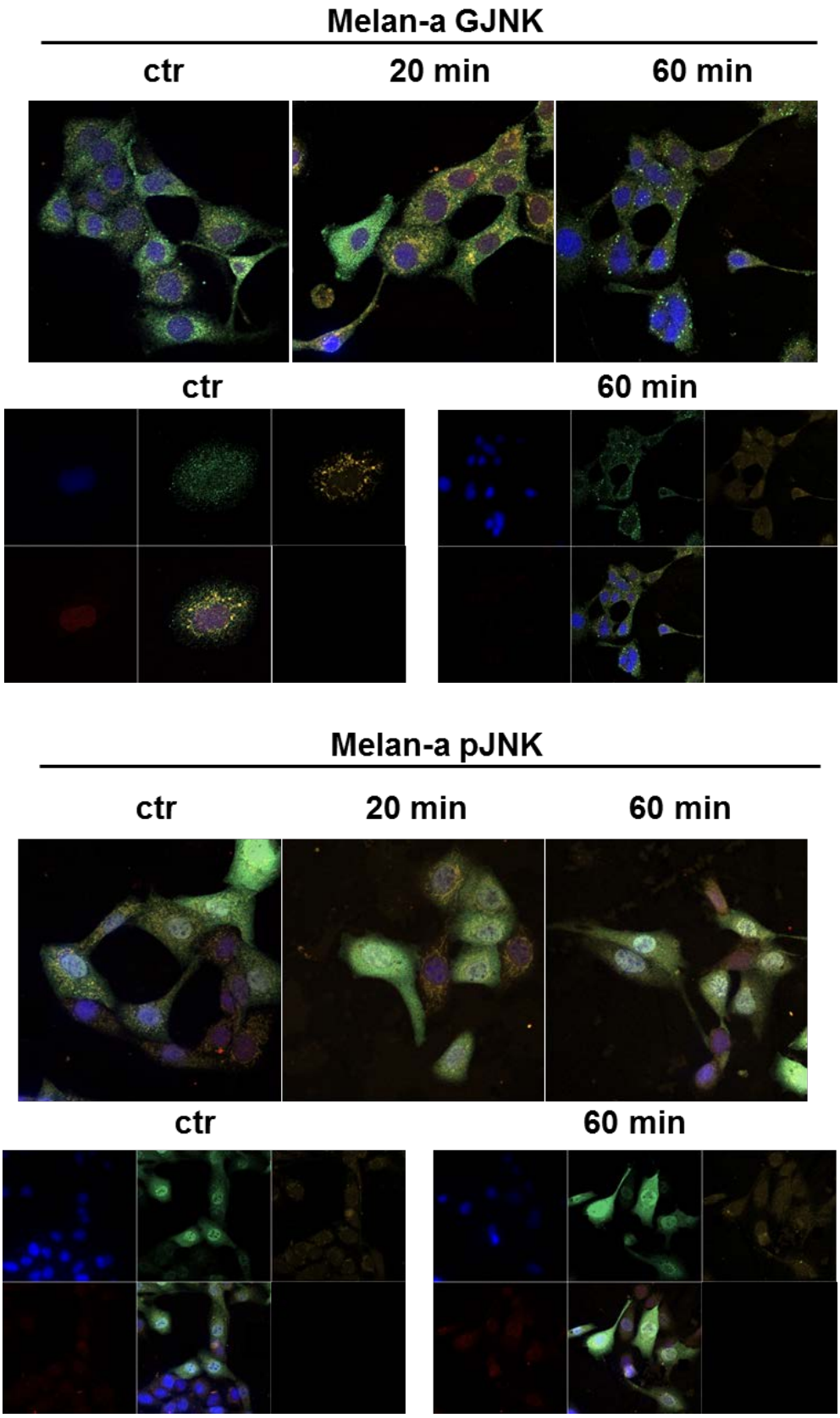


Figura18 – **Localização de gJNK e pJNK em melan-a**. A: gJNK. B: pJNK. ctr: controle e 20 e 60 minutos após UVB. Verde: Gal-3. Laranja: mitocôndria. Vermelho: JNK. Azul: DAPI. Embaixo de cada painel encontram-se imagens sem a sobreposição. Aumento: 400X.

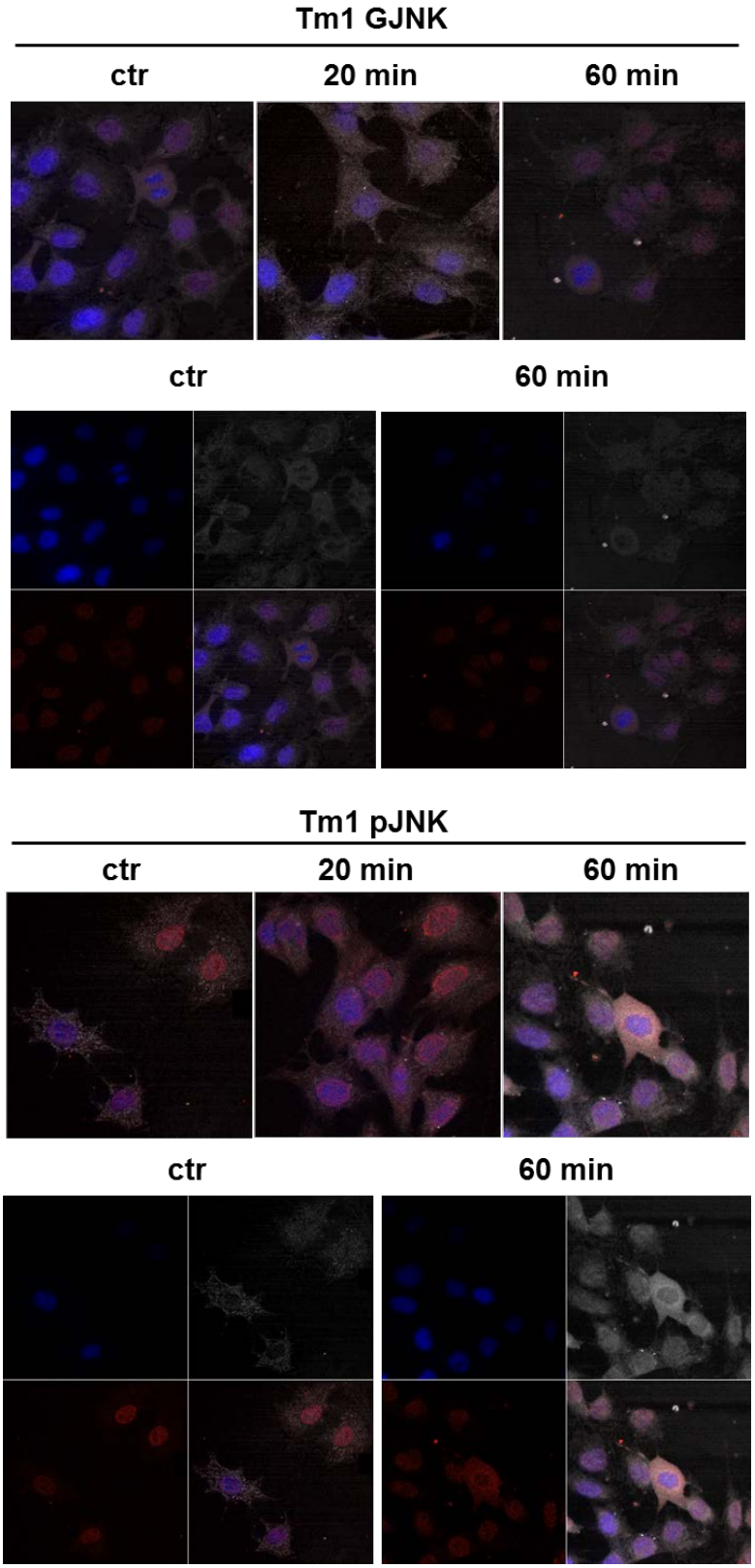


Figura19 – Localização de gJNK e pJNK em Tm1 após UVB. A: gJNK. B: pJNK. ctr: controle e 20 e 60 minutos após UVB. Branco: mitocôndria. Vermelho: JNK. Azul: DAPI. Embaixo de cada painel encontram-se imagens sem a sobreposição para observar em detalhe cada um dos marcadores. Aumento: 400X.

A translocação mitocondrial de JNK tem sido descrita em vários modelos, por exemplo, em resposta a dano no DNA. A luz UVB gera dano no DNA e pode induzir ROS. Além disso, JNK pode ser ativado por ROS e, ao mesmo tempo contribuir na geração de espécies reativas de oxigênio. Esta informação coincide com os resultados obtidos em Tm1, onde a luz UVB induz ROS e ativa a via de JNK seguida da translocação mitocondrial. Na literatura, a translocação mitocondrial de JNK em células estressadas é exibida como um evento crucial na sinalização de morte celular, mas este não parece ser a resposta para Tm1. Como não houve altos índices de morte celular em Tm1 após UVB, a translocação observada nesta linhagem parece estar associada a eventos de sobrevivência. Para nosso conhecimento, o estado pró-oxidativo, o estresse celular e a sinalização de mitoJNK podem contribuir para o processo de morte celular ou para alterações metabólicas que podem ser essenciais para a sobrevivência celular (Chambers & LoGrasso, 2011). Portanto, a translocação de JNK em Tm1 pode ser interpretada como um evento que favorece a sobrevivência celular. Outra possibilidade, relacionada com o fato de que só algumas células mostraram colocalização, é que a presença de JKN na mitocôndria induza morte, mas apenas em uma pequena proporção das células não sendo facilmente evidenciado pelo ensaio de hipodiploidia celular avaliado por incorporação de iodeto de propídeo.

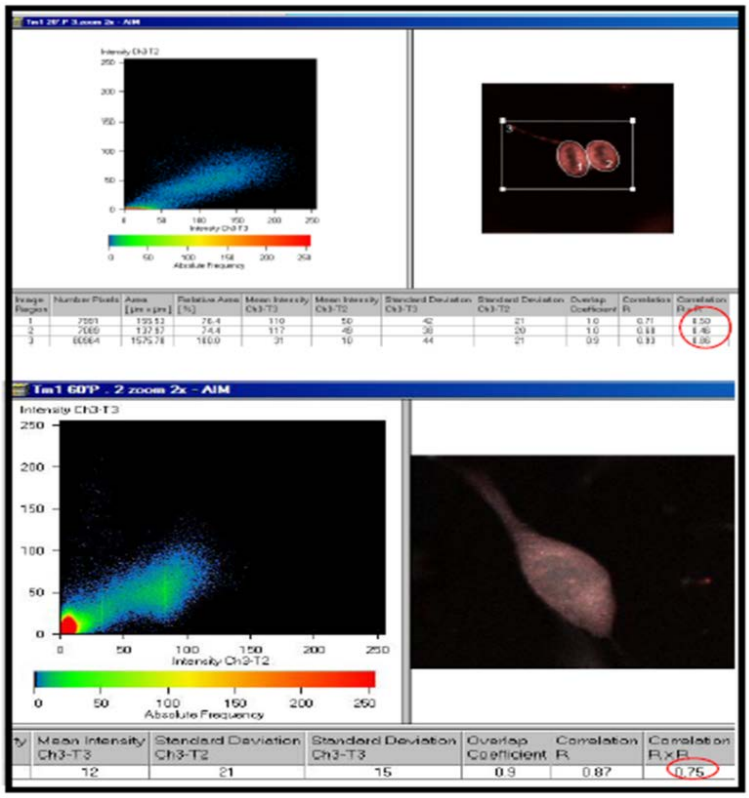


Figura 20 – **Colocalização de pJNK com mitocôndria em Tm1 60 minutos após de irradiação**. As análises foram realizadas com o software LSM Image. Observe-se o coeficiente de correlação (R) na parte inferior da tabela, em vermelho.

4.13 O tratamento com o inibidor de JNK SP600125 demonstrou um papel importante de JNK no ciclo celular e no processo autofágico de melan-a e Tm1

Como houve ativação e alterações na localização de JNK testamos um inibidor seletivo de JNK com o objetivo de determinar qual era a função desta proteína neste contexto e avaliar a relação com galectina-3.

No ensaio foram utilizados 20µM do inibidor SP600125 e após inibição as células foram irradiadas e marcadas com iodeto de propídeo. Na análise do ciclo celular observamos que o tratamento com SP600125 induziu uma intensa parada do ciclo celular na fase SG2M de melan-a e Tm1. Interessantemente,

células Tm1 tratadas com a combinação SP600125+UVB mostraram diferenças significativas comparadas com o grupo UVB, enquanto que em melan-a não houve diferenças no ciclo nas condições após irradiação + inibidor (Figura 21).

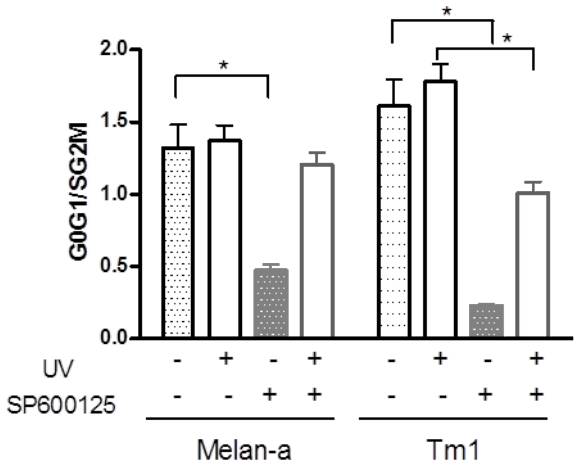


Figura 21 – A inibição de JNK induziu parada do ciclo na fase SG2M. Análise do ciclo celular em melan-a e Tm1 24 horas após o tratamento combinado UVB+SP600125. A parada de ciclo na fase SG2M foi evidenciada em ambas as linhagens. SP600125 inibidor de JNK. *ANOVA* *p<0,001. Experimento representativo n=3.

Em seguida, avaliamos a população hipodiplóide após o tratamento e notamos que a presença do inibidor aumenta a porcentagem de células hipodiplóides em melan-a. Em Tm1 esse aumento foi visualizado apenas nos grupos irradiados (Figura 22). A diferença entre ser ou não ser tumorigênica desencadeia uma resposta diferente, sendo melan-a mais sensível do que Tm1 (Figura 1). O aumento de células hipodiplóides no controle tratado com SP600125 em melan-a, ao contrário do observado em Tm1, indica que a inibição de JNK é um elemento importante para a manutenção de melan-a (Figura 22). Ao mesmo tempo, este resultado sugere que a linhagem

tumorigênica Tm1 possui mecanismos compensatórios que favorecem a sobrevivência das células frente determinadas condições como a inibição de JNK. Entretanto, a indução de dano genotóxico por UVB levou a um aumento na porcentagem de células. O aumento de morte celular induzido pelo inibidor sugere que JNK está envolvida na sobrevivência celular de melan-a e Tm1 após irradiação UVB.

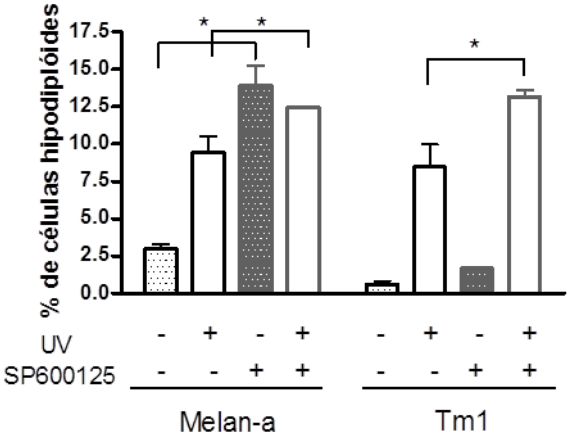


Figura 22 – A inibição de JNK induziu morte celular em melan-a e sensibilizou Tm1 à UVB. Avaliação de morte celular em melan-a e Tm1 24 horas após tratamento com o inibidor e UVB. Observe-se o aumento de células hipodiplóides em melan-a e Tm1. *ANOVA* *p<0,001. Experimento representativo n=3.

