ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO

**Modulação da expressão de galectina-3 frente às
pressões seletivas de pH e oxigenação: um
mecanismo para a heterogeneidade
intratumoral?**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: Dr. Roger Chammas

**São Paulo
2014**

ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO

**Modulação da expressão de galectina-3 frente às
pressões seletivas de pH e oxigenação: um
mecanismo para a heterogeneidade
intratumoral?**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: 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

Cardoso, Ana Carolina Ferreira

Modulação da expressão de galectina-3 frente às pressões seletivas de pH e oxigenação : um mecanismo para a heterogeneidade intratumoral? / Ana Carolina Ferreira Cardoso. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Melanoma 2.Lectinas 3.Galectina 3 4.Hipóxia 5.Acidose

USP/FM/DBD-351/14

DEDICATÓRIA

A Deus

Aos meus pais, Zélia e Reis

À minha avó Maria

À minha tia Nena (*in
memorian*) e todos os pacientes
com câncer

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roger Chammas**, primeiramente pela oportunidade de ser aluna integrante do seu grupo, pelo exemplo de honestidade, ética e dedicação na pesquisa, além do incentivo da crítica profissional e dos inúmeros conhecimentos compartilhados sempre com tanta humildade.

À **Dra. Luciana Andrade**, “mãe”, “âncora” e mentora científica, além da amizade, das conversas filosóficas, das inúmeras risadas, do incentivo, da sinceridade e das tantas coisas em comum. Pela ajuda no aperfeiçoamento da minha disciplina e crítica científica, no meu amadurecimento profissional e no resgate dos princípios da ciência. Toda a ajuda durante a construção desse trabalho foi imensamente fundamental.

Aos integrantes do **Laboratório de Biologia Celular**: Adalberto, Alexandre, Andréia, Angélica, Camila MM, Camila Machado, Carol Rosal, Cíntia, Iara, Karina, Lizeth, Luciana Andrade, Luciana Pescatore, Mariana, Mauro, Mayara, Priscila, Rafael, Renata, Silvia, Silvina, Tharcísio, Tuty, pela convivência diária com conversas pessoais e profissionais, pelo apoio e incentivo em tantos momentos, pela ajuda e conhecimento compartilhado, todos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Grupo de Apoio CTO-ICESP**: Willame, Liliane, Luíz e Luciana Martins, e também à **Adriana e Lara**, por todo o suporte para a realização prática desse trabalho.

À **Naieli, Natália, Silvina, Re, Carol, Lourival e Jimena**, pelas conversas e trocas de “angustias científicas” que fizeram concretizar a importância da interação entre os grupos, além da amizade formada.

Ao grupo de **Patologia CTO – ICESP**, pelo processamento dos materiais *ex vivo* e posterior confecção das lâminas para imunoistoquímica.

À **Sueli Nonogaki**, pela padronização e realização das reações de imunoistoquímica.

À **Margarita Cortes**, médica patologista, pela ajuda na análise e quantificação das lâminas de imunoistoquímica.

À **Cristina Santos Silva**, aluna de iniciação científica responsável pela produção dos clones celulares Tm1MT DE Luc 2, além da ajuda durante o período em que esteve no laboratório.

Ao **Prof. Dr. Marcelo de Carvalho** (INCA) pela gentil doação das linhagens celulares SK-MEL-37 shGal3 e SK-MEL-37 sh*Scramble*.

Aos meus pais, **Zélia** e **Reis**, primeiramente pela educação que me proporcionaram, pelos valores de bondade, humildade, fé e respeito passados com tanta dedicação ao longo de todos esses anos. Por todos os momentos de dificuldades, desafios e alegrias vividos desde a escolha até o presente momento da minha carreira profissional.

À minha **vó Maria**, por cada sorriso e desejo de “um bom dia” emitidos a cada manhã. Sua força e fragilidade, duas características tão antagônicas, descrevem uma das mulheres que mais tenho orgulho nessa vida.

À minha **tia Nena**, junto a Deus, minha querida segunda mãe, sempre exemplo de dedicação e abdicção. Minha cúmplice, minha formadora, me deixa sem palavras e restam as lágrimas de saudade. Obrigada pelo seu incentivo e apoio sempre imediatos.

Ao meu **tio Fredo** e **tio Gaspar**, que também colaboraram com o meu aperfeiçoamento e aprendizado, além da relação familiar.

Ao **Ricardo**, por te acreditado e investido tanto em mim. Parceiro de tantos anos presenciou o meu melhor e também o meu pior, mas com dedicação invejável esteve inteiramente presente até o fim. Sei que ainda torce pela minha vitória, assim como eu também torço. Obrigada por tudo.

À **Renata**, amizade de anos que sempre esteve presente para me acolher, me mostrar uma forma de enxergar a vida tão característica e para me encher de risadas e bons momentos.

A uma pessoa Linda que se fez presente na minha vida ao longo do último ano, responsável por intensas mudanças, aprendizados e por fazer despertar um sentimento tão bonito em mim. Por você os meus olhos enxergaram além das aparências e além das convenções, revelando um lugar onde gostaria de poder sempre habitar.

À Carol, Wesley, Prof^a Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, o meu imenso agradecimento pela oportunidade inicial na minha caminhada profissional. Carol e Wesley por terem sido meus “pais” científicos, obrigada pela paciência e por todo o conhecimento compartilhado com tanta dedicação. Esses momentos iniciais foram fundamentais para a construção do meu aprendizado hoje. E, além disso, obrigada pela amizade formada fora do laboratório, vocês são muito especiais.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à CAPES/CNPq, pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço, de forma geral, a todas as pessoas que marcaram um momento, passado ou presente, em minha memória e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do meu desenvolvimento profissional.

“Try not to become a man of success, but rather try to become a man of value.”

Albert Einstein

“In different contexts, cells do different things.”

Mina Bissell

“It is not the strongest or the most intelligent who will survive but those who can best manage change.”