Nos últimos anos JNK tem sido envolvida com autofagia. Shimizu e colaboradores (2010) demonstraram que JNK é crucial para induzir morte por autofagia em células *knockout* para Bax/Bak. No entanto, recentemente foi demonstrado que indutores de autofagia aumentam a formação de LC3-II e a fosforilação de JNK favorecendo a sobrevivência celular. Assim, a inibição de JNK previne a formação de LC3-II e induz morte celular em células tratadas com um ativador de autofagia (Haberzettl & Hill, 2013). Portanto, a partir dos

resultados obtidos na análise de ciclo e de morte celular e, sabendo que JNK está envolvida na regulação da autofagia, verificamos qual era o efeito do inibidor SP600125 no processo autofágico em nossas linhagens. O ensaio mostrou que o inibidor SP600125 aumentou o conteúdo de vacúolos acídicos na linhagem Tm1 (Figura 23). Este resultado sugere que JNK modula negativamente a autofagia em Tm1. Nosso resultado coincide com o trabalho de Maben e colaboradores (2010, não publicado) que demonstraram que a inibição de JNK pelo SP600125 induziu morte celular em células de melanoma humano através da indução de autofagia. No caso de melan-a não foram observadas diferenças no conteúdo de vacúolos. Talvez o efeito do inibidor só seja visível em Tm1 devido ao fato de que os níveis de autofagia nesta linhagem são maiores do que os observados em melan-a. Correlacionando o resultado de morte celular com conteúdo de vacúolos em Tm1, podemos ressaltar que aparentemente o aumento da autofagia gerado pela inibição de JNK é importante na indução de morte. Portanto, este resultado sugere que a autofagia, nesse contexto, tem um papel pró-apoptótico. Como mencionado, JNK parece ter um efeito dual no processo autofágico, pois eventualmente, a menor indução de autofagia no grupo irradiado e sem a adição do inibidor pode ser produzida pela ativação de JNK, atuando como uma molécula de sobrevivência. Dados da literatura sugerem um mecanismo, ainda não esclarecido, pelo qual JNK muda desde uma função pró-autofágica/pró-sobrevivência para outra pró-apopótica/pró-morte dependendo da intensidade e cinética do sinal (Tournier, 2013, para revisão).

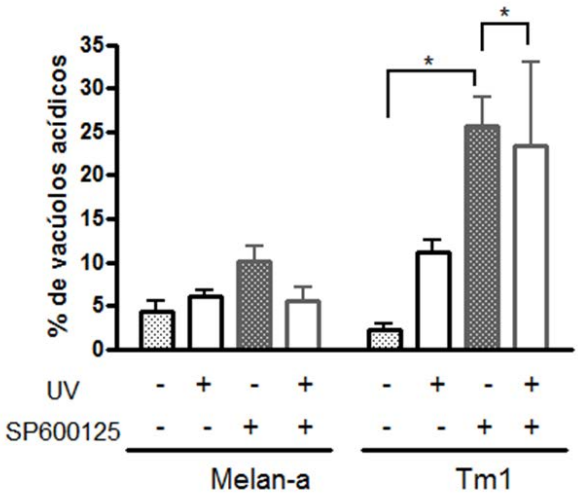


Figura 23 – **A inibição de JNK aumento o número de vacúolos acídicos em Tm1.** Análise do conteúdo de vacúolos acídicos 24 horas após tratamento com UVB e SP600125. *ANOVA* *p<0,001. Experimento representativo=3.

Para elucidar o mecanismo de ação de JNK são necessários novos experimentos. A utilização de peptídeos inibidores de JNK acompanhado de ensaios de proliferação e de *western blot* para proteínas específicas como, por exemplo, caspase-3, beclina-1, são uma ferramenta útil para identificar o papel de JNK como um regulador dos processos de morte, sobrevivência e autofagia. Entretanto, o bloqueio da translocação mitocondrial de JNK através da utilização de inibidores de Sab, proteína mitocondrial de união a JNK, é interessante para determinar se as respostas observadas estão associadas com a presença de JNK na mitocôndria (Chambers & LoGrasso, 2011). Embora observamos os efeitos associados à inibição de JNK através da utilização do SP600125, é necessário avaliar a efetividade desse inibidor na via de JNK. Avaliando a ativação de proteínas *downstream* de JNK, através de *western blot*, é possível estabelecer o grau de inibição exercido pelo SP600125 em nossas linhagens.

4.14 A inibição de galectina-3 em melan-a induziu morte celular após exposição à luz UVB

Depois de realizar e analisar os ensaios que caracterizam a resposta associada à UVB em nossas linhagens, avaliamos as diferenças observadas entre as células eram efeito do fenótipo (tumoral vs não tumoral) ou se estavam relacionadas com a presença/ausência de galectina-3. Como a expressão de galectina-3 está silenciada em Tm1, fomos verificar qual era o efeito da inibição desta proteína em melan-a com o objetivo de tentar estabelecer o papel de galectina-3 no nosso modelo.

A inibição foi realizada através de siRNA contra galectina-3 e os níveis proteicos de galectina-3 foram analisados por *western blot.* Ensaios de morte, ciclo celular, e detecção dos níveis de ROS foram efetuados na presença ou ausência do siRNA.

A Figura 24 mostra os níveis proteicos de galectina-3 após inibição com siRNA. A inibição com 100 pM foi eficiente e utilizada como padrão para os ensaios. A análise de ciclo celular após a inibição de galectina-3 e UVB não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Figura 25).

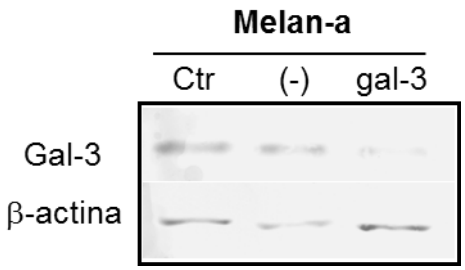


Figura 24 – Silenciamento de Gal-3 em melan-a através de siRNA. Observe-se na ultima canaleta a diminuição de galectina-3. Ctr: controle. (-): controle negativo ou *scramble*. Gal-3: siRNA contra gal-3. ß-actina foi utilizado como controle do carregamento.

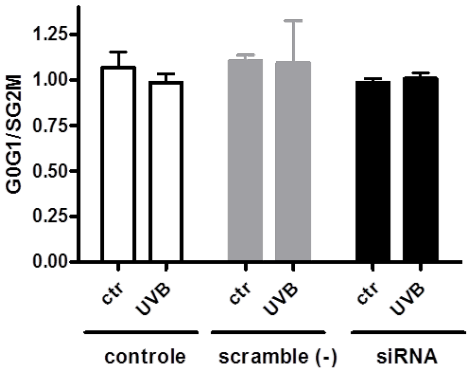


Figura 25 – O silenciamento de Gal-3 não modificou o perfil do ciclo celular em melan-a.O ensaio foi realizado 24 horas após UVB. G0G1/SG2M: Razão entre os valores em porcentagem das fases do ciclo celular. Não foram observadas diferenças significativas.Experimento representativo n=3.

Ao contrário do observado no ciclo celular, a análise da população hipodiplóide em melan-a mostrou diferenças entre os grupos. No grupo de células com siRNA contra galectina-3 e expostas a UVB observou-se um aumento da população hipodiplóide após 24 horas. Nos casos controle não foram observadas diferenças, mas existe uma pequeno aumento de células hipodiplóides no grupo siRNA gal-3 (Figura 26). Este resultado sugere que a ausência ou diminuição de galectina-3 em melan-a tem um efeito negativo sobre a sobrevivência celular após exposição a um agente genotóxico como a luz UVB. Ao mesmo tempo, sugere que a presença de galectina-3 em linhagens melanocíticas é necessária para contribuir para a sobrevivência celular frente a uma injúria. A perda de expressão de galectina-3 ao longo da progressão gerou a pergunta de se a metilação desta molécula poderia ser em parte, a responsável pelo fenótipo maligno de Tm1. Apesar do efeito 24 horas após irradiação com UVB ser muito distante do estresse induzido por ciclos de impedimento de ancoragem, a inibição de Gal-3 não agiu como protetora de

melan-a frente a esse estresse. Para verificar essa hipótese seria necessário transfectar Tm1 com galectina-3 murina e realizar os estudos que avaliem o perfil de resposta, comparado com Tm1.

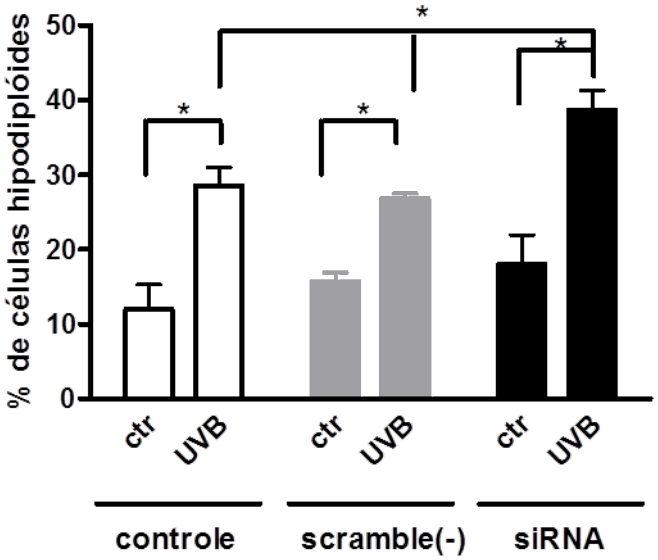


Figura 26 – O silenciamento de Gal-3 induziu morte celular após irradiação em melan-a Avaliação da população hipodiplóide após inibição e exposição a UVB (24 horas). Observe-se que os grupos controle irradiados com UVB mostraram um perfil diferente cuando comparado com o grupo siRNA gal-3. Ctr: células não irradiadas ; (-): controle negativo ou *scramble* ; siRNA gal3: *Knockdown* para gal-3.*p<0,05. Experimento representativo n=3.

A expressão de galectina-3 em melanomas tem sido extensamente pesquisada, mas poucos trabalhos focam os estudos em melanócitos ou nas etapas iniciais da carcinogênese. Em linhas gerais, a expressão de galectina-3 é correlacionada positivamente com o potencial metastático e a sobrevivência em melanomas (Braeuer *et al*, 2011). Este dado pode ser relacionado com o fato de que melanócitos expressando baixos níveis de galectina-3 favoreçam a indução de morte celular após injúria.

Novos estudos precisam ser efetuados para caracterizar a morte celular induzida em melan-a através da inibição de Gal-3. A análise detalhada

dos eventos celulares por citometria de fluxo com anexina e PI assim como o estudo da via de caspase ajudariam a determinar os mecanismos envolvidos.

4.15 A inibição de galectina-3 não modificou os níveis de produção de superóxido em melan-a

Como em melan-a houve aumento dos níveis de superóxido após UVB, realizamos a inibição de galectina-3 e fomos verificar se o *knockdown* de galectina-3 interferia na indução deste radical. Após irradiação realizamos o análise dos níveis de superóxido através de mitoSOX e evidenciamos que a inibição de galectina-3 não alterou a produção de superóxido 24 horas após exposição a UVB (Figura 27). Apenas observamos diferenças significativas entre os grupos controle e irradiados, mostrando indução de superóxido após UVB.

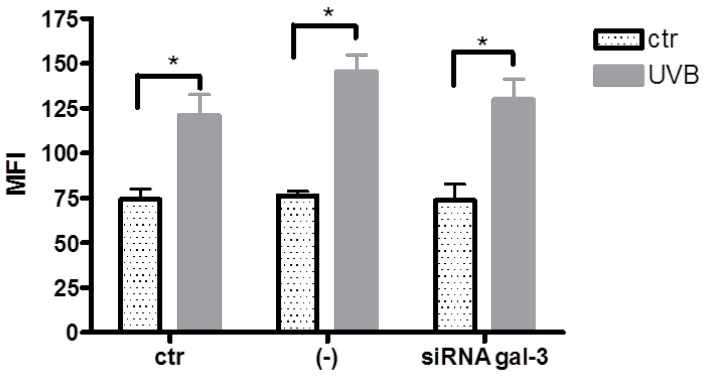


Figura 27 – A inibição de Gal-3 não altera os niveis de superóxido em melan-a. Análise dos niveis de superóxido após UVB e a inibição de galectina-3. Ctr: células não irradiadas; (-): controle negativo do siRNA; siRNAgal-3: inibição de gal-3. MFI (intensidade média de fluorescência). *p<0,05.Experimento representativo n=3.

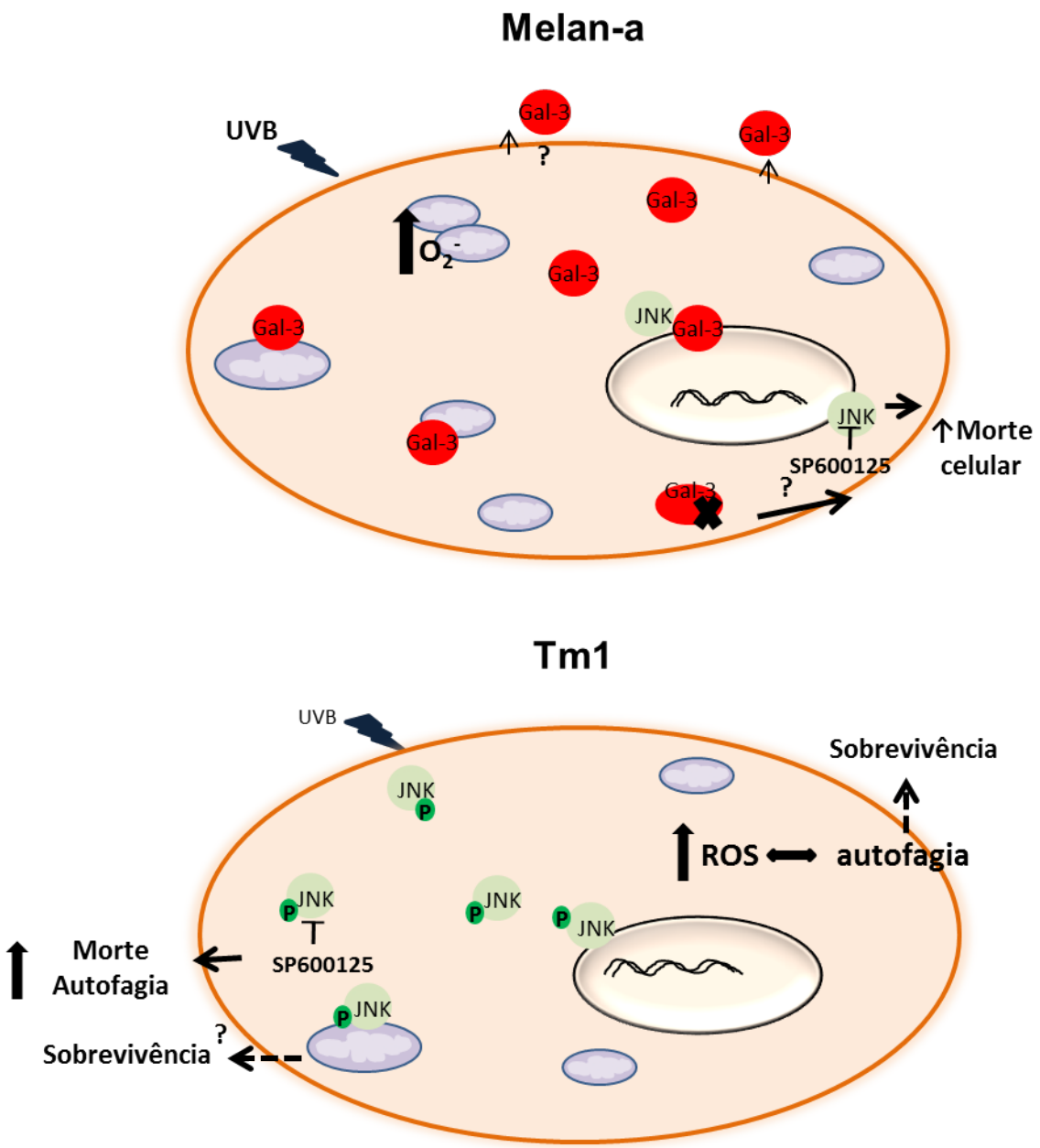


Figura 28 - Representação esquemática da resposta celular associada à UVB e implicações de galectina-3 em melan-a e Tm1. Ambas as linhagens apresentam um perfil de resposta diferente a ação da UVB. Melan-a é uma linhagem mais sensível do que Tm1, ativando vias de morte após o dano genotóxico, associado ao aumento dos níveis de superóxido. A localização de Gal-3 é ubíqua em melan-a, mas o papel desta molécula em cada local não foi identificado. A expressão de Gal-3 na mitocôndria não sofre grandes alterações após irradiação, mas a UVB aumenta a biogênese mitocondrial em melan-a. Embora o silenciamento de Gal-3 tenha aumentado a porcentagem de células hipodiplóides, não foi esclarecida a função desempenhada por esta proteína na mitocôndria. Após UVB, JNK não é ativada em melan-a, o que pode estar relacionado com a interação entre JNK e Gal-3. No entanto, a inibição de JNK parece ser importante para a manutenção celular. Em oposição à melan-a,

Tm1 foi mais resistente ao dano induzido por UVB, mas desencadeou aumento nos níveis de ROS e do processo autofágico. Estes dois mecanismos parecem ser os responsáveis, em parte, da resistência de Tm1 ao efeito da UVB. A ativação de JNK induzida por UVB parece estar envolvida na sobrevivência celular, através do recrutamento desta molécula para mitocôndria, mas curiosamente a inibição de JNK aumenta autofagia e induz morte celular em células Tm1 irradiadas com UVB.

CONCLUSÃO

A irradiação UVB é um indutor de dano celular em linhagem melanocítica e na sua contraparte transformada (melanoma), capaz de promover morte celular e induzir vias associadas ao estresse celular, com o aumento de ROS e ativação do processo autofágico. A linhagem transformada foi mais resistente ao estresse induzido pela UVB. A ativação da via JNK, assim como autofagia parecem ser importantes reguladores dessa resposta. A expressão de galectina-3 não é modificada pela ação de UVB, mas sua secreção e localização subcelular são alteradas após irradiação. A inibição de galectina-3 induz morte celular após indução de dano no DNA o que associa o papel de galectina-3 na sobrevivência ou manutenção de linhagens melanocíticas expostas a dano.

CAPÍTULO 2

Capítulo desenvolvido no Instituto Weizmann, Israel

2. OBJETIVOS

Avaliar a cinética de resposta de melanócitos e células de melanoma à exposição de luz UVB, avaliando a ativação das vias de ERK, JNK e p38; e, investigar uma possível regulação destas vias por galectina-3.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Avaliar a resposta à UVB utilizando diferentes doses de irradiação, nas linhagens de melanoma LOX e A2352, e melanócitos.

2.1.2 Caracterizar a localização de galectina-3 nessas linhagens após UVB.

2.1.3 Verificar a interação entre galectina-3 e MAPKs.

2.1.4 Avaliar se galectina-3 regula a expressão de MAPKs através do silenciamento de galectina-3 com moléculas de siRNA.

2.1.5 Avaliar o papel de galectina-3 nas linhagens humanas após UVB em relação à indução de morte celular e sobrevivência.

3.1 A avaliação da ativação de MAPKs após diferentes doses de UVB mostrou que essas vias são responsivas ao estímulo induzido pela luz UVB

A via de sinalização de MAPK possui um importante papel na regulação da expressão gênica e no controle de diversos processos celulares. MAPKs são ativadas por uma variedade de estímulos, como a luz UVB (Munshi & Ramesh, 2013). Caracterizamos o padrão de resposta de melanócitos humanos e das linhagens de melanoma LOX e A2152 à UVB associada à ativação de MAPKs por curtos períodos de tempo após irradiação. Na Figura 1, observa-se a ativação das MAPKs irradiadas com uma dose baixa de UVB (9mJ/cm^2), enquanto que na Figura 2 foi utilizada uma dose maior (26mJ/cm^2) com a intenção de observar se de fato estas proteínas eram ativadas por UVB e se o padrão de ativação era modificado. Quando testamos doses de UVB intermediárias, próximas a 16mJ/cm^2, os resultados foram parecidos com os obtidos para a dose alta, demonstrando uma diferença na resposta apenas entre a dose baixa e a alta.

A detecção de ERK revelou que o perfil de ativação desta via é diferente entre melanócitos e melanomas, em ambos os experimentos. Em melanócitos observa-se uma pequena ativação de ERK nos primeiros minutos após irradiação, enquanto que em melanomas foi observada uma maior ativação após 25 ou 50 minutos de exposição à UVB. Quando irradiamos os melanomas com baixa dose (9mJ/cm^2) de UVB fomos capazes de observar dois fenômenos diferentes. Em algumas ocasiões notamos o aumento da ativação de ERK após 25 e 50 minutos e em outros casos evidenciamos uma

diminuição da ativação aos 25 minutos seguida de um aumento na fosforilação aos 50 minutos. Este fenômeno pode ser resultado de uma dupla ativação através da intervenção de duas vias diferentes. A dupla ativação estabelece duas cinéticas distintas, em uma delas um determinado efetor induz a ativação imediata da via de ERK após UVB, seguida pela queda de atividade, enquanto que na outra um novo efetor induz uma resposta mais demorada, ativando ERK próximo aos 50 minutos.

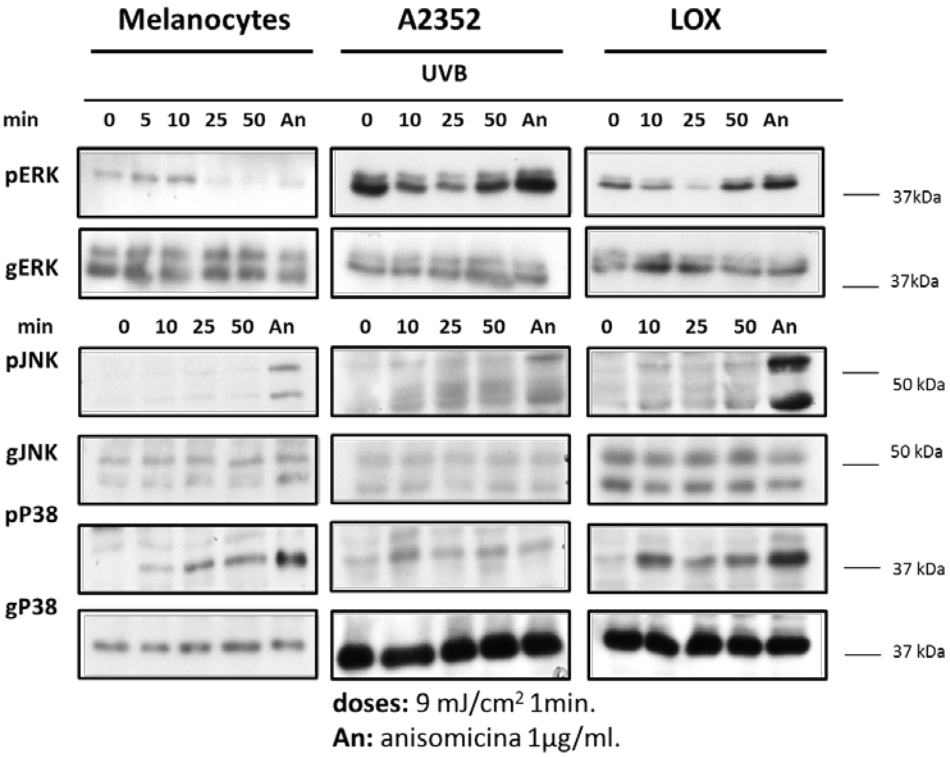


Figura 1 - Ativação de MAPKs em melanócitos, LOX e A2352 após irradiação com baixa dose. Western representativo da ativação após baixa dose de UVB: (9mJ/cm^2). Os blots foram feitos com anticorpos contra as formas globais ou totais das quinases (gERK, gJNK e gP38) e contra formas fosforiladas específicas destas quinases (pERK, pJNK, pP38). O controle positivo de ativação das quinases foi feito com exposição a anisomicina.

A ativação de JNK foi observada apenas após 50 minutos de irradiação ou pela adição de anisomicina, um ativador de quinases ativadas pelo estresse. Nas três linhagens observou-se uma discreta ativação de JNK aos 50 minutos após a irradiação com a dose mais baixa, enquanto que a mesma intensificou-se aos 25 minutos quando irradiadas com alta dose. Este fenômeno foi mais evidente nos melanócitos, apresentando o efeito contrário na linhagem A2352, a qual não mostrou ser responsiva na ativação de JNK em ambas as doses. Por outro lado, p38 teve uma cinética de ativação similar entre as linhagens e nas diferentes doses utilizadas, sendo ativado após 10 minutos de irradiação (Figura 1 e 2). Sabe-se que p38 está envolvido na melanogênese. Foi demonstrado que a ativação de p38 em células de melanoma induz a degradação da tirosinase, enzima envolvida na pigmentação e localizada nos melanossomos, e suprime a produção da síntese de melanina (Bellei *et al*, 2010; Huang *et al*, 2013). Portanto, isso sugere que a ativação de p38 observada nas três linhagens pode estar relacionada com a supressão da síntese de melanina em nossas linhagens. Para aprofundar o estudo sobre o papel de p38 nessas linhagens, foram efetuados ensaios de inibição de p38 através do inibidor SB202190 e análise de proliferação. Os resultados não foram claros e não mostraram diferenças no crescimento celular, mas observamos diferenças da morfologia celular, células mais alongadas, de melanócitos e de LOX após o tratamento com o inibidor. Na literatura existem dados que sugerem o envolvimento de p38 na diferenciação de melanócitos e na formação de dendritos (Kim *et al*, 2010). Possivelmente, os resultados obtidos no ensaio de inibição dessa quinase estejam associados com esse tipo de resposta. A inibição de p38 através de SB202190 pode ter induzido o

aumento da síntese de melanina levando à formação de estruturas mais alongadas como os dendritos na tentativa de conduzir a transferência de melanossomos, e influenciando na atividade melanocítica. Por outro lado, essa resposta pode estar associada a outros fatores e ser independente da inibição de p38, já que foi descrito que o composto piridinil imidazol (SB202190) pode bloquear a síntese de melanina independente da inibição de p38 (Bellei *et al*, 2010).

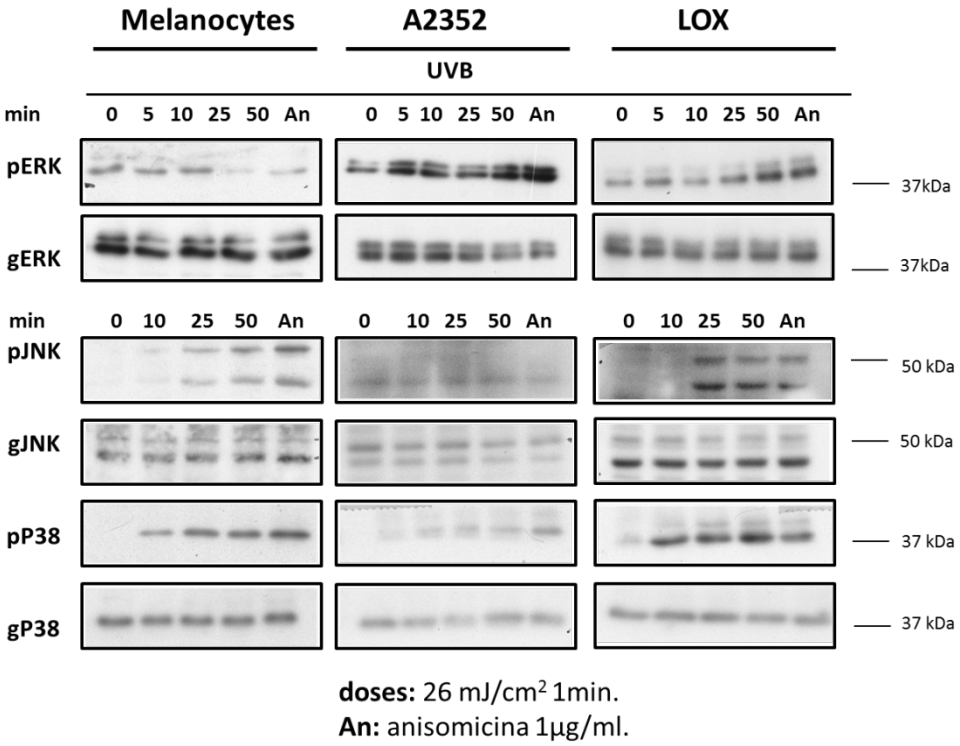


Figura 2 – Ativação de MAPKs em melanócitos, LOX e A2352 após irradiação com alta dose. Western representativo da ativação após alta dose de UVB: (26mJ/cm^2).

Assim, mostramos a presença das MAPKs não só em melanócitos, como também em melanomas, e que as mesmas são ativadas por luz UVB.

Dessa forma, o próximo passo foi verificar a presença de galectina-3 (Gal-3) nessas células.

3.2 Caracterização da expressão de galectina-3 das linhagens em estudo

Galectina-3 é uma proteína multifuncional capaz de unir e ativar múltiplos componentes de cascatas de sinalização e, portanto, capaz de atuar como reguladora de diversos elementos durante a progressão tumoral. Nos últimos anos, evidências tem relacionado a expressão de Gal-3 com o funcionamento MAPKs em câncer (Saegusa *et al*, 2008; Wu *et al*, 2013). Para estabelecer qual era o padrão de expressão de Gal-3 em nossas linhagens, foram realizados ensaios de *western blot* e de imunofluorescência. Para o ensaio de *western blot,* as células foram irradiadas e após 8, 24 e 48 horas, o extrato proteico foi processado e utilizado para detecção de galectina-3 e de proteínas envolvidas com apoptose. Na tentativa de caracterizar molecularmente o processo de morte induzido por UVB em melanomas e melanócitos, realizamos a detecção de caspase-3 ativada e de poli (ADP) ribose polimerase (PARP) clivado, uns dos alvos finais das durante o processo de apoptose.

A Figura 3 mostrou que as três linhagens em estudo expressam Gal-3, mas que a expressão desta proteína é maior nos melanócitos do que nos melanomas. Na linhagem A2352 e nos melanócitos parece existir uma diminuição de Gal-3, 24 e 48 horas após irradiação. A detecção de caspase-3 não foi nítida, mas foi possível observar a clivagem desta caspase após 24 e

48 horas na linhagem A2352. Como PARP é um dos alvos principais da caspase-3 decidimos verificar a presença dessa proteína clivada após irradiação. De acordo com o resultado da caspase-3, observamos que A2352 e LOX também apresentaram PARP clivado 24 e 48 horas após irradiação. A ativação observada de caspase-3 e de PARP sugere que a luz UVB induz apoptose após 24 e 48 horas de irradiação em LOX e em A2352.