Charles Darwin

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL E EVOLUÇÃO TUMORAL.....	1
1.2 METABOLISMO TUMORAL	4
1.3 LECTINAS E GALECTINAS	8
1.4 GALECTINA-3 E CÂNCER.....	10
2. OBJETIVOS	19
3. MÉTODOS.....	21
3.1 MODELOS	21
<i>Linhagens celulares.....</i>	<i>21</i>
<i>Estabelecimento dos explantes tumorais.....</i>	<i>22</i>
<i>Modelos Animais</i>	<i>23</i>
3.2 ENSAIOS IN VITRO	24
<i>Exposição das células SK-MEL-37, Melan-a, Tm1M e explante à acidez</i>	<i>24</i>
<i>Exposição da linhagem SK-MEL-37 à hipóxia aguda e intermitente</i>	<i>25</i>
3.3 ENSAIOS IN VIVO	26
<i>Modelo experimental dos implantes subcutâneos de melanoma</i>	<i>26</i>
<i>Acompanhamento do crescimento tumoral por bioluminescência</i>	<i>27</i>
3.4 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA E DO NÍVEL PROTEICO DE GALECTINA-3	27
<i>Extração de RNA</i>	<i>27</i>
<i>Produção de cDNA</i>	<i>28</i>
<i>PCR quantitativa (qRT-PCR).....</i>	<i>29</i>
<i>Extração de Proteínas</i>	<i>30</i>
<i>Western Blot.....</i>	<i>31</i>
<i>Verificação de galectina-3 extracelular e intracelular por citometria de fluxo.....</i>	<i>32</i>
<i>Verificação de galectina-3 por imunistoquímica</i>	<i>33</i>
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS	35
4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM AMOSTRAS DE	
PACIENTES COM MELANOMA	35
4.2 A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 É MODULADA IN VIVO EM MODELO DE	
MELANOMA MURINO	37
4.3 A HIPÓXIA NÃO FOI CAPAZ DE MODULAR A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM	
MELANOMA HUMANO	45
4.4 A ACIDOSE MODULA NEGATIVAMENTE A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3	50
4.5 A EXPRESSÃO HETEROGÊNEA DE GALECTINA-3 FAVORECE O CRESCIMENTO TUMORAL	56
4.6 A FRAÇÃO DE CÉLULAS GALECTINA-3 NEGATIVAS SE MANTÉM AO LONGO DO	
CRESCIMENTO TUMORAL.....	64
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES.....	84

ANEXO A	85
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA USO DOS CAMUNDONGOS C57BL6.....	85
ANEXO B	86
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA USO DOS CAMUNDONGOS BALB/C NUDE	86
ANEXO C	87
CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA (CIBIO) DO DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	87
7. BIBLIOGRAFIA	88

RESUMO

Cardoso ACF. Modulação da expressão de galectina-3 frente às pressões seletivas de pH e oxigenação: um mecanismo para a heterogeneidade intratumoral? [Dissertação]. São Paulo - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A heterogeneidade intratumoral é um fenômeno extremamente importante para entender a progressão tumoral e a resposta à intervenção terapêutica. A galectina-3 pertence à família das lectinas, possuem a função de reconhecimento e ligação à β -galactosídeos ramificados de glicolipídeos e glicoproteínas, e está envolvida em processos fisiológicos e patológicos como o câncer. Nesse trabalho, a heterogeneidade intratumoral em relação à expressão de galectina-3 foi observada em amostras de diferentes lesões melanocíticas de pacientes. Além disso, o inóculo de células de melanoma murino negativas para galectina-3 em animais $gal3^{-/-}$ gerou tumores constituídos por uma fração de células tumorais que passaram a expressar *de novo* galectina-3, sugerindo que pressões do microambiente tumoral modulam a expressão dessa lectina em melanomas. A acidose extracelular atuou como regulador negativo de galectina-3 *in vitro*, diminuindo a expressão dessa lectina tanto em células de melanoma murino e humano quanto em melanócito murino. Entretanto, a hipóxia, seja pela exposição aguda ou intermitente, não alterou a expressão *in vitro* de galectina-3 em células de melanoma humano. Por fim, tumores originados pelo inóculo de células tumorais positivas e negativas para galectina-3 (mimetizando tumores heterogêneos) obtiveram a maior taxa de crescimento tumoral comparados aos tumores constituídos por uma única população de células, seja positiva ou negativa para galectina-3. Portanto, foram apresentadas evidências de que a heterogeneidade intratumoral em relação à galectina-3 parece estar envolvida com o sucesso evolutivo do melanoma e que a acidose é indicada como uma das pressões microambientais que contribuem para o estabelecimento e manutenção da fração de células tumorais negativas para galectina-3 dentro da massa tumoral.

Descritores: Melanoma, Lectinas, Galectina-3, Hipóxia, Acidose

ABSTRACT

Cardoso ACF. Modulation of galectin-3 expression regarding to pH and oxygenation selective pressures: a mechanism for intratumoral heterogeneity? [Dissertation]. São Paulo – “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

The intratumoral heterogeneity observed in human tumors is extremely important to understand tumor progression and its therapeutic response. Galectin-3 belongs to animal lectin family and it is a β -galactosidase binding protein which is involved in physiological and pathological processes, including cancer. In this work, an intratumor heterogeneous galectin-3 expression was observed in tissue sections containing different human melanocytic lesions. Moreover, negative galectin-3 murine cells injected into $gal3^{-/-}$ mice were able to generate tumors composed of a positive galectin-3 cell fraction, suggesting that selective forces in tumor microenvironment modulate galectin-3 expression in melanoma. Extracellular acidosis acts as a negative regulator to galectin-3 *in vitro*, decreasing its expression in murine and human melanoma cells and even in murine melanocytes. However, intermittent or acute hypoxia exposure did not alter galectin-3 expression in human melanoma cells *in vitro*. In addition, tumors originated from a mixture of positive and negative galectin-3 cells (mimicking heterogeneous tumors) showed higher growth rate compared to those derived from only galectin-3 positive or negative cells. Therefore, we showed evidences that galectin-3 intratumoral heterogeneity seems to be involved with the evolutionary success of melanoma and that acidosis may be the microenvironmental pressure responsible for the establishment and maintenance of galectin-3 negative cell fraction into the tumor bulk.

Descriptors: Melanoma, Lectins, Galectin-3, Hypoxia, Acidosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Heterogeneidade intratumoral e evolução tumoral

Câncer pode ser descrito como o resultado de mutações diferencialmente acumuladas em uma população de células geneticamente instáveis que, somada à interação com o microambiente tecidual, resulta em um crescimento celular descontrolado (DIAZ-CANO, 2012). Durante a carcinogênese e progressão tumoral, as células tumorais adquirem algumas propriedades importantes para o seu estabelecimento e manutenção que as diferem das características encontradas em células normais. Essas propriedades incluem a manutenção da auto-replicação (potencial replicativo ilimitado por desregulação do ciclo celular e aumento da atividade da telomerase), a sobrevivência celular aumentada (parada de ciclo celular, desregulação da apoptose e resistência à morte celular), a alta instabilidade genética, a desregulação do metabolismo energético, evasão do sistema imune, entre outras (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

No entanto, nem todas as células dentro do tumor possuem necessariamente as mesmas características, sendo que tais propriedades citadas anteriormente são diferencialmente encontradas em subpopulações de células tumorais, contribuindo para o fato de a maioria dos tumores humanos apresentar uma heterogeneidade em muitas características morfológicas e fisiológicas, como potencial invasivo, angiogênico, proliferativo, expressão gênica e metabolismo (MARUSYK; POLYAK, 2010). A heterogeneidade fenotípica intratumoral é um fenômeno complexo que integra tanto a

diversidade de origem genética quanto a de origem não genética. O aumento da instabilidade genética proveniente da alta taxa mutacional se traduz em diferenças fenotípicas entre as células tumorais e, após as múltiplas divisões celulares necessárias para a formação do tumor macroscópico, tal diversidade genotípica se torna ainda mais proeminente. Esse evento é denominado evolução clonal, onde há a coexistência de inúmeras subpopulações geneticamente distintas que divergiram ao longo do tempo. Dessa forma, o câncer é retratado como o resultado das forças de seleção que agem sobre essas diferentes subpopulações, o que é considerado um processo essencialmente Darwiniano, uma vez que a diversidade genotípica é herdável e os fenótipos são “testados” pela seleção, resultando no favorecimento das populações com o maior *fitness* (MARUSYK e POLYAK, 2010; DIAZ-CANO, 2012; ALMENDRO, et al., 2013).

Porém, a diversidade fenotípica não é limitada às diferenças que ocorrem na sequência do DNA, ela também integra a diversidade de origem não genética que pode surgir de mecanismos epigenéticos, da plasticidade fenotípica e da diferenciação de células tronco tumorais. A definição para o termo epigenética é o estudo das mudanças na expressão gênica que não são atribuídas por alterações na sequência de DNA (HOLLIDAY, 2006). O desenvolvimento do câncer é associado com inúmeras alterações epigenéticas que afetam aspectos da biologia celular e os estados de diferenciação, como o silenciamento de genes supressores tumorais e genes envolvidos na regulação da diferenciação de células epiteliais. Dois aspectos interessantes a respeito da epigenética são, primeiro, o silenciamento epigenético que frequentemente afeta várias regiões do genoma, o que gera consequências fenotípicas mais complexas que as provenientes de uma mutação específica em um único gene, por exemplo.

Segundo, ela pode ser um evento reversível após múltiplos ciclos de duplicação celular, sendo que os fenótipos provenientes desse mecanismo não são fixos e, portanto, contribuem para a diversidade intratumoral (Revisado em ALMENDRO, et al., 2013).

Em adição à visão central da diversidade genotípica ser determinante para a diversidade fenotípica, surge também o paradigma das células tronco tumorais. Essa hipótese propõe a existência de subpopulações de células tumorais que possuem elevada habilidade de regenerar tumores quando implantadas experimentalmente em animais apropriados, o que torna implícita a capacidade dessas células de se dividirem assimetricamente, originando progênes que mantêm essa característica de célula tronco tumoral (com potencial de auto-renovação) assim como progênes que se diferenciam em outros subtipos celulares, os quais irão formar a massa tumoral (VALENT, et al., 2012). Diversos estudos identificaram populações de células tumorais que possuem a habilidade de iniciar tumores em modelos experimentais, e esses modelos incluem não só os tumores de origem hematopoiética (os quais foram primeiramente descritos por possuírem essa hierarquia), mas também os tumores sólidos, como mama, cérebro, pâncreas, pulmão, entre outros. Dessa forma, a heterogeneidade fenotípica intratumoral também pode ser reflexo dessa hierarquia de diferenciação similar à encontrada nos tecidos normais (Revisado em KRESO; DICK, 2014).

Além disso, distintos cenários regionais do microambiente tumoral contribuem para a heterogeneidade como os níveis de isquemia e acidez na massa tumoral, ação da quimioterapia e radioterapia, presença de fatores de crescimento, interação bidirecional entre as células tumorais e células do estroma e mecanismos de transferência intercelular de informação (microvesículas e exossomos) (Revisado em HOLLIDAY, 2006; DIAZ-CANO, 2012). Resumindo, a heterogeneidade demonstra ter um forte

impacto para a progressão tumoral através de dois aspectos principais: a variabilidade fenotípica fornece um amplo “material” por onde as forças de seleção podem atuar, e, além disso, a coexistência dessas subpopulações pode resultar em uma complexa rede de interações biológicas (AXELROD, et al., 2006). Portanto, a heterogeneidade intratumoral *per se* e a forma como ela evolui durante a progressão tumoral impõe grande desafio para uma efetiva terapia contra o câncer, uma vez que o diagnóstico e a terapia são baseados em biópsias de pequenas regiões do tumor, as quais podem não necessariamente representar as informações biológicas do tumor como um todo (ALMENDRO, et al., 2013).

1.2 *Metabolismo tumoral*

Com o aumento da massa celular de tumores sólidos e posterior distanciamento de vasos sanguíneos ($>100\mu\text{m}$), uma importante barreira encontrada em tumores é a baixa capacidade de difusão de substratos e metabólitos, resultando em flutuações na concentração de íons H^+ , glicose, oxigênio e outros nutrientes. Problemas no fluxo sanguíneo como anormalidades e má organização dos vasos da microcirculação e a baixa pressão sanguínea, que culminam numa vascularização tumoral comprometida, também são agravantes nesse fenômeno de baixa tensão de oxigênio e fluxo diminuído de nutrientes, fatores de crescimento e moléculas de sinalização. Essas condições fisiológicas, juntamente com o perfil genético variável das células tumorais causado por eventos oncogênicos, resultam no desenvolvimento de um tecido tumoral altamente heterogêneo, caracterizado, entre outras coisas, por possuir regiões de hipóxia e acidose (RAGHUNAND, et al., 2003; FANG, et al., 2008).