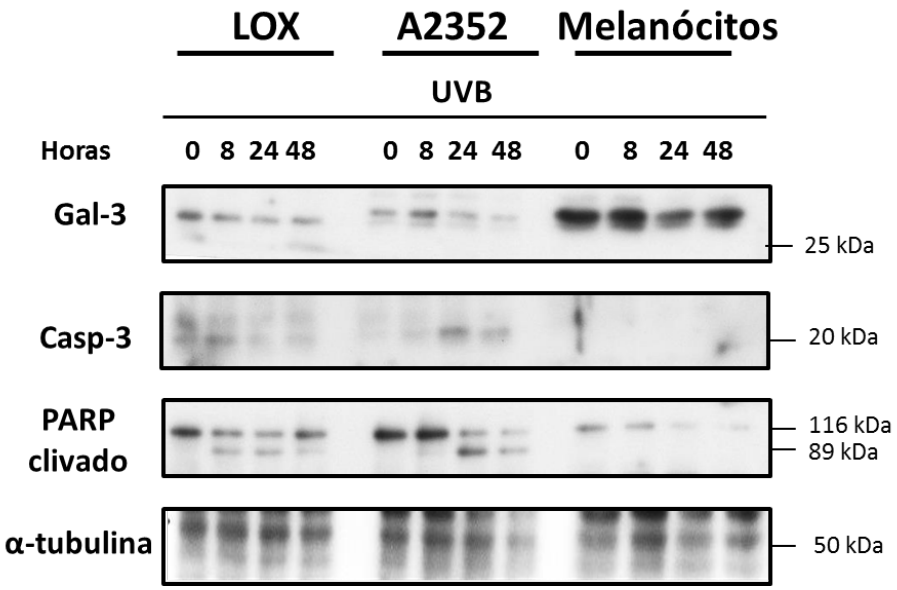


Figura 3 – **Expressão de Gal-3 e proteínas associadas a apoptose após irradiação em melanomas e melanócitos humanos**. Dose UVB (9mJ/cm^2).Tubulina: controle de carregamento.

Nos melanócitos não foi possível detectar caspase-3 clivada tampouco a fragmentação de PARP. A análise do ciclo celular dos melanócitos mostrou que uma grande população de células encontra-se na fase G0/G1, enquanto que, 24 e 48 horas após irradiação, a população G2/M sofre um aumento (Figura 4). Em adição, não foi observado aumento da população hipodiplóide (células com DNA fragmentado, não mostrado) indicando que os melanócitos

não parecem sofrer morte celular 24 horas após exposição à UVB. Entretanto, sabe-se que melanócitos podem entrar em senescência após estresse e, embora a senescência não seja caracterizada apenas pela parada do ciclo celular, estes resultados poderiam indicar senescência prematura por estresse nestas células (Touissant *et al*, 2000; Cao *et al*, 2013).

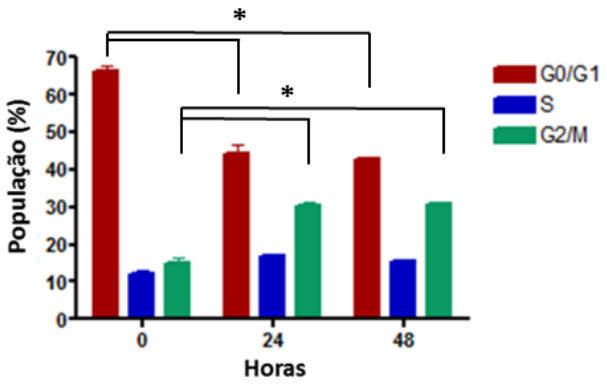


Figura 4 – Aumento da fase SG2M do ciclo celular após irradiação em melanócitos. Análise do ciclo celular em melanócitos 24 e 48 horas após irradiados com dose baixa (9mJ/cm^2). *p<0,05. Experimento representativo n=3.

Uma vez que a localização subcelular de Gal-3 é importante para determinar sua função, realizamos imunofluorescência para avaliar a compartimentalização da molécula. No painel da Figura 5 observa-se a distribuição de Gal-3 nas linhagens humanas através de imunofluorescência. Em células em repouso, galectina-3 se encontra tanto no núcleo como no citoplasma nas três linhagens estudadas. Ao longo do tempo e após exposição à UVB, a marcação de galectina-3 em LOX e nos melanócitos parece se tornar mais nuclear, enquanto que na linhagem A2352 a marcação parece estar

principalmente no citoplasma. A marcação de galectina-3 em A2352 e nos melanócitos 24 horas após exposição à UVB foi menos intensa que nos outros tempos, isso coincide com o resultado observado por *western blot*. As imagens sugerem que após 8 e 24 horas de irradiação, Gal-3 é translocada para o núcleo em LOX e nos melánocitos. Tem sido descrito que Gal-3 nuclear está envolvida com a indução de apoptose, *splicing* do RNAm e na regulação da transcrição (Newlaczyl & Yu, 2011). Assim, parece possível que Gal-3 nuclear em celulas LOX esteja envolvida com a indução da apoptose, enquanto que em melanócitos poderia estar associada com a regulação da transcrição gênica e indução da sobrevivência e/ou senescência.

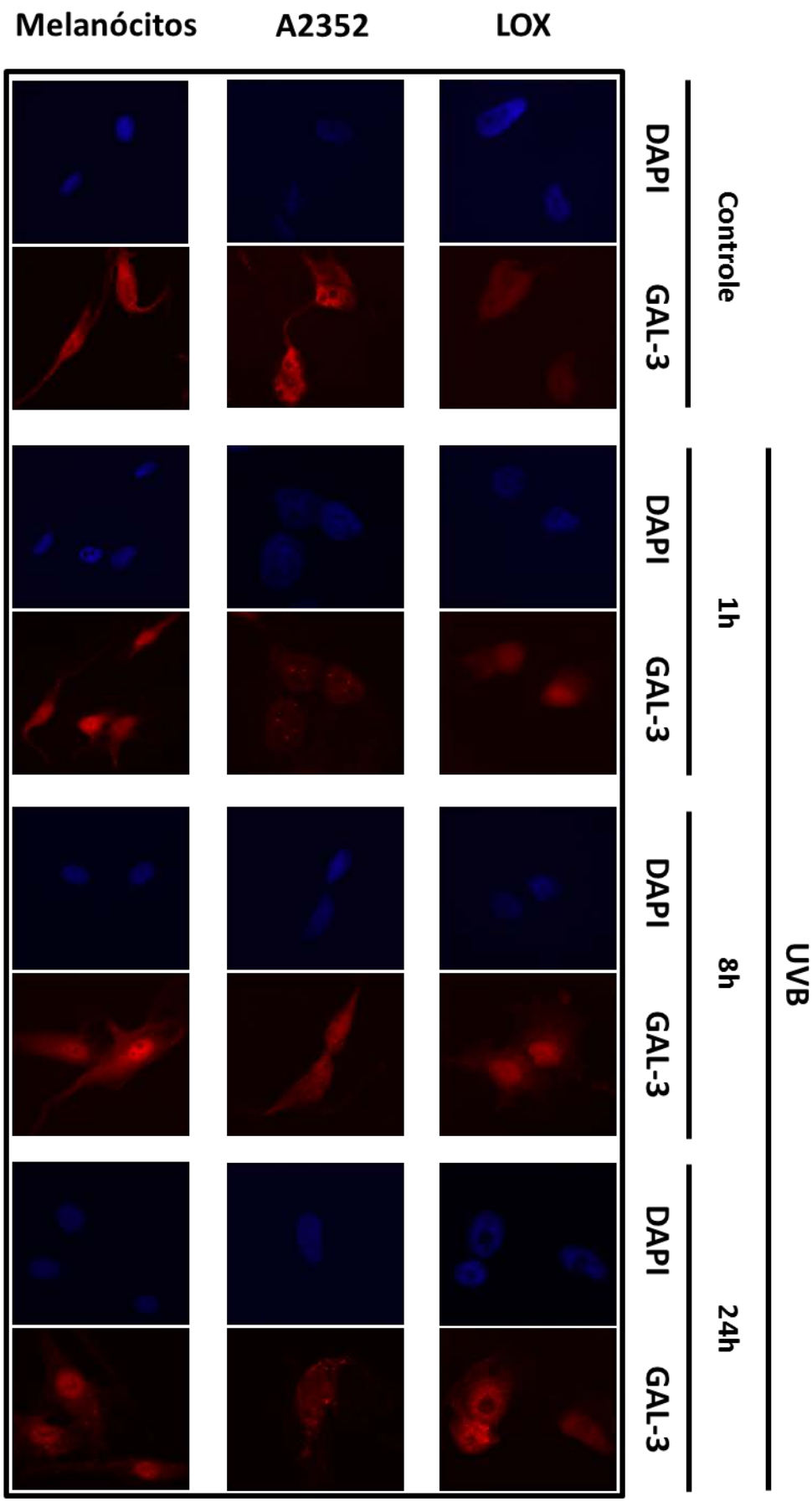


Figura 5: Localização celular de galectina-3 após UVB em melanócitos e melanomas humanos. Aumento 400x.

3.3 O ensaio de coimunoprecipitação evidenciou a interação entre galectina-3 e ERK

Antes de estudar o envolvimento de galectina-3 na regulação da via de MAPKs fomos verificar se Gal-3 interagia fisicamente com alguma das proteínas das vias clássicas de MAPK. Como parece haver relação entre a expressão de galectina-3 e JNK em linhagens murinas (capítulo 1), e baseado em dados de outros modelos celulares, resolvemos testar inicialmente se existia interação entre estas duas moléculas em melanócitos e melanomas humanos.

As células foram irradiadas com dose próxima a 16 mJ/cm^2 e 50 minutos após, foi realizado o ensaio de coimunoprecipitação. A Figura 6 mostrou que não existe interação entre galectina-3 e JNK nas linhagens humanas em estudo. Comparando o extrato com as amostras imunoprecipitadas com o anticorpo anti-Gal-3 (JNK), não se observou marcação de JNK. Apenas é possível notar a cadeia pesada da imunoglobulina (50kDa), enquanto que no extrato proteico visualizam-se duas bandas próximas a 46 e 50 kDa correspondente a JNK.

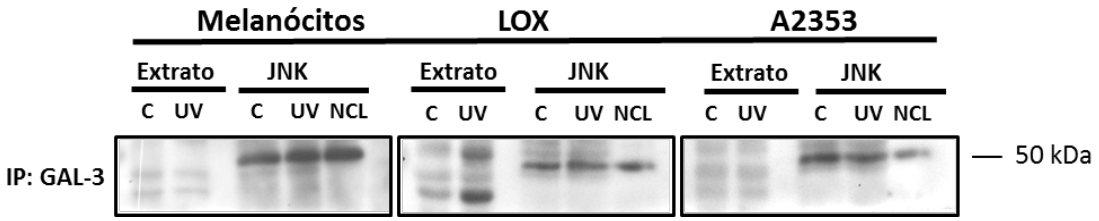


Figura 6 – Galectina-3 e JNK não interagem em linhagens humanas. Extrato: extrato proteico total das amostras; JNK: marcação para JNK nas amostras processadas para precipitação. C: controle; UV: irradiado; NCL: controle negativo. JNK: 46,52 kDa. IP: precipitação de galectina-3.

Como mencionado anteriormente, galectina-3 interage com K-Ras em câncer de próstata e de tiróide e modula a atividade desta proteína, assim como de outras *downstream* de Ras como, por exemplo, ERK. Além disso, queratinócitos Gal-3-/- foram mais sensíveis a apoptose induzida por irradiação UVB acompanhada da ativação da via ERK. De acordo com o resultado de *western blot* anteriormente mostrado, a expressão de pERK é aumentada após UVB, portanto decidimos testar se galectina-3 poderia interagir com ERK em melanomas (Elad-Sfadia *et al*, 2004; Levy *et al*, 2011; Ji *et al*, 2012).

O ensaio foi realizado da mesma maneira que para JNK. Na figura 7 podemos observar que galectina-3 coimunoprecipitou com ERK, tanto em melanócitos como nos melanomas, independente da ação da luz UVB. Na Figura 7 pode se observar uma marcação mais notável quando utilizado o ERK total, ao invés do ERK fosforilado (pERK). O fato de não observar marcação no pERK, ou dessa ser pouco evidente, sugere que galectina-3 interage com a forma não ativa de ERK e, talvez, impeça a fosforilação ou translocação de ERK após estimulação. Nos melanócitos, a ativação de ERK após UVB, 50 minutos, é baixa, não sendo possível evidenciar claramente a marcação de pERK.

Embora não existam dados na literatura que sugiram relação entre Gal-3 e p38, decidimos testar se poderia existir interação entre estas moléculas, pois p38 foi ativado após UVB em melanócitos e melanomas. No ensaio de coimunoprecipitação não observamos interação entre estas duas moléculas em nenhum dos casos estudados (não mostrado).

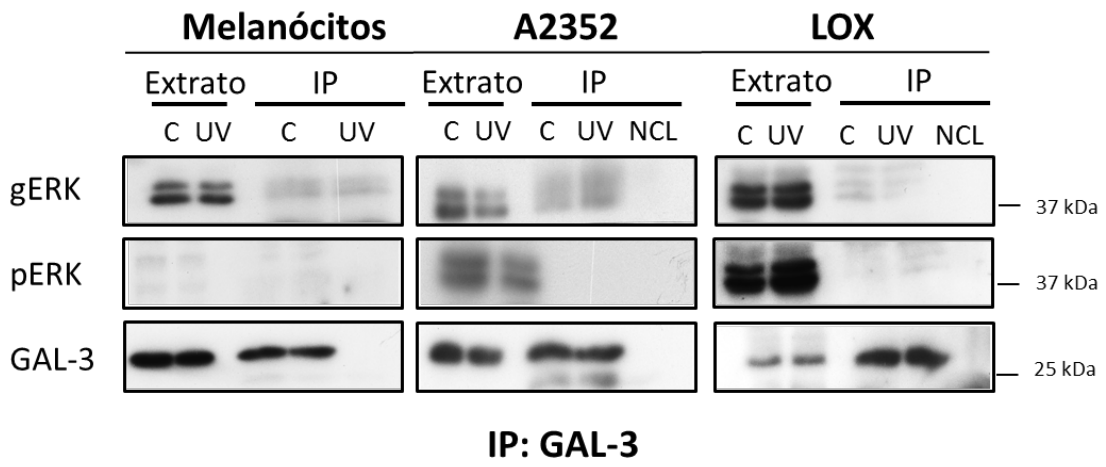


Figura 7 – Interação entre galectina-3 e ERK em melanócitos e em melanoma. Galectina-3 foi imunoprecipitada e foram realizadas marcações para gERK e pERK. As bandas abaixo da banda de galectina-3 correspondem à cadeia leve da imunoglobulina. IP: amostras processadas para precipitação. NCL: controle negativo. ERK: 42 kDa.

3.4 O fracionamento mitocondrial mostrou a presença de ERK na mitocôndria

Como observado nos ensaios anteriores, Gal-3 esta localizada principalmente no citoplasma das células não irradiadas e de células expostas à UVB após 1 hora. Devido ao perfil de distribuição subcelular de Gal-3, pensamos que a interação entre galectina-3 e ERK aconteça no citoplasma celular. Depois de um estímulo, moléculas de ERK são translocadas principalmente para o núcleo e/ou organelas como a mitocôndria. A presença de ERK na mitocôndria é um importante regulador dos processos de sobrevivência e de morte celular. Considerando que em LOX e A2352 observamos a ativação de proteínas que participam no processo de apoptose 24 horas após UVB e, sabendo que galectina-3 se encontra no citoplasma e é capaz de ser translocada para mitocôndria, decidimos realizar o fracionamento

celular. O fracionamento celular foi realizado com o objetivo de evidenciar se ERK e Gal-3 estavam presentes nessa organela e/ou se a luz UVB induzia a translocação destas moléculas para mitocôndria.

A Figura 8 mostra o fracionamento mitocondrial nas três linhagens. A marcação mostrou que tanto a forma total quanto a ativada de ERK são encontradas na mitocôndria e no citoplasma de células irradiadas e não irradiadas, não se observando aumento da marcação após UVB. Este resultado sugere que não existe translocação de ERK para mitocôndria induzida pela UVB. Não foi possível obter a marcação de galectina-3 nos melanócitos devido a problemas no protocolo de fracionamento para esta célula. No caso dos melanomas, notamos a presença de galectina-3 na mitocôndria. Curiosamente, a linhagem LOX, que expressa baixos níveis de galectina-3, mostrou marcação para galectina-3 apenas no espaço mitocondrial. Possivelmente, galectina-3 está presente em níveis muitos baixos no citoplasma, mas isto indica que Gal-3 nessa linhagem é mais expressa na mitocôndria. Não realizamos ensaios que concedam uma função específica a esta galectina-3 mitocondrial, mas a presença desta molécula na mitocôndria poderia sugerir uma função protetora para a célula tumoral (Fukumori *et al*, 2006). Para completar o painel seria necessário padronizar o protocolo e realizar um novo ensaio para determinar onde está localizada a galectina-3 nos melanócitos a fim de comparar com os melanomas.

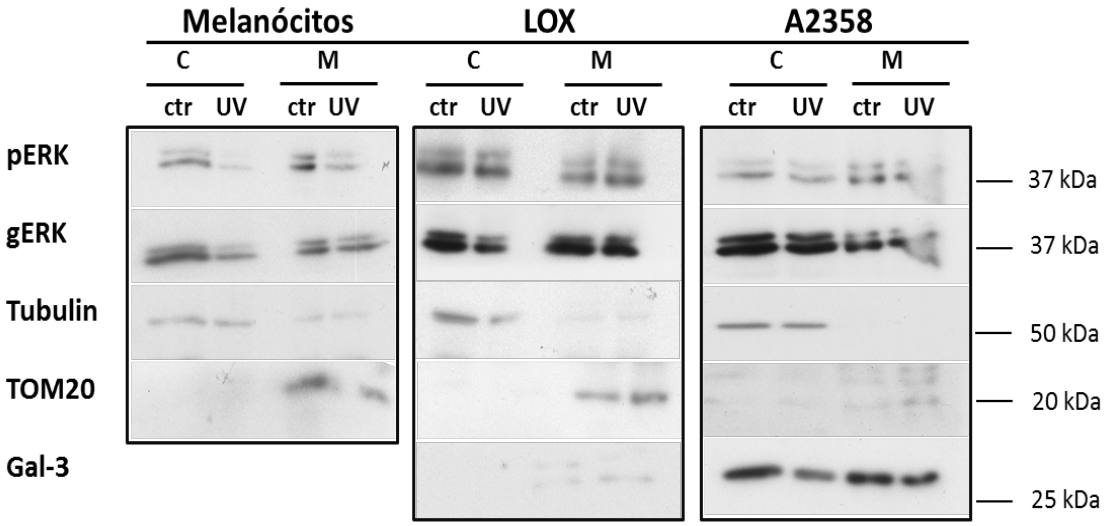


Figura 8 – **ERK é localizado nas mitocôndrias de células não irradiadas (controle) e irradiadas**. Como controle do fracionamento foi utilizado: tubulina, como marcador citoplasmático e TOM20, como marcador mitocondrial. C: citoplasma; M: mitocôndria.

3.5 O ensaio de siRNA contra galectina-3 mostrou regulação da via de ERK

Baseado nos resultados obtidos anteriormente, mostrando ativação de ERK após UVB e a interação de ERK com galectina-3, resolvemos estudar qual era o efeito da inibição de galectina-3 em melanócitos e nos melanomas.

Depois de realizada a inibição de galectina-3, as células foram irradiadas com uma dose próxima a 16mJ/cm^2 e, 50 minutos após as amostras foram processadas e aplicadas em gel SDS-PAGE. A Figura 9 representa a inibição de galectina-3 em LOX. Nesta linhagem a inibição de galectina-3 permitiu observar um aumento claro e maior da ativação de ERK após a UVB do que a induzida no ensaio sem o silenciamento de Gal-3. Ainda, apenas a ausência de galectina-3 mostrou um pequeno aumento da ativação de ERK. Este resultado demonstra que a inibição de galectina-3 regula positivamente a

ativação de ERK nos primeiros minutos após estimulação em células LOX. Com o objetivo de evidenciar se este efeito era verdadeiro e capaz de modular *downstream* a via de ERK, decidimos analisar a ativação da quinase S6 ribosomal (RSK). RSK é um dos principais efetores da via de ERK envolvido em diversos processos como o crescimento celular, sobrevivência, motilidade e proliferação (Anjum & Blenis, 2008; Dohen *et al*, 2009). Observamos um aumento da ativação dessa enzima 50 minutos após UVB em células LOX. Estes resultados sugerem que a presença de Gal-3 induz a inibição da expressão de ERK em células irradiadas com UVB. Por conseguinte, Gal-3 modula a ativação de vias *downstream* de ERK podendo interferir na resposta celular após um estímulo como UVB.

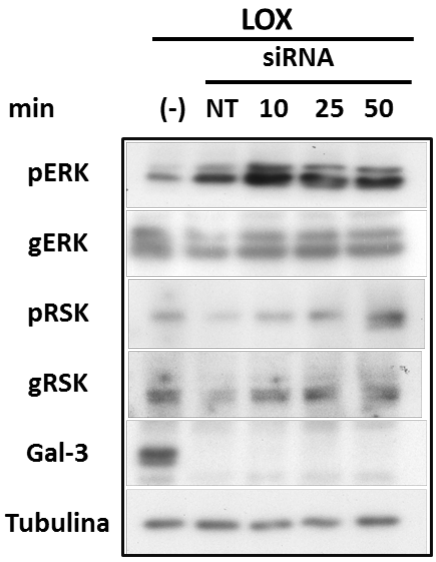


Figura 9 – **A ausência de Gal-3 induz maior ativação de ERK em celulas LOX irradiadas com UVB**. (-): siRNA negativo. NT: não irradiado. Min: minutos após UVB.

O mesmo ensaio foi realizado em melanócitos e na linhagem A2352 (Figura 10). Nesta última não foi observada nenhuma alteração da ativação de

ERK após a inibição de galectina-3. As células A2352 foram menos responsivas a ativação das vias após UVB nas diferentes doses utilizadas. De alguma forma, células LOX parecem ser reguladas pela ação de galectina-3, talvez esse fenômeno esteja relacionado especificamente com o *background* de cada linhagem ou com a localização de Gal-3 em mitocôndria. Em melanócitos, a ativação de ERK é baixa e ocorre apenas nos primeiros minutos após irradiação (5 e 10 minutos). O *knockdown* de galectina-3 não mostrou fosforilação de ERK e, ao contrário do observado em LOX, apenas a inibição de galectina-3 parece produzir diminuição da ativação de ERK. Também realizamos a marcação para RSK em melanócitos e não observamos ativação de RSK após irradiação, sendo este resultado coincidente com a marcação de pERK. Deste modo, a inibição de galectina-3 em melanócitos diminui a ativação de ERK e impede a fosforilação de RSK após UVB, enquanto que em melanomas como LOX, a inibição de Gal-3 provoca o aumento da expressão de ERK. Interessantemente, este resultado sugere que contráriamente aos melanomas, os melanócitos possuem uma regulação positiva da via de ERK em presencia de Gal-3. Portanto, como descrito na literatura, galectina-3 pode operar de diversas maneiras dependendo do contexto celular (Brown *et al*, 2012).

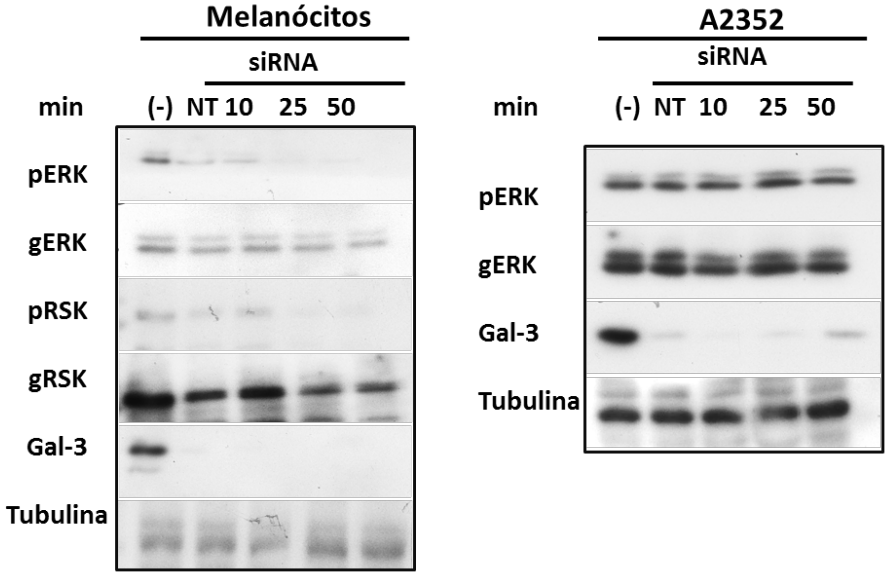


Figura 10 - **A ativação de ERK é diminuída em melanócitos silenciados contra Gal-3.** *Western blot* mostrando o efeito da inibição de galectina-3 em melanócitos e em A2352.(-): siRNA negativo. NT: não irradiado. Min: minutos após UVB.

Devido a fato do efeito observado em LOX após o silenciamento de Gal-3 não ter sido evidenciado na linhagem A2352, decidimos realizar novos ensaios utilizando outras linhagens de melanoma para tentar reproduzir o fenômeno observado. Desta vez utilizamos a linhagem de melanoma humano A1317 que, ao contrário de LOX, não apresenta a mutação V600E em BRAF, sendo esta BRAF selvagem. A detecção de pERK após irradiação mostrou marcação de ERK, mas não foram observadas grandes diferenças entre as amostras. Depois de realizada a inibição de galectina-3, a marcação para pERK aumentou ligeiramente 50 minutos após de irradiação. Ao mesmo tempo, observamos uma discreta ativação de RSK pós-inibição de Gal-3 25 e 50 minutos após irradiação (Figura 11). Portanto, a modulação de ERK por Gal-3 não parece ser dependente do estado BRAF.

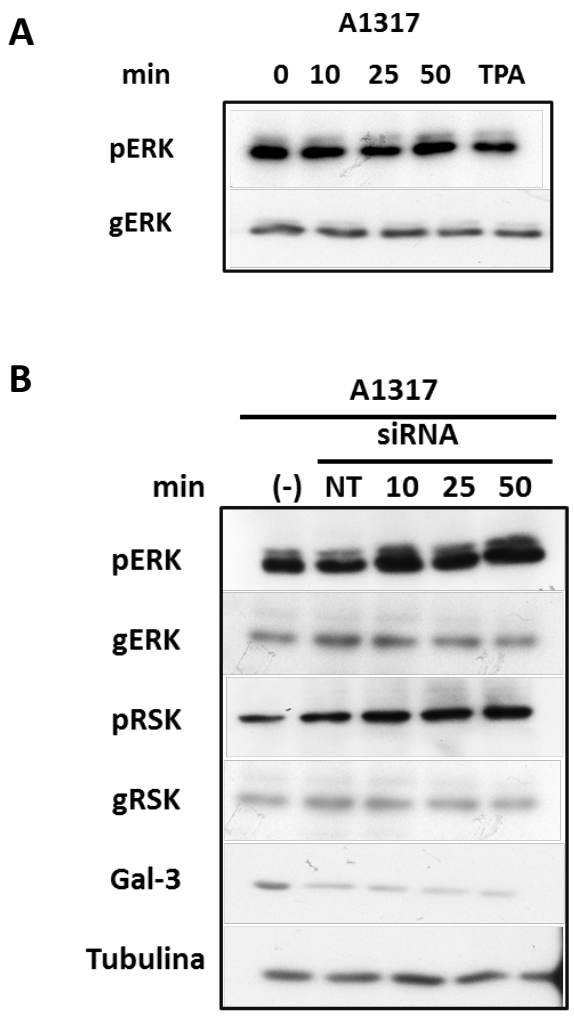


Figura 11- A ativação da via de ERK em celulas A1317 silenciadas para Gal-3. (-): siRNA negativo. NT: não irradiado. Min: minutos após UVB. A: ativação de ERK sem o efeito do siRNA. B: inibição de galectina-3. TPA: ativador da via de ERK.

3.6 A análise de crescimento celular em células silenciadas para galectina-3 revelou uma alteração no perfil de crescimento

Após analisar o envolvimento de galectina-3 na regulação da via de ERK seguida do estímulo de UVB, resolvemos verificar se a diminuição nos níveis de Gal-3 seria desfavorável ou vantajoso para as células. Para isso,

realizamos ensaios de proliferação após a inibição de galectina-3 por siRNA e monitoramos o crescimento celular 24 e 48 horas após exposição à UVB.

A cinética de proliferação em células LOX mostrou claramente que a inibição de galectina-3 induz um aumento evidente na taxa de crescimento destas células. Ainda, quando as células foram irradiadas com dose baixa de UVB (9mJ/cm^2) observamos diferenças no crescimento entre as células que expressam Gal-3 e as células silenciadas, sendo estas últimas mais resistentes e proliferativas (Figura 12). Em conjunto, estes resultados são consistentes com a modulação negativa da via ERK por Gal-3 na linhagem LOX. A linhagem A1317 não mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados, de modo que nesta linhagem a inibição de Gal-3 não alterou a resposta associada à sobrevivência ou morte. Na análise da linhagem A2352 houve diferenças significativas entre o grupo não irradiados com siRNA e o grupo *scramble* não irradiado (negativo) tanto 24 e 48 horas após irradiação. Essas diferenças mostraram o aumento da proliferação nos grupos com inibição para Gal-3, mas curiosamente, 48 horas após irradiação a ausência de Gal-3 reduziu o número de células viáveis.

Em conjunto, estes dados sugerem que o aumento de células viáveis em LOX está associado com o aumento da ativação de ERK causados pela inibição de galectina-3. Embora não observamos o acúmulo de pERK no *western blot* da linhagem A2352, houve aumento da proliferação induzida pela inibição de Gal-3. Talvez a ativação de ERK não foi evidenciada ou esse evento seja resultado da regulação de Gal-3 associada a outras moléculas nessa linhagem. Quando observamos a cinética de crescimento dos

melanócitos verificamos diferenças entre os grupos controle que expressam Gal-3 e os grupos silenciados para Gal-3, sendo estas diferenças contrárias às observadas nos melanomas. Também notamos diferenças significativas entre os grupos 48 horas após irradiação, mostrando redução do crescimento celular após inibição de Gal-3. A diminuição do número de células viáveis no grupo silenciado sugere que a presença de galectina-3 em melanócitos é importante para o crescimento celular e/ou sobrevivência. Após irradiação só foi possível observar uma redução significativa da viabilidade após 48 horas. A diminuição de células viáveis induzida pela inibição de gal-3 em melanócitos foi acompanhada de uma pequena redução da expressão de ERK poucos minutos após irradiação. Recentemente, foi publicado que em determinados contextos, ERK atua como supressor tumoral em células normais, agindo como um indutor de senescência através da degradação proteica dependente do proteassomo (Cagnol &Chambard, 2010; Deschênes-Simad *et al*, 2013). A pequena diminuição da viabilidade observada 48 horas após UVB sugere indução de morte celular e, ao mesmo tempo, a interrupção do crescimento celular, podendo ser esse um indicador da entrada a senescência.