Por isso, a sobrevivência e a adaptação celular frente essas condições de pressão ambiental é fundamental para a continuação da carcinogênese. O oxigênio é uma molécula central da respiração celular, servindo comoceptor final de elétrons da fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria, gerando energia a partir da glicose capaz de sustentar a sobrevivência celular e a manutenção dos organismos multicelulares (SEMENZA, 2012). Em tecidos normalmente oxigenados (normóxia), a glicose, que é a principal fonte de energia celular, entra na célula através da família de transportadores de glicose (GLUTs) e passa pelos primeiros passos do metabolismo, a glicólise, nos quais será gerada a molécula de piruvato, que por sua vez entra na mitocôndria e é novamente metabolizado no ciclo de Krebs gerando CO_2 , H_2O e um saldo final de 38 moléculas de ATP por uma molécula de glicose. Entretanto, em condições de baixo fornecimento de oxigênio (hipóxia), o metabolismo aeróbico descrito anteriormente é inibido e o piruvato é reduzido a lactato ainda no citoplasma para a geração de apenas 2 moléculas de ATP/glicose (FANG, et al., 2008). Portanto, devido à alta eficiência do metabolismo aeróbico, a glicólise é um processo menos ativo em condições de normóxia e, alternativamente, se torna mais ativo em condições de hipóxia, um fenômeno descrito como Efeito Pasteur (RACKER, 1974).

De fato, uma ocorrência comum nos tumores é a geração de diferentes tipos de adaptações celulares frente às condições de hipóxia, como se pode citar principalmente a alteração para o metabolismo glicolítico, descrita acima, a diminuição da proliferação celular, o aumento da migração e invasão e o aumento da angiogênese (GATENBY; GILLIES, 2004). Essas mudanças ocorrem como consequência do remodelamento de um programa transcricional ativado principalmente pelo fator de transcrição HIF (*Hypoxia-Inducible Factor* – Fator Induzível por Hipóxia), que funciona como um

sensor de oxigênio o qual, na ausência deste, ativa a transcrição de genes executores dessas respostas adaptativas, incluindo transportadores de glicose e lactato, enzimas glicolíticas, fatores e receptores pró-angiogênicos, transportadores de íons, entre outros (SEMENZA, 2012). Além disso, é válido ressaltar que a glicólise não só é capaz de gerar energia (2ATP/glicose), mas também favorece a síntese de nucleotídeos, aminoácidos e lipídeos requeridos para a produção de novas células durante a expansão tumoral (DEBERARDINIS, et al., 2008). Portanto, a hipóxia é o gatilho para essa alteração através no metabolismo glicolítico que, apesar de menos eficiente, garante a produção de energia necessária para a sobrevivência e proliferação sustentada das células tumorais.

Como consequência do metabolismo alterado, as células tumorais produzem um excesso de produtos metabólicos ácidos, incluindo ácido lático, prótons e dióxido de carbono. A concentração desses metabólitos aumenta no lúmen, levando à diminuição considerável do pH intracelular (pHi), o que é extremamente citotóxico e pode ocasionar a morte celular através da indução de apoptose (LAGADIC-GOSSMANN, et al, 2004). Para recuperar a acentuada acidificação do pHi, as células tumorais dispõem de mecanismos para remoção do excesso de prótons e manutenção do pHi fisiológico, que é a chamada maquinaria reguladora de pH composta por transportadores e trocadores de íons. A maioria dos constituintes dessa maquinaria são moléculas responsivas às variações de pH e são ativadas, portanto, quando o pHi assume valores ácidos incompatíveis com os processos de sinalização e biossíntese celular. A regulação do pH se inicia com alterações tanto de expressão quanto de atividade molecular, sendo que o objetivo principal é retornar o pHi para os valores alcalinos fisiológicos (pH 7,2) favoráveis para a homeostasia celular (SEDLAKOVA, et al., 2014).

A maquinaria reguladora do pH possui dois braços principais: as moléculas responsáveis pelo exporte de lactato e prótons, e as moléculas responsáveis pelo importe de bicarbonato, de forma que a ação coordenada desses braços garantem a regulação do pH_i em contrapartida da acidificação do meio extracelular, sendo os valores do pH extracelular (pH_e) variando entre 6,6 a 6,9 (SEDLAKOVA, et al., 2014). Essa acidose pericelular é geralmente persistente, uma vez que os produtos metabólicos ácidos não são efetivamente removidos do meio intersticial justamente pela limitada taxa de difusão devida à vascularização anormal dos tumores (RAGHUNAND, et al., 2003).

Portanto, a hipóxia e a acidose produzem efeitos similares no que diz respeito à alteração fenotípica e adaptação das células tumorais, uma vez que essas condições são capazes de influenciar o programa de expressão gênica e transdução de sinais dessas células. Diversas correlações entre essas condições microambientais e fenômenos biológicos são descritos na literatura, como associação ao mecanismo de radio e quimioresistência, supressão da resposta imune adquirida, indução de inflamação e resposta imune inata e da dediferenciação celular, além de favorecer a invasão e metástase tumoral por destruição de células normais adjacentes que não são capazes de suportar tais condições de estresse, aumento da degradação da matriz extracelular e promoção da angiogênese (SEDLAKOVA, et al., 2014). A acidose também está correlacionada com alguns fenômenos celulares como aneuploidia, eventos mutagênicos e clastogênicos (que promovem alterações nos cromossomos), autofagia, sobrevivência, migração e liberação de exossomos (Revisado em GATENBY e GILLIES, 2004; GILLIES e GATENBY, 2007).