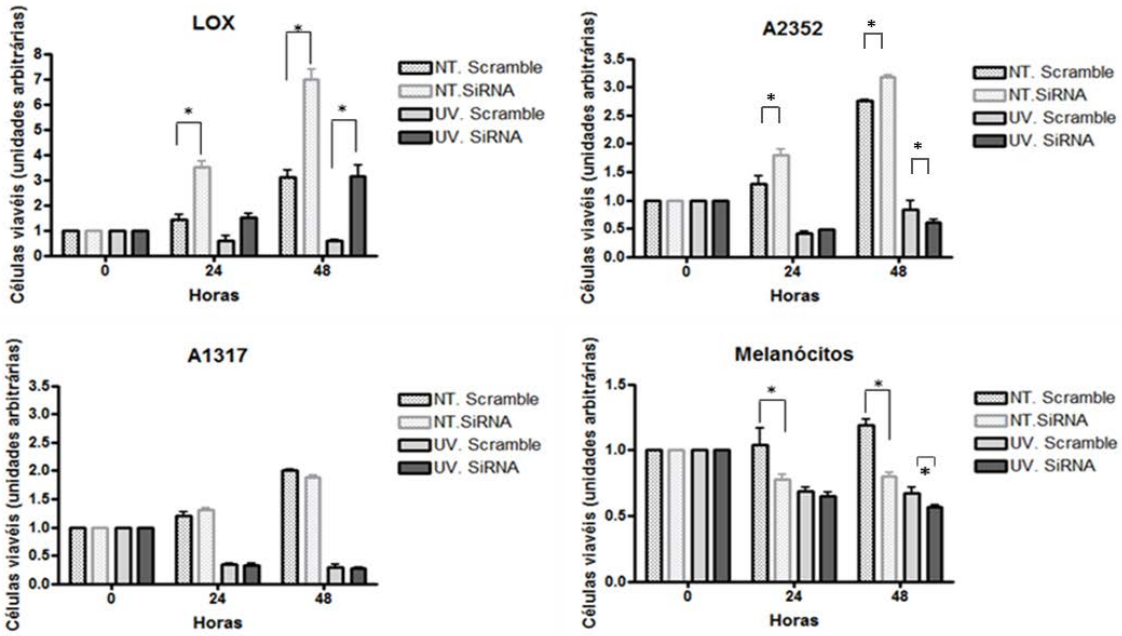


Figura 12 – Cinética de proliferação em melanócitos e melanomas silenciados para Gal-3. *Scramble*: controle negativo. siRNA: inibição de gal-3. *ANOVA* *p<0,01. Baixa dose: 9mJ/cm^2.Experimento representativo n=3

3.7 As moléculas de ERK modificaram sua localização após UVB em células LOX silenciadas para galectina-3

Como discutido anteriormente, Gal-3 interage com ERK e a ausência desta lectina provoca o aumento da proliferação celular favorecendo a progressão tumoral em células de melanoma.

É bem descrito na literatura que ERK depende da liberação de suas proteínas de ancoragem citoplasmáticas para poder ser translocado ao núcleo das células (Plotnikov *et al*, 2011). Uma hipótese é que em presença de galectina-3 no citoplasma, as moléculas de ERK sejam ligadas a Gal-3 evitando assim a completa translocação de ERK em resposta a um estímulo como a luz UVB. Neste modelo, Gal-3 atuaria como uma proteína *scaffold*

retendo ERK no citoplasma e impedindo a translocação nuclear e, portanto, bloqueando a ativação de genes específicos e de processos celulares importantes para a aquisição do fenótipo tumoral.

Para testar esta hipótese e analisar a distribuição de ERK, foi realizado o ensaio de imunofluorescência em células LOX. Como a ativação de ERK foi mais notável 50 minutos após irradiação, as imagens foram realizadas após 15 e 50 minutos. Na Figura 13 mostramos a marcação de gERK e pERK em células LOX controle (controle negativo para siRNA ou *scramble*) e em células com silenciadas para Gal-3. A marcação de ERK total foi mais citoplasmática, tanto no controle negativo como no grupo silenciado para Gal-3. Após 15 minutos de irradiação parece haver uma marcação difusa, entre citoplasma e núcleo, de gERK nas células siRNA Gal-3. Nas fotomicrografias do grupo controle marcadas para pERK, pudemos evidenciar a presença de pERK citoplasmático, enquanto que, 15 e 50 minutos após UVB observamos uma marcação mais difusa no núcleo e no citoplasma. No grupo com Gal-3 silenciada observamos uma marcação tanto nuclear quanto citoplasmática e, 15 e 50 minutos após irradiação, a distribuição de pERK é alterada, encontrando-se bem localizada no núcleo das células. Isso sugere que a inibição de Gal-3 permite o desbloqueio e o recrutamento de ERK para o núcleo com o objetivo de desencadear a ativação de diversos processos celulares como a proliferação celular, fenômeno previamente observado.

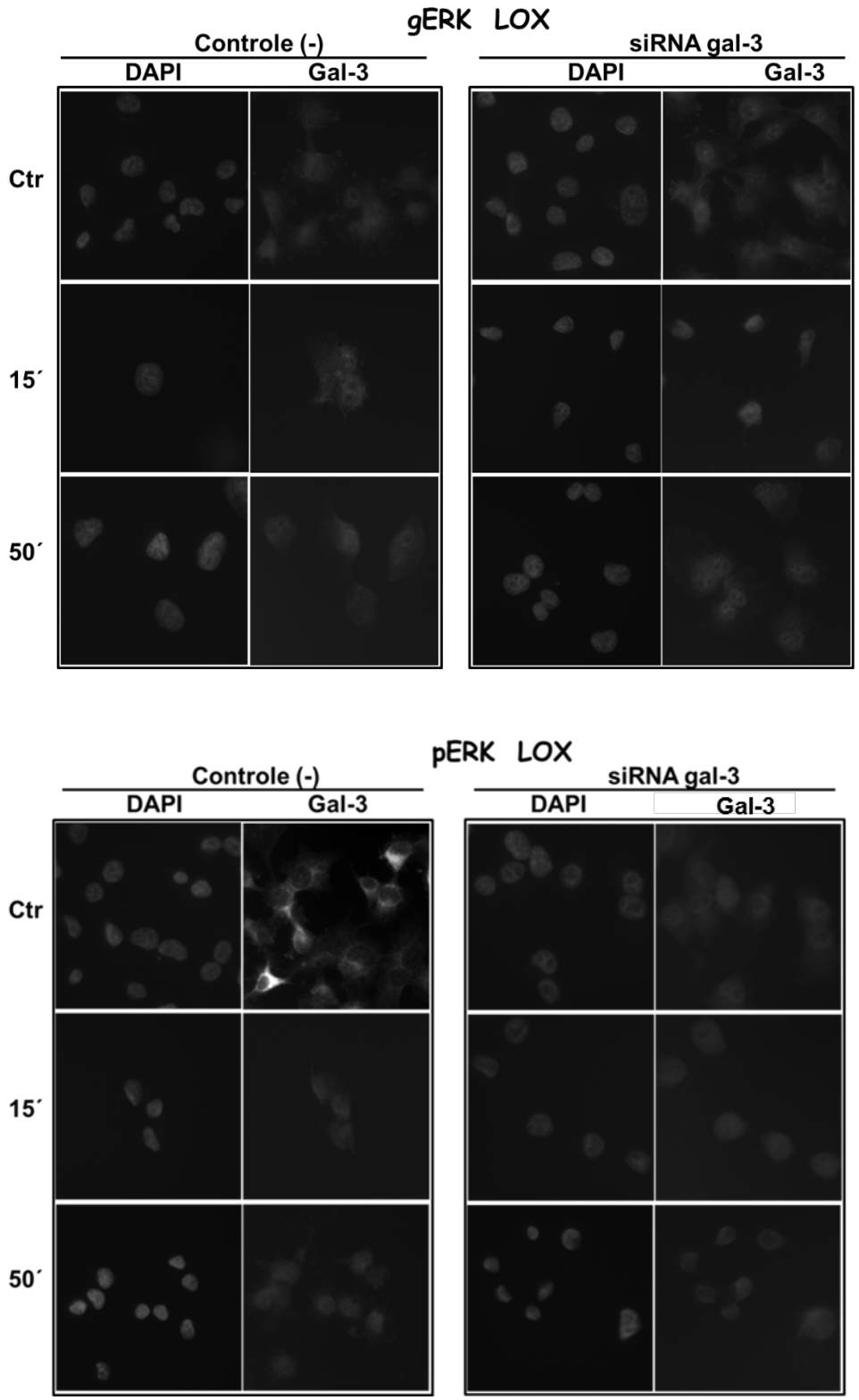


Figura 13 – **A expressão nuclear de pERK é mais notável após irradiação em células silenciadas para Gal-3**.Tempo: 15 e 50 minutos após irradiação. Aumento: 400x.

3.8 Análises de proliferação e imunofluorescência na linhagem SK-MEL-37 mostraram um perfil de resposta parecido ao observado em células LOX

Uma vez observado o envolvimento de galectina-3 na regulação de ERK em células LOX (melanoma metastático BRAF V600E) irradiadas com UVB, avaliamos se esse fenômeno poderia ser reproduzido em outras linhagens como SK-MEL-37, com silenciamento do gene de galectina-3 utilizando-se lentivirus com a sequencia sh *scramble* (sk-mel-37shSCR) ou sh contra Gal-3 (SK-MEL-37shGal-3).

Para tal finalidade foram realizados ensaios de proliferação e de imunofluorescência como descrito anteriormente. A Figura 14 mostra a cinética de proliferação desta linhagem após UVB. Nas 24 horas após irradiação, não se observaram diferenças entre os grupos, mas houve um pequeno aumento do crescimento entre o controle negativo (NT.SCR) e o controle silenciado (NT.shGal-3). Após 48 horas, verificamos aumento estatisticamente significativo na proliferação celular tanto no controle como no grupo irradiado, mostrando que a ausência de Gal-3 contribui no crescimento celular. Este resultado coincide com o apresentado para LOX e indica que a inibição de galectina-3 em determinados melanomas induz aumento da capacidade proliferativa e favorece a sobrevivência após um agravo gerado por luz UVB.

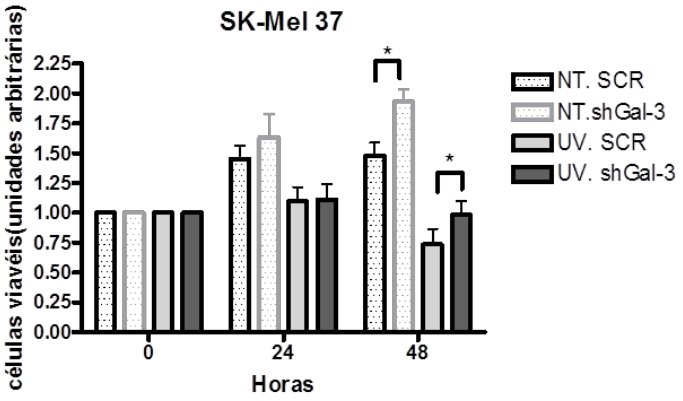


Figura 14 – O ausência de Gal-3 também aumenta a proliferação de células SK-MEL-37. Ensaio de proliferação da linhagem SK-MEL-37 24 e 48 horas UVB. *ANOVA* * p<0,05. Baixa dose: 9mJ/cm^2.

Outro ensaio realizado foi a detecção de ERK por imunofluorescência. Nas imagens (3D) da Figura 15 podemos observar que ERK se encontra localizado principalmente no citoplasma e na região perinuclear nas células controle. Curiosamente, no grupo controle SK-MEL-37shSCR, a marcação de pERK foi observada no citoplasma, mas foi mais concentrada no núcleo das células. Não notamos diferenças claras sobre a localização de ERK entre o grupo silenciado para galectina-3 e o grupo controle. Porém, as células SK-MEL-37shGal-3 irradiadas, 50 minutos após o estímulo de UVB, apresentaram marcação de gERK no citoplasma, enquanto que a localização de pERK após UVB foi evidenciada no núcleo das células e, em menor quantidade, no citoplasma espalhado nas bordas das células.

A partir das imagens obtidas avaliamos a colocalização entre ERK e galectina-3 nas células SK-MEL-37shSCR. Nesta linhagem, contrariamente a LOX e outros tipos celulares estudados, galectina-3 é encontrada sobretudo no núcleo das células (Figura 16). Ainda localizada no núcleo, Gal-3 colocalizou

com pERK o que indica, como evidenciado em outras linhagens, que estas moléculas estão próximas e talvez interagindo no núcleo destas células. A presença de ERK no núcleo é curiosa dado que, de modo geral, ERK é localizado no citoplasma das células em repouso. Em relação a este evento foi descrito que MEK (uma MAPKK) é um regulador da localização de ERK e a perda de interação entre ERK/MEK causa o acúmulo de ERK no núcleo das células (Wang *et al*, 2010). Ainda mais, a presença de ERK no núcleo de células pode ser causada pela deficiência de proteínas de união a ERK no citoplasma (Burack & Shaw,2004). Portanto, isso pode indicar alguma deficiência dessas proteínas associadas à translocação de ERK em células SK-MEL-37 ou ainda pode haver alguma relação com a localização de Gal-3 no núcleo e a união a esta proteína.

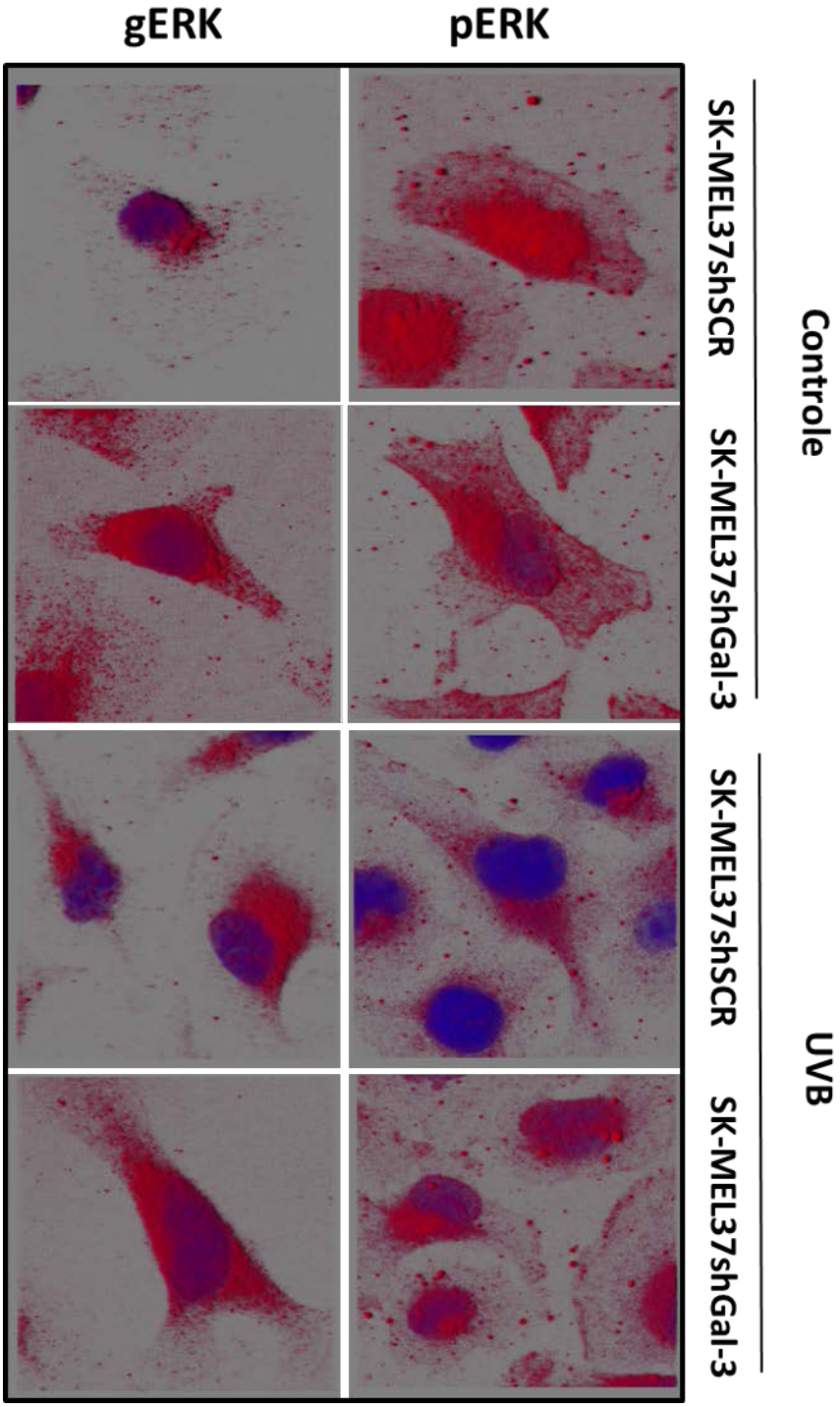


Figura 15 – **Distribuição de ERK em células SK-MEL-37 após irradiação**. Representação em 3D das imagens de imunofluorescência. Azul: DAPI. Vermelho: gERK e pERK. UVB: após 50 minutos de irradiação. Aumento: 400X.

O experimento de imunofluorescência foi realizado em paralelo com o ensaio de proliferação que sugere que, ainda no núcleo, Gal-3 parece interferir na regulação da proliferação. Nessa linhagem, contudo, não foram realizados ensaios de *western blot*, que serão realizados para poder verificar se o aumento observado no número de células viáveis é dependente da ativação de ERK. O efeito observado no ensaio de proliferação foi o mesmo que em LOX, mas talvez o mecanismo utilizado para desencadear tal função dependa de um grupo diferente de moléculas ou de cenários distintos. Para aprofundar e compreender sobre qual é o mecanismo pelo que Gal-3 e ERK agem são necessários novos ensaios que visem determinar se de fato há translocação de ERK para o núcleo após inibição de Gal-3. Também é preciso estudar outros alvos de ERK para verificar quais são as moléculas envolvidas tentando comparar melanomas e melanócitos. Em adição, seria interessante testar os efeitos achados em LOX e SK-MEL-37 (BRAF V600E) em melanomas BRAF selvagens para verificar se os fenômenos analisados são BRAF V600E dependentes.

A

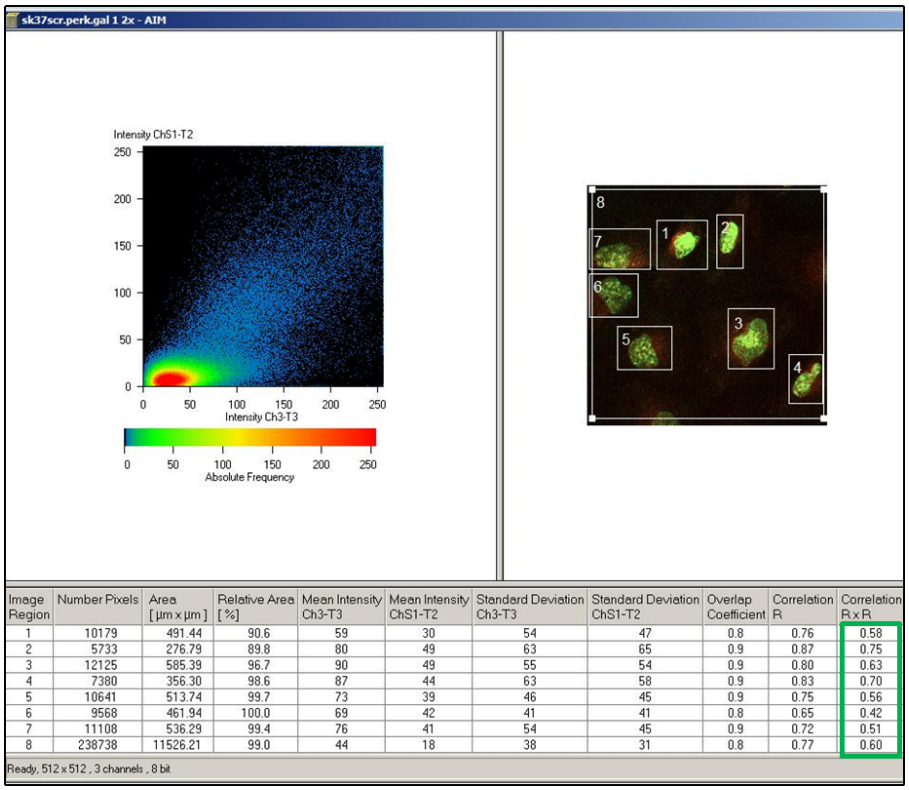
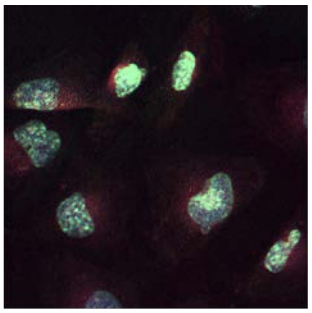


Image Region	Number Pixels	Area [µm x µm]	Relative Area [%]	Mean Intensity Ch3-T3	Mean Intensity ChS1-T2	Standard Deviation Ch3-T3	Standard Deviation ChS1-T2	Overlap Coefficient	Correlation R	Correlation R x R
1	10179	491.44	90.6	59	30	54	47	0.8	0.76	0.58
2	5733	276.79	89.8	80	49	63	65	0.9	0.87	0.75
3	12125	585.39	96.7	90	49	55	54	0.9	0.80	0.63
4	7380	356.30	98.6	87	44	63	58	0.9	0.83	0.70
5	10641	513.74	99.7	73	39	46	45	0.9	0.75	0.56
6	9568	461.94	100.0	69	42	41	41	0.8	0.65	0.42
7	11108	536.29	99.4	76	41	54	45	0.9	0.72	0.51
8	238738	11526.21	99.0	44	18	38	31	0.8	0.77	0.60

B



pERK.SKMEL-37

Figura 16 – **Colocalização nuclear entre Gal-3 e ERK em SK-MEL-37.** A: análise de colocalização. No quadro verde mostram-se os valores da correlação (R). Cada número da tabela corresponde a uma célula numerada na imagem. O último valor corresponde à análise de correlação da imagem inteira. B: imagem original, 400X. Verde: Gal-3. Azul: DAPI. Vermelho: pERK.

SUMÁRIO

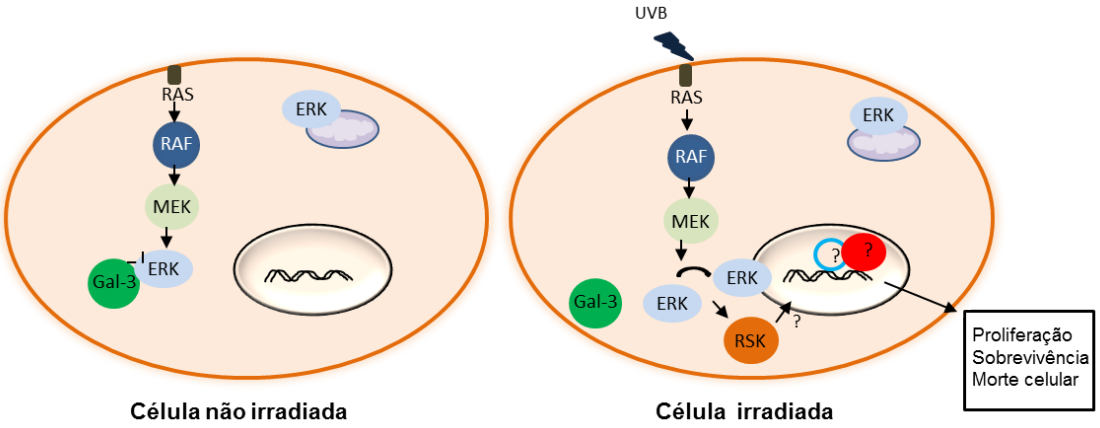


Figura 17 – Representação esquemática da função de ERK e Gal-3 em melanomas. A presença de Gal-3 no citoplasma pode impedir a translocação de ERK ao núcleo após um estímulo como UVB. Através da ativação de RSK e outras moléculas, ainda não identificadas (círculos com interrogação), estas quinases modulam a regulação gênica e os processos celulares. A localização mitocondrial não é modificada após estimulação com UVB, mas pode cumprir alguma função relacionada com o metabolismo celular ou com processos de morte/sobrevivência. Gal-3 também encontra-se na mitocôndria, onde estas moléculas podem interagir desempenhando diferentes funções. Em melanócitos, em oposição aos melanomas, o recrutamento de ERK para o núcleo parece mediar diferentes eventos antiproliferativos como morte celular ou senescência.

CONCLUSÃO

A luz UVB induz a ativação de vias MAPK, inclusive de vias ativadas principalmente por mitógenos, como a via de ERK. A presença de galectina-3 apresenta uma função dual, induzindo uma resposta diferencial em melanomas e melanócitos. Em melanócitos, a presença de Gal-3 parece favorecer a sobrevivência após um estímulo de estresse como a luz UVB, enquanto em melanomas Gal-3 parece estar implicada em diferentes eventos dependendo do *background* celular. Assim, a inibição de Gal-3 regula a ativação de ERK, induzindo o acúmulo dessa molécula ativada e desencadeando respostas ERK dependentes capazes de controlar vias relacionadas com proliferação, necessária para o desenvolvimento e a progressão tumoral.

Por outro lado, a relação entre Gal-3 e ERK em melanomas mostra que a expressão de Gal-3 pode bloquear ou diminuir a resposta à sinais de estresse como UVB, seja impedindo a translocação de ERK para o núcleo, seja através de mecanismos ainda não esclarecidos.

CONCLUSÃO GERAL

Considerando os dados de ambos os capítulos é possível assinalar um possível papel para galectina-3 na resposta celular à irradiação UVB em melanócitos e melanomas. A presença desta molécula nesses tipos celulares possui papéis contrastantes, demonstrando a importância desta molécula dependendo do fenótipo celular. O silenciamento de galectina-3 leva ao aumento da morte celular em melanócitos após UVB, tanto em linhagens murinas como em humanas. O aumento da proliferação celular em melanomas humanos silenciados para galectina-3 mostrou que esse efeito está relacionado com a regulação de ERK. No entanto, em linhagens murinas que não expressam galectina-3, parece existir uma regulação da sobrevivência associada à JNK, outra MAPK. Isso comprova que galectina-3 pode apresentar múltiplas funções e interagir com diferentes moléculas, regulando diversos processos celulares. Estes resultados podem, em parte, modificar a noção de que galectina-3 intracelular favorece a sobrevivência celular, uma hipótese que tem sido proposta em diferentes contextos.

PROTOCOLO
Local: Pós-Graduação
Recebido por:
Data: Sp. 8/12/09

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/11/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1069/09**, intitulado: **"RESPOSTA MITOCONDRIAL E LOCALIZAÇÃO DE GALECTINA-3 EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE CELULAR"** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA.**

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

Pesquisador (a) Responsável: **Roger Chammas**
Pesquisador (a) Executante: **Silvina Odete Bustos**

CAPPesq, 05 de Novembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Prof. Dr. Roger Chammas
Chefe do Depto. de Radiologia
FMUSP

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

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. 1997 .Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family.Tumor Progression and Metastasis Program, Karmanos Cancer Institute, Detroit, Michigan 48201, USA *Cancer Res.* Dec 1;57(23):5272-6.

Albino, A. P, Nanus D. M, Mentle I. R, Cordon-Cardo, C., McNutt, N. S., Bressler, J. and Andreeff, M. 1987. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene*, 4:1363-1374.

Alexaki VI, Javelaud D, Mauviel A. 2008. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* Aug;21(4):429-38.

Anjum R, Blenis J.2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct;9(10):747-58.

Apostolova N, Gomez-Sucerquia LJ, Moran A, Alvarez A, Blas-Garcia A, Esplugues JV. 2010. Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. *Br J Pharmacol.* Aug;160(8):2069-84.

Bank, A, Darnell, J, Lodish, H. *Biologia cellular e molecular.* 4th.2002.Editorial Panamericana.

Baptiste TA, James A, Saria M, Ochieng J. 2007. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. *Exp Cell Res.* Feb 15;313(4):652-64.

Batista L, Kaina R, Menck C. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation research*, 681,197.208.2009

Bellei B, Maresca V, Flori E, Pitisci A, Larue L, Picardo M.2011. p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase. *J Biol Chem.* Mar 5;285(10):7288-99.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. 1987. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer.* Mar 15;39(3):414-8.

Berger,M, Hodis,E, Hefferman,T, Deribe, Y, Lawrence,M, Potopopovo,A*, et al*. 2012. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature .*485, 502–506. May24.

Besaratinia,A, Kim .S, Pfeifer.G. 2008. Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells. *The FASEB Journal.* 22.

Black AT, Gordon MK, Heck DE, Gallo MA, Laskin DL, Laskin JD. 2011 .UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* Apr 1;81(7):873-80.

Boni R, Schuster C, Nehrhoff B, Burg G. 2002. Epidemiology of skin cancer. *Neuro Endocrinol Lett.* Jul;23 Suppl 2:48-51.

Braeuer,R, Zigler,M, Kamiya,T.2011. Galectin-3 Contributes to Melanoma Growth and Metastasis via Regulation of NFAT1 and Autotaxin. *Cancer Res*. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2424.

Brown ER, Doig T, Anderson N, Brenn T, Doherty V, Xu Y, Bartlett JM, Smyth JF, Melton DW. 2012. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *Eur J Cancer.* Apr;48(6):865-74.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* Feb;25(3):1025-40.

Burack WR, Shaw AS. 2004 Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J Biol Chem.* Feb 4;280(5):3832-7.

Cadet,J, Mouret,S, Ravanat,J, Douki,T. 2012. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions. *Photochemistry and Photobiology.* Volume 88, Issue 5, 1048–1065.

Cagnol S, Chambard JC. 2010. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* Jan;277(1):2-21.

Cao J, Wan L, Hacker E, Dai X, Lenna S, Jimenez-Cervantes C, Wang Y, Leslie NR, Xu GX, Widlund HR, Ryu B, Alani RM, Dutton-Regester K, Goding CR,Hayward NK, Wei W, Cui R. 2013 .MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol Cell.* Aug 22;51(4):409-22.

Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM, Luévano-Martínez LA, Marazzi TB, Pessoa PS, Queliconi BB, Kowaltowski AJ. 2012. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jun 1-15;52(11-12):2201-8.

Casagrande F, Bacqueville D, Pillaire MJ, Malecaze F, Manenti S, Breton-Douillon M, Darbon JM. 1998. G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27Kip1 and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. *FEBS Lett.* Feb 6;422(3):385-90.

Chambers JW, LoGrasso PV. 2011. Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation*. J Biol Chem.* May 6;286(18):16052-62.

Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D.2011. Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* May;4(5):638-54.

Chen,W , Bowden,T. 1999. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-*fos* gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. Vol 18, N.52.

Chen H, Sharma B, Yu L, Zuberi R, Weng I, Kawakami Y, Kawakami,T, Hsu ,Liu F. Role de galectina-3 in mast cell functions: Galectin-3 deficient mast cells exhibit impaired mediator release and defective JNK expression.*The Journal of Inmunology*.2006,177:4991-4997.69.

Chuan S,Liu G, Yang J. 2000..Activation JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases by chromium (VI) es mediates through oxidative stress but does not affect cytotoxicity*. Carcinogenesis*. Vol 21 ,no 8,pp 1491-1500.

Claerhout. S, Laethem .A, Agostinis. P, Garmyn, M. 2006. Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. *Photochem. Photobiol.* Sci.;5:199-207.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. (1984) A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. 121147-1165.

Cooper, N, Barondes, S. 1999.God must love galectins; He made so many of them. Glycobiology. Vol 9, no 10: 979-984.

Cortat B, Garcia CC, Quinet A, Schuch AP, de Lima-Bessa KM, Menck CF. 2013. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochem Photobiol Sci.* Aug;12(8):1483-95.

Costa RA, Romagna CD, Pereira JL, Souza-Pinto NC. 2011. The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* Feb;43(1):25-9.

Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. 1995. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 1213-1217.

Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. 2006. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology.* Jul;16(7):602-11.

Deschênes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, Igelmann S, Mallette FA, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Saad F, Mes-Masson AM, Ferbeyre G. 2013. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev.* Apr 15;27(8):900-15.

D'Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L, Salmon I. 2013. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1 and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS One*. Jun 17;8(6):e67029.

Dodson M, Liang Q, Johnson MS, Redmann M, Fineberg N, Darley-Usmar VM, Zhang J. 2013. Inhibition of glycolysis attenuates 4-hydroxynonenal-dependent autophagy and exacerbates apoptosis in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Autophagy.* Sep 6;9(12).

Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV, Cohen MS, Johansen JV, Winther BR, Lund LR, Winther O, Taunton J, Hansen SH, Frödin M. 2009. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell.* Aug 28;35(4):511-22.