1.3 *Lectinas e galectinas*

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos ramificados de glicolipídeos de glicoproteínas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, podendo desempenhar distintas funções biológicas. A ligação aos carboidratos é desempenhada pelo domínio altamente conservado de reconhecimento a carboidratos (*Carbohydrate Recognition Domains* – CRDs). Por essa característica, o domínio CRD é utilizado para categorizar a maioria das lectinas descritas até então em famílias e superfamílias estruturalmente relacionadas (LIU e RABINOVICH, 2005; GHAZARIAN, et al., 2011).

As galectinas formam uma das famílias das lectinas de origem animal, as quais foram assim classificadas por compartilharem uma sequência altamente conservada no domínio CRD com cerca de 130 aminoácidos e por terem afinidade de ligação por β -galactosídeos (LIU, et al., 2002). Por sua vez, a comparação entre a sequência de aminoácidos das galectinas permitiu a divisão dessas proteínas em três subfamílias, baseada no conteúdo e organização dos seus domínios. O grupo prototipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15) contém um único domínio, o CRD, e seus membros existem como monômeros ou homodímeros. O grupo *tandem repeat* (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) possui dois domínios CRD diferentes conectados por um polipeptídeo de até 70 aminoácidos. E por fim o grupo quimera, que até o momento é representado por um único membro, a galectina-3, a qual possui um único domínio CRD ligado a um domínio N-terminal por uma cadeia peptídica rica em prolina e glicina, podendo existir na forma de monômeros e oligômeros. Portanto, as galectinas podem formar diversas

estruturas ordenadas com seus respectivos glicoligantes (Figura 1) (Revisado em RABINOVICH e TOSCANO, 2009; BOSCHER, et al., 2011).

a. Grupo Prototipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15)

b. Grupo Quimera (galectina-3)

c. Grupo Tandem Repeat (galectina-4, -6, -8, -9 e -12)

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos três grupos da família galectinas: (a) grupo prototipo, (b) grupo quimera e (c) grupo *tandem repeat*, e os distintos tipos de arranjos conformacionais hipotéticos que podem ser formados entre as galectinas e seus ligantes. Modificado de YANG, et al., (2008).

Os membros da família galectina não possuem a clássica sequência sinal responsável pela via de secreção proteica, porém todos eles podem ser encontrados no meio extracelular e o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não foi totalmente identificado (RABINOVICH; TOSCANO, 2009). Assim, as galectinas podem ser encontradas no citoplasma, núcleo, vesículas intracelulares, associadas à superfície da membrana celular e no meio extracelular. No meio extracelular, as galectinas podem se

ligar a uma gama de glicanos de superfície celular ou da matriz extracelular através da interação pelo domínio CRD, porém, na porção intracelular, as galectinas são mostradas por interagirem com outras proteínas de maneira independente do reconhecimento pelo domínio CRD. Dessa forma, as galectinas são capazes de desencadear uma cascata de sinalização intracelular responsável por modular processos como diferenciação celular, proliferação, sobrevivência, e migração (LIU; RABINOVICH, 2010).

No câncer, a expressão das galectinas está alterada quando comparada aos níveis fisiológicos normais encontrados para determinado tecido. Geralmente o que se encontra relatado é o aumento de expressão de algumas galectinas pelas células tumorais e pelas células do estroma associadas ao tumor, sendo que essa alteração na expressão está correlacionada com a agressividade e aquisição de fenótipos mais invasivos e metastáticos em diferentes tipos de tumores, indicando a potencialidade das galectinas em modular a progressão tumoral, assim como influenciar a recorrência dessa doença (Revisado em LIU; RABINOVICH, 2005).

1.4 *Galectina-3 e câncer*

A galectina-3 é uma lectina de aproximadamente 31 kDa (humana) que pode ser localizada intra e extracelularmente, sendo no meio intracelular encontrada no núcleo, citoplasma, mitocôndria e em compartimentos vesiculares (LIU, et al., 2002). Ela possui basicamente três domínios estruturais: (1) o domínio NH₂-terminal de 12 aminoácidos que contém dois sítios de fosforilação em serina, já descrito por serem importantes na regulação da sua função e localização nuclear/citoplasmática; (2) o domínio de sequência semelhante ao colágeno rico prolina, glicina e tirosina, o qual pode ser

clivado por metaloproteinases da matriz extracelular, como MMP-2 e MMP-9; e (3) o domínio COOH-terminal de 140 aminoácidos que possui apenas um CRD e o motivo NWGR (para a galectina-3 humana) encontrado também na proteína humana anti-apoptótica Bcl-2 (YANG, et al, 2008). A galectina-3 é uma proteína principalmente citosólica, com diversos estudos reportando também para a sua localização na superfície celular, no meio condicionado de algumas linhagens celulares, na matriz extracelular, fluidos biológicos e no soro. Com isso, já se sabe que as diversas funções descritas para a galectina-3 são dependentes da sua localização física (FUNASAKA, et al., 2014).

A expressão da galectina-3 é heterogênea entre os múltiplos tipos de tumores e sua função também está correlacionada com seu padrão ubíquo de localização, como descrito acima e ilustrado na figura 2. No câncer, o papel da galectina-3 tem sido relatado tanto na transformação tumoral, crescimento, progressão e metástase, sendo que a função mais explorada é a regulação da apoptose (YANG, et al., 1996; AKAHANI, et al., 1997; LIU, et al., 2002). Os diferentes mecanismos moleculares pelos quais a galectina-3 intracelular exerce sua função anti-apoptótica vêm sendo relatados até hoje. De forma resumida, foi descrito que o padrão de fosforilação da galectina-3 é crítico para sua localização e função anti-apoptótica e também que, após um estímulo de morte, galectina-3 pode ser translocada do núcleo para o citoplasma onde irá interagir com Bcl-2, uma proteína amplamente conhecida por sua função supressora da apoptose, inibindo a liberação de citocromo c e a posterior ativação de caspase-3, o que atenua então a despolarização mitocondrial e mantém a função dessa organela (YANG, et al., 1996; AKAHANI, et al., 1997; YOSHII, et al., 2002; FUKUMORI, et al., 2006; XU, et al., 2013).

Figura 2 - Representação esquemática do papel da galectina-3 na transformação maligna e progressão tumoral, diferenciando as funções exercidas quando encontrada intra ou extracelularmente. Modificado de RADOSAVLJEVIC, et al., (2012).

Além da função anti-apoptótica, a galectina-3 intracelular foi relatada também por atuar no núcleo como fator durante o *splicing* de pré-mRNAs, uma vez que ela pode interagir com membros da família SR (*serine and arginine-rich proteins*) de fatores de *splicing* e participar da montagem do complexo de *spliceosome* (DAGHER, et al., 1995; PARK, et al., 2001; HAUDEK, et al., 2010). Galectina-3 também é capaz de regular a transcrição gênica por favorecer, por exemplo, a associação de fatores de transcrição aos sítios CRE (*c-AMP response elements*) e Sp1 (*Specificity protein 1*) na região promotora de genes e promover a transcrição de importantes reguladores do ciclo

celular como ciclina D1 (LIN, et al., 2002), ciclina A, ciclina E, p21 (WAF1/CIP1) e p27 (KIP1) (KIM, et al., 1999; YOSHII, et al., 2002). Ainda no núcleo, a galectina-3 também interage com a β -catenina, um componente *downstream* da via de sinalização Wnt (via responsável pela regulação da transcrição de diversos genes envolvidos em processos como diferenciação celular, proliferação e migração), promovendo a transcrição de genes como c-myc, ciclina D1, COX-2 (*cyclooxygenase-2*), MMP-7 (*matrix metalloproteinase-7*), entre outros (SHIMURA, et al, 2004). No citoplasma, galectina-3 aparece como sendo importante na transformação maligna, pois ela age como uma parceira seletiva de ligação às proteínas oncogênicas Ras, preferencialmente K-Ras ativada (K-Ras-GTP), promovendo a ativação de Raf1 e PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) e contribuindo para a sustentação de vias de sobrevivência celular (ELAD-SFADIA, et al., 2004).

No meio extracelular, a galectina-3 está envolvida na metástase tumoral, processo que inclui fatores como alterações na adesão celular, aumento da migração e invasividade, angiogênese e evasão do sistema imune. Na adesão celular, o envolvimento da galectina-3 pode ser diferente dependendo do arranjo conformacional assumido, como exemplo das formas bivalente ou multivalentes de galectina-3 que podem agir como pontes e promover a adesão entre duas ou mais células e entre células e componentes da matriz extracelular (GLINSKY, et al., 2003). Galectina-3 é reportada por interagir com inúmeras glicoproteínas da matriz extracelular como fibronectina, colágeno IV, elastina e laminina, e também com glicoproteínas de superfície celular como integrinas e LAMPs (*Lysosome-Associated Membrane glycoproteins*) e componentes dos *lipid rafts* como glicolipídeos e N- e O-glicanos (LIU e RABINOVICH, 2005; BOSCHER, et al., 2011). Portanto, a galectina-3 pode exercer

propriedades duais durante a adesão e migração celular, dependendo dos glicoconjugados apresentados e de como ela interaje com eles, assim ela é descrita por modular processos como o intravasamento tumoral (invasão de células tumorais através da matriz extracelular e lâmina basal), a formação de êmbolos durante disseminação em vasos sanguíneos e/ou linfáticos, o que aumenta a vantagem de sobrevivência celular nessas condições por prevenir a morte celular por *anoikis*, por exemplo; o extravasamento tumoral, favorecendo a interação entre células tumorais e células endoteliais; e a chegada e adesão das células tumorais no sítio pré-metastático (LIU e RABINOVICH, 2005; NEWLACZYL e YU, 2011; RADOSAVLJEVIC, et al., 2012).

Durante a angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, a galectina-3 é capaz de regular as células endoteliais, afetando a sua quimiotaxia e estimulando a formação de tubos capilares *in vitro* e aumentando a vascularização *in vivo*, além de favorecer a angiogênese mediada por VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (NANGIA-MAKKER, et al., 2000; MARKOWSKA, et al., 2010). Um possível mecanismo que explica esses resultados é a interação entre galectina-3 e VEGF-R2 (*VEGF-Receptor 2*), um receptor de VEGFA, que são os parceiros moleculares responsáveis por uma das principais vias de sinalização da angiogênese, promovendo a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais. Essa interação, por sua vez, diminui a taxa de internalização endocítica do VEGF-R2, o que é importante por prolongar o tempo de exposição desse receptor na superfície da membrana plasmática das células endoteliais, permitindo assim o início da cascata de sinalização da angiogênese após a ligação do seu ligante VEGFA (MARKOWSKA, et al., 2011).

No que diz respeito à resposta imune durante o câncer, a galectina-3, intra e extracelular, também pode estar envolvida em diferentes processos chave como modulação da proliferação e sobrevivência celular, quimiotaxia e tráfego celular, secreção de citocinas e comunicação intercelular, todos importantes na montagem tanto da resposta imune inata quanto adaptativa (DI LELLA, et al., 2011). Galectina-3 já foi reportada por induzir a ativação de várias células inflamatórias como mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas e monócitos/macrófagos (LIU; RABINOVICH, 2010), além de atuar como molécula quimiotática capaz de atrair monócitos e macrófagos (SANO, et al., 2000), possuindo então uma potente função pró-inflamatória. Nas respostas imunes mediadas por células T, diversas evidências indicam uma ação dual da galectina-3 agindo tanto na proteção contra apoptose dessas células (YANG, et al., 1996) quanto no estímulo de morte (FUKUMORI, et al., 2003), dependendo de sua localização intra ou extracelular. Galectina-3 também foi relatada por auxiliar o processo de anergia de linfócitos infiltrantes do tumor, que é a diminuição da capacidade de reconhecimento de antígenos e da secreção de citocinas por esse tipo celular, fato comumente encontrado em tumores e que pode ser responsável pela imunossupressão local, permitindo o crescimento tumoral mesmo frente à montagem da resposta imune (DEMOTTE, et al., 2008).