Dumic,J;Dabelic, S; Flogel,M. (2006) .Galectin-3: the open-ended story. *Biochim Biophys* Acta. 1760(4):616-35.

Dye,D, Medic,S, Ziman,M, Coombe,D. 2013. Melanoma biomolecules: independently identified but functionally intertwined. *Front. Oncol.* 24 September 2013. doi: 10.3389/fonc.2013.00252.

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. 2004. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem.* Aug 13;279(33):34922-30.

Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, Xu XC. 2002. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate*. Jan 1;50(1):64-70.

Elola, M, Wolfenstein-todel, C, Troncoso, M, Vasta, G, Rabinovish, G. 2007. *Cell Mol Life*, 64, 1679-1700.

Elwood, H, Jopson, J. 1997. Melanoma add sun exposure: an overview of published studies. *Int.J.cancer.* 73: 198.203.

Fabo, E, Noonan, F, Fears, T, Merlino, G. 2004. A Radiation Initiates Melanoma. *Cancer Res*. September 15, *64;*6372.

Feng, S, Xiong, L, Ji ,L, Cheng, W, Yang, H. 2011. Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. *Oncology letters*. June7. 899-903.

Figueira,T, Barros,M, Camargo,A, Castilho,R, Ferreira, J, Kowaltowsky,A, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species from molecular mechanisms to human health. Antioxid.Redox Signal.June 1;18 (16): 2029-7.

Friedman J, Kraus S, Hauptman Y, Schiff Y, Seger R. 2007. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem J.* Aug 1;405(3):559-68.

Fuchs-Tarlovsky V. 2013. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition.* 2013 Jan;29(1):15-21. doi: 10.1016/j.nut.2012.02.014.

Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, Nangia-Makker P, Elsamman E, Kasai T, Shono M, Kanayama HO, Ellerhorst J, Lotan R, Raz A. 2006. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. *Cancer Res.* Mar 15;66(6):3114-9.

Gasiev, I. Shaikhaev, O. 2006. Lesions of the mitochondrial genome and ways of its preservation*. Roussian journal of genetics*, volumen 44,n° 4.pp:373-388.

Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, Pennisi LF, Toller M, Iommarini L, Ghelli A, Moretti M, Betts CM, Martinelli GN, Ceroni AR, Curcio F, Carelli V, Rugolo M,Tallini G, Romeo G. 2008. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors.*Proc Natl Acad Sci U S A.* May 22;104(21):9001-6.

Gilchrest, B. 2013. Photoaging *Milestonse Cutaneous* Biology. June 28.

Govindarajan, B., Bai, X., Cohen, C., Zhong, H., Kilroy, S., Louis, G., Moses, M., Arbiser, J. L. 2003. Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling, J.Biol.Chem., 278(11), pp. 9790-9795.

Haberzettl P, Hill BG. 2013. Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response. *Redox Biol.* Jan 26;1(1):56-64.

Haluska.F, Hedi, F.1998.Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J.Clin.Oncologic*. 16:670-682.

Hanahan, D, Weinberg, RA. 2000. The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1), pp. 57-70.

Hanahan, D, Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-74.

Higuchi, M. 2012. Roles of Mitochondrial DNA Changes on Cancer Initiation and Progression. *Cell Biol*. October 25; 1 (2):109.

Hirabayashi, J, Kasai, K. 1993.The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution, *Glycobiology*. 3, 297–304.

Horikawa-Miura M, Matsuda N, Yoshida M, Okumura Y, Mori T, Watanabe M. 2007. The greater lethality of UVB radiation to cultured human cells is associated with the specific activation of a DNA damage-independent signaling pathway. *Radiat Res.* Jun;167(6):655-62.

Huang H-C, Chang T-M, Chang Y-J, Wen H-Y. 2013. UVB Irradiation Regulates ERK1/2- and p53-Dependent Thrombomodulin Expression in Human Keratinocytes*. PLoS ONE* 8(7): e67632.

INCA – Instituto Nacional do Câncer http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf

Iyama T, Wilson DM. 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. Aug;12(8):620-36. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015.

Jenkins, N, Grossman, D. 2013.Role of Melanin in Melanocyte Dysregulation of Reactive Oxygen Species. *Bio Med Reasearch Inter.* http://dx.doi.org/10.1155/2013/908797

Jiang, W, Zahurak, M., Goldenberg, D., Milman, Y., Park, H. L., Westra, W. H., Koch, W., Sidransky, D. and Califano, J. (2006), Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int. J. Cancer*, 119: 2673–2676.

Kamp DW, Shacter E, Weitzman SA.2011. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology*, Apr 30,25(5):400-10, 413.

Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. 2008 .Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion.*Cell*. Mar 7;132(5):818-31.

Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM.2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* Jan-Feb;8(1-2):152-62.

Kinner, A, Wu, W, Staudt, C and Iliakis.G.Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Researc*h, 2008, 1–17.

Kim DW, Kim KH, Yoo BC, Hong SH, Lim YC, Shin YK, Park JG. 2008. Identification of mitochondrial F(1)F(0)- ATP synthase interacting with galectin-3 in colon cancer cells. *Cancer Sci*. Oct;99(10):1884-91.

Kim K, Mayer E, M. 2003. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regultade by modified lipoproteins.*Biochimica et Biophysica acta.* 1642,;13.

Kim MY, Choi TY, Kim JH, Lee JH, Kim JG, Sohn KC, Yoon KS, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. 2010.MKK6 increases the melanocyte dendricity through the regulation of Rho family GTPases. *J Dermatol Sci.* Nov;60(2):114-9.

Kowaltoski A,Souza-Pinto N, Castilho R, Vercesi A. 2009. Mitochondria and Reactive Oxygen Species. Free radical .*Biology and Medicine.* 2009-07-24.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA,Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death *Cell Death Differ.* Jan;16(1):3-11.

Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Woitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T,Krüger R. 2010. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One.* Feb 23;5(2):e9367

Kyriakis JM, Avruch J. 2010. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.* Apr;92(2):689-737.

Larsen L, Chen HY, Saegusa J, Liu FT. 2011. Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci.* Nov;64(2):85-91.

Lee J, Giordano S, Zhang J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem J*.Jan 15;441(2):523-40. doi: 10.1042/BJ20111451.

Lee, H. C.,Wei, Y. H. 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 37, 822 – 834.

Levy R, Grafi-Cohen M, Kraiem Z, Kloog Y. 2010. Galectin-3 promotes chronic activation of K-Ras and differentiation block in malignant thyroid carcinomas. *Mol Cancer Ther.* Aug;9(8):2208-19.

Levy R, Biran A, Poirier F, Raz A, Kloog Y. 2011. Galectin-3 mediates cross-talk between K-Ras and Let-7c tumor suppressor microRNA. *PLoS One* ;6(11):e27490.

Li X, Ma Q, Wang J, Liu X, Yang Y, Zhao H, Wang Y, Jin Y, Zeng J, Li J, Song L, Li X, Li P, Qian X, Cao C. 2010. c-Abl and Arg tyrosine kinases regulate lysosomal degradation of the oncoprotein Galectin-3. *Cell Death Differ.* Aug;17(8):1277-87.

Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* Feb 25;6:19.

Lopez-Bergami, P. 2011. The role of mitogen- and stress-activated protein kinase pathways in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* Oct;24(5):902-21.

Liu, F, Rabinovich, G. A. 2005. Galectins as modulators of tumor. Progression. *Nat Rev Cancer*, 5: 29-41.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. 1995. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* Oct;147(4):1016-28.

Maben2010. http://archiv.ub.uniheidelberg.de/volltextserver/11169/1/100713 Stefan Dissertation FINAL.pdf e colaboradores 2010.

Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. 2013. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* Aug 28;32(17):2336-47.

Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, Djavaheri-Mergny M, Brnjic S, Zhang X, Hägg M, Linder S, Fais S, Codogno P, De Milito A. 2012. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress. *J Biol Chem.* Aug 31;287(36):30664-76.

Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. 2010. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic respons, *J Exp Med*. Aug 30;207(9):1981-93.

Markowska AI, Jefferies KC, Panjwani N.2011. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells. *J Biol Chem*. Aug 26;286(34):29913-21.

Matarrese, P, Tinari, N, Semeraroa, M. L, Natolib, C, Iacobelli, S, and Malorni, W. 2000. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Lett*. 473: 311-315.

Mazurek N, Sun YJ, Price JE, Ramdas L, Schober W, Nangia-Makker P, Byrd JC, Raz,A, BresalierRS.2005. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epitelial cells via modulation of unique sets of genes. *Cancer Res.* Dec 1;65(23).

Meyskens FL Jr, McNulty SE, Buckmeier JA, Tohidian NB, Spillane TJ, Kahlon RS, Gonzalez RI. 2001. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med*. Sep 15;31(6):799-808.

Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M. 2008. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* Dec;173(6):1839-52.

Munshi A, Ramesh R. 2013. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes Cancer.* Sep;4(9-10):401-408.

Muthusamy V, Piva TJ. 2013. UVB-stimulated TNFα release from human melanocyte and melanoma cells is mediated by p38 MAPK. *Int J Mol Sci.* Aug 19;14(8):17029-54.

Nakahara S, Oka N, Raz A. 2005. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.* Mar;10(2):267-75.

Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. 2000. Galectin-endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 156: 899-90.

Nangia-Makker P, Balan V, Raz A. 2008. Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron.* Dec;1(1):43-51.

Newlaczyl AU, Yu LG. 2011. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett*. Dec 27;313(2):123-8.

Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, Cadet J, Douki T, Mouret S, Tucker MA, Popratiloff A, Merlino G, De Fabo EC. 2012. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun*. Jun 6;3:884. doi: 10.1038/ncomms1893.

Oba-Shinjo, S. M., Correa, M., Ricca, T. I, Molognoni, F., Pinhal, M. A., Neves I. A., Marie, S. K, Sampaio, L. O, Nader, H. B., Chammas, R and Jasiulionis, M. G. 2006. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia* 8(3):231-241.

Ortolan TG, Menck CFM. 2013. UVB-Induced Cell Death Signaling Is Associated with G1-S Progression and Transcription Inhibition in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE.* 8(10): e76936.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. 2001. *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9):e45.

Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta.* Sep;1813(9):1619-33.

Prieto V, Zeidan A, Melnikoa O, Johnson M, Lopez A, Diwan A, Lazar A, Shen S, Zhang P, Reed J, Gershenwalnd J, Raz A, Eli B. 2006. Galectin-3 expression in associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. *Clinical Cancer Res*. 12(22):6709-15.

Pustisek N, Situm M. 2011. UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol*. Sep;35 Suppl 2:339-41.

Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. 2005. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician*. Jul 15;72(2):269-76.

Reticker-Flynn NE, Malta DF, Winslow MM, Lamar JM, Xu MJ, Underhill GH, Hynes RO, Jacks TE, Bhatia SN.2013. A combinatorial extracellular matrix platform identifies cell-extracellular matrix interactions that correlate with metastasis. *Nat Commun*. 3:1122.

Ron, D. & Walter, P. 2007 Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.

Ronai, Z. 2013. The masters talk: the PGC-1α-MITF axis as a melanoma energizer. *Pigment Cell Melanoma Res.* Mar 8.23.

Roos WP, Kaina B. 2006 DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006 Sep;12(9):440-50. Epub 2006 Aug 8.

Saegusa, J, Hsu, D, Kuwabara I, Kuwabara, Y,Yu.L and Liu. F. 2008. Galectin-3 protects keratinocytes from UV-B Induced apoptosis by enhancing AKT

activation and suppressing ERK activation. *J.of investigative Dermatology.* Oct;128(10):2403-11.

Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. 2008. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res*. May;6(5):751-9.

Shimizu S, Konishi A, Nishida Y, Mizuta T, Nishina H, Yamamoto A, Tsujimoto Y. 2010. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene.* Apr 8;29(14):2070-82.

Shoag J, Haq R, Zhang M, Liu L, Rowe GC, Jiang A, Koulisis N, Farrel C, Amos CI, Wei Q, Lee JE, Zhang J, Kupper TS, Qureshi AA, Cui R, Han J, Fisher DE,Arany Z. 2013. PGC-1 coactivators regulate MITF and the tanning response. *Mol Cell.*Jan 10;49(1):145-57.

Singh KK, Ayyasamy V, Owens KM, Koul MS, Vujcic M. 2009. Mutations in mitochondrial DNA polymerase-gamma promote breast tumorigenesis. *J Hum Genet.* Sep;54(9):516-24.

Song, N. Mosby, J. Yang, A. Xu, Z. Abdel-Malek and A. L. Kadekaro, 2009 alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes, *Pigm. Cell Melanoma Res.* 22.

Song S, Ji B, Ramachandran V, Wang H, Hafley M, Logsdon C, Bresalier RS. 2012. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLoS One*.;7(8):e42699.

Solus JF, Kraft S. 2011. Ras, Raf, and MAP kinase in melanoma. *Adv Anat Pathol*. Jul;20(4):217-26.

Souza GA, Godoy LM, Teixeira VR, Otake AH, Sabino A, Rosa JC, Dinarte AR, Pinheiro DG, Silva WA Jr, Eberlin MN, Chammas R, Greene L. 2006. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation.J.*Proteomics*. Mar;6(5):1460-70.

Strozyk,E, Kums,D. 2013.The Role of AKT/mTOR Pathway in Stress Response to UV-Irradiation: Implication in Skin Carcinogenesis by Regulation of Apoptosis, Autophagy and Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*(8), 15260-15285.

Suzuki Y, Inoue T, Yoshimaru T, Ra C. 2008. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* May;1783(5):924-34.

Tournier, C.2013. The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes Cancer.* Sep;4(9-10):397-400.

Toussaint O, Medrano EE, Von Zglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol.* Oct;35(8):927-45;

Tsujimoto Y, Shimizu S. 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.* Nov;12 Suppl 2:1528-34.

Uong A, Zon LI. 2010. Melanocytes in development and cancer*. J Cell Physiol.*, Jan;222(1):38-4.

Van Stijn CM, van den Broek M, van de Weerd R, Visser M, Taşdelen I, Tefsen B, van Die. 2009. Regulation of expression and secretion of galectin-3 in human monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol.* Oct;46(16):3292-9.

Videira,I Moura,D, Wang,S. 2010. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 88(1):76.

Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, Clish CB, Granter SR, Widlund HR, Spiegelman BM, Puigserver P. 2013. PGC1α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell.* Mar 18;23(3):287-301.

Weinberger PM, Adam BL, Gourin CG, Moretz WH 3rd, Bollag RJ, Wang BY, Liu Z, Lee JR, Terris DJ. 2007. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* May;133(5):503-10.

Whiteman.D, Gree .A. 1999Melanoma add sun exposure: where are we now? *Int.J.Dermatologic* 7-489.

Wittgen HG, van Kempen LC. 2007. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res*. Dec;17(6):400-9.

Wu KL, Huang EY, Jhu EW, Huang YH, Su WH, Chuang PC, Yang KD. 2013. Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway. *J Gastroenterol.* Mar;48(3):350-9.

Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, Chen T, Wei Q, Qin C. 2013. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. Dec 11;587(24):3986-94.

Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. 2012. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* Jan 15;513(1):1-13.

Yu.F, Finley, R, Raz, A,Kima, C. 2002. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondira. *The journal of biological chemistry.* Vol 18.N° 18.

Yu, Y. 2013. Galectin-3: A New Target for Tumor Immunotherapy. *Single Cell Biol.* 2: e116.

Zaidi MR, Day CP, Merlino G. 2008 From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol*. Oct;128(10):2381-91.

Zhang W, Liu HT. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* Mar;12(1):9-18.

Zehorai E, Seger R. 2013. Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases*. Mol Cell Biol.*14 Jan;34(2):259-70.

Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. 2011 .Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* Jun 3;711(1-2):167-73. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015.

Zhang JY, Selim MA. 2012. The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer. *Am J Cancer Res.*2(6):691-8.