Nosso grupo também mostrou resultados interessantes sobre a importância da galectina-3 para organização do microambiente tumoral em melanomas murinos, principalmente em relação à angiogênese e à montagem da resposta imune. Células de melanoma expressando galectina-3 (Tm1G3) secretam mais VEGF *in vitro* quando comparadas às células que não expressam galectina-3 (Tm1N3), mesmo na ausência de qualquer estímulo. Da mesma forma, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM –

Bone marrow-derived macrophage) provenientes de animais WT ($gal3^{+/+}$) também secretam maiores quantidades de VEGF *in vitro* comparados aos BMDM provenientes de animais KO ($gal3^{-/-}$). De fato, transpondo para resultados *in vivo*, tumores originados em animais $gal3^{+/+}$ a partir de células galectina-3 positivas (WTG3) possuem os maiores valores de volume tumoral e as maiores áreas de vasculatura funcional, concomitante à alta detecção de VEGF, em relação aos tumores originados em animais $gal3^{-/-}$ a partir de células galectina-3 negativas (KON3). Portanto, esses resultados demonstram que a presença da galectina-3 proveniente tanto das células tumorais quanto do estroma é de grande importância para a angiogênese associada ao tumor. Além disso, tumores originados em animais $gal3^{-/-}$ a partir de células galectina-3 positivas (KOG3) também possuem pronunciadas áreas de vasculatura funcional, evidenciando que a secreção de VEGF pelas células tumorais foi suficiente para o estabelecimento da cascata angiogênica, permitindo o crescimento tumoral. Em adição, ambos tumores WTG3 e KOG3 mostraram altos níveis de VEGFR2 e sua forma fosforilada (ativa) comparado aos outros grupos (MACHADO, et al., 2014).

Em relação à resposta imune, ensaios *in vitro* mostraram que BMDM provenientes de animais KO ($gal3^{-/-}$) e WT ($gal3^{+/+}$) respondem de forma diferencial frente à estímulo para um fenótipo pró-tumoral (M2), sendo que os WT-BMDM são capazes de processar os sinais do estímulo e acumular arginase-1 (um dos marcadores do fenótipo M2), enquanto na ausência de galectina-3 (KO-BMDM), a expressão de arginase-1 é diminuída. Dessa forma, a galectina-3 intracelular está envolvida na ativação de macrófagos, mais especificamente na polarização para o fenótipo pró-tumoral (MACHADO, et al., 2014).

No que diz respeito ao papel da galectina-3 em melanomas, ainda é possível encontrar muitos resultados variáveis, principalmente no debate dos níveis de expressão dessa lectina nos diferentes estágios da progressão, porém algumas informações em consenso remetem para a importância da galectina-3 como molécula reguladora da progressão e metástase de melanomas (LARSEN, et al., 2011). De uma forma geral, a expressão de galectina-3 está aumentada em células transformadas (melanoma e nevus) comparada aos níveis encontrados em melanócitos (PIETRO, et al., 2006) e, interessante, essa marcação de galectina-3 se encontra distribuída de forma heterogênea quando observamos cortes histológicos provenientes dos diferentes estágios de progressão do melanoma (PIETRO, et al., 2006; BROWN, et al., 2012). Portanto, como a maior taxa de mortalidade dos pacientes com melanoma está associada com a presença de metástases e a expressão de galectina-3 vem sendo positivamente correlacionada tanto com a metástase quanto ao valor prognóstico de melanomas, um dos maiores desafios é entender as mudanças moleculares associadas com a progressão do melanoma tentando delinear uma possível assinatura de galectina-3 nesse processo.

Como a expressão de galectina-3 em melanomas é heterogênea, nós sugerimos que a expressão dessa lectina possa ser modulada espacialmente de forma diferencial e que isso, de alguma forma, possa conferir uma vantagem na manutenção tumoral, levando em consideração os múltiplos mecanismos nos quais galectina-3 está envolvida, como descrito anteriormente. De fato, nosso grupo encontrou evidências em modelo de glioblastoma de que a expressão de galectina-3 é aumentada em hipóxia e privação de nutrientes e, além disso, ela parece estar envolvida no programa de adaptação celular levando à sobrevivência das células tumorais nessas condições de estresse (Tese de Doutorado de Rafael Yamashita Ikemori, Processo FAPESP Nº 2009/10857-0).

Portanto, para elucidar como se dá a manutenção do perfil heterogêneo de expressão de galectina-3 durante a progressão do melanoma se tentou entender nesse trabalho quais as pressões seletivas do microambiente influenciam a expressão de galectina-3, apostando em duas principais pressões físicas comuns de tumores sólidos: hipóxia e acidose. Ainda nesse contexto, se buscou compreender a relevância de uma população heterogênea em relação à galectina-3 na cinética de crescimento tumoral, mimetizando o que vem sendo observado nas amostras de pacientes com lesões melanocíticas de diferentes estágios de progressão. A partir disso, a hipótese deste projeto é que a heterogeneidade em relação à expressão da galectina-3 favorece a evolução do melanoma e a expressão dessa molécula é influenciada por flutuações de pH e oxigenação.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo primeiramente avaliar o perfil de expressão de galectina-3 em tumores de melanoma humano e murino. Posteriormente, verificar se a expressão de galectina-3 poderia ser regulada *in vitro* por condições de hipóxia e acidose, mimetizando duas das pressões seletivas encontradas no microambiente tumoral. Por fim, verificar se a diferença entre a expressão homogênea ou heterogênea de galectina-3 favorece o crescimento tumoral.

Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis proteicos de galectina-3 por imunoistoquímica em lesões melanocíticas de pacientes (*tissue microarray*) e em melanomas murinos originados do inóculo das linhagens Tm1M e Tm1N3 (galectina-3 negativas) em animais gal3^{-/-}.
2. Mimetizar a condição de hipóxia aguda e intermitente, avaliando a influência na regulação da expressão de galectina-3 *in vitro* em células de melanoma humano.
3. Mimetizar a condição de acidose intratumoral e avaliar a influência do baixo pH na regulação da expressão de galectina-3 *in vitro* em células de melanoma humano e murino.

4. Avaliar a cinética de crescimento tumoral entre grupos de animais inicialmente inoculados com uma população mista composta por células galectina-3 positivas e negativas, uma população homogênea composta por células galectina-3 positivas e uma população homogênea composta por células galectina-3 negativas.

3. MÉTODOS

3.1 Modelos

Linhagens celulares

Células de melanoma murino Tm1M derivadas de uma linhagem de melanócitos imortalizados não tumorigênicos, Melan-a (Oba-Shinjo et al., 2006), foram previamente transfectadas com o gene de galectina-3 humano. Os plasmídeos utilizados na transfecção das células, pEF1-neo e pEF1-galectina-3, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fu-Tong Liu (Universidade de Califórnia, Davis). Esse plasmídeo contém um sítio de restrição para a enzima EcoRI, onde foi inserido o gene de galectina-3, o promotor humano pEF e os genes de resistência a ampicilina e neomicina (este último confere resistência ao antibiótico geneticina). Os clones de células originados da transfecção com pEF1-neo e pEF1-galectina-3 e utilizados neste trabalho são denominados de Tm1N3 e Tm1G2, respectivamente (MACHADO, et al., 2014). O clone Tm1MT DE Luc 2 (gerado pela aluna de iniciação científica Cristina dos Santos Silva Processo FAPESP N° 2013/08461-7) representa as células de um explante tumoral (Tm1MT DE) derivado das células Tm1M e que foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1(+)/Luc2=tdT (Addgene), no qual estão inseridos o gene *Firefly* Luciferase fusionado com o gene *Tomato Red Fluorescent Protein*, o gene de resistência a ampicilina, que confere a resistência bacteriana, e o gene da geneticina para a seleção das células eucarióticas transfectadas. As células Melan-a, Tm1M, Tm1N3, Tm1G2 e Tm1MT DE Luc 2 foram cultivadas utilizando-se meio de crescimento RPMI 1640

(Sigma Aldrich®) pH 7,2 suplementado com 5% de soro fetal bovino (Life Technologies) e 100 µg/mL da combinação de ampicilina e esptreptomicina. Na linhagem Melan-a foi adicionado 200 nM de éster de forbol (PMA, forbol-12-miristato-13-acetato - Sigma Aldrich®), uma vez que o crescimento em cultura dessa linhagem é dependente desse fator. O cultivo da Tm1N3 e Tm1G2 foi suplementado com 1 mg/mL do antibiótico de seleção Geneticina (Gibco, Life Technologies) e do clone Tm1MT DE Luc 2 com 0,8 mg/mL do mesmo antibiótico. As linhagens de melanoma humano SK-MEL-37, SK-MEL-37 shGal-3 e *scramble* foram cultivadas utilizando-se meio de crescimento MEM (Sigma Aldrich®) pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies) e 100 µg/mL da combinação de ampicilina e esptreptomicina. As células transduzidas com um vetor viral contendo uma sequência de shRNA contra galectina-3 ou uma sequência controle (SK-MEL-37 shGal-3 e *scramble*, respectivamente) foram complementadas com 0,5 µg/mL do antibiótico de seleção puromicina (Sigma). As células SK-MEL-37 shGal-3 e *scramble* foram gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Marcelo de Carvalho (INCA – Rio de Janeiro). Todas as células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C contendo 5 % de CO₂. Ao atingir a confluência, as células foram lavadas com solução PBS/EDTA, pH 7,2, desaderidas dos frascos com solução 0,2% de tripsina (Life Technologies) e transferidas para novos frascos de cultivo na proporção de 1:5 (Melan-a, SK-MEL-37, SK-MEL-37 shGal-3 e *scramble*) e 1:10 (Tm1M, Tm1N3, Tm1G2 e Tm1MT DE Luc 2).

Estabelecimento dos explantes tumorais

Para o estabelecimento dos explantes derivados das linhagens Tm1M e Tm1N3, foram utilizadas técnicas de dissociação mecânica e enzimática do tecido tumoral.

Primeiramente, a indução e posterior excisão dos tumores foram realizadas como descrito mais detalhadamente no item 3.3. Em ambiente estéril, os tumores foram desagregados em pequenos pedaços (menores que 1 mm³) com auxílio de uma lâmina de bisturi. Essa primeira parte da dissociação mecânica permite facilitar a ação das proteases na degradação da matriz extracelular. Para a dissociação enzimática, o macerado tecidual foi transferido para um tubo de fundo cônico e 35 µg/mL da enzima Liberase Blendzyme 3 (Roche) foi adicionada junto à 15 mL meio de cultura contendo 100 µg/mL de ampicilina e esptreptomicina. A suspensão foi incubada por 30 minutos a 37 °C, sendo homogeneizada manualmente por três vezes durante esse tempo. Após os 30 minutos de reação enzimática, a suspensão foi filtrada através de uma membrana de nylon de 70 µm (BD Cell Strainer) para remoção dos pedaços de tecidos não dissociados. O filtrado celular foi centrifugado duas vezes a 2000 rpm por 5 minutos. A suspensão celular foi então transferida para garrafas de cultivo com meio de cultura RPMI suplementado com 5% de SFB e 100 µg/mL de ampicilina e esptreptomicina. Após essa etapa, as células foram mantidas de acordo com o protocolo padrão para cultivo de células aderentes.

Modelos Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6 *knockout* para o gene da galectina-3 (gentilmente cedidos pelo Dr. Fu-Tong Liu, *University of California*, Davis) e camundongos fêmeas da linhagem Balb/c NUDE. Os animais utilizados tinham entre 6 e 8 semanas (exceto no experimento de bioluminescência, como detalhado posteriormente no corpo dos Resultados) e pesavam aproximadamente 25 g. Os animais *Specific Pathogen Free* (SPF) provenientes do

Biotério central da Faculdade de Medicina da USP foram mantidos em grupos de no máximo seis animais por unidades microisoladoras, dispostas em *racks* com temperatura controlada entre 20 °C a 25 °C, e com ciclo de fotoperíodo de 12/12. Os animais receberam água e ração estéreis *ad libitum*, trocadas uma vez por semana para manutenção da qualidade SPF. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, de acordo com as recomendações do painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association (Report of the AVMA Panel on Euthanasia - 2007)* e da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 11 de Maio de 2012. Ao final do experimento, os animais eutanasiados foram encaminhados para descarte pela coleta de lixo biológico da Faculdade de Medicina da USP.

3.2 *Ensaios in vitro*

Exposição das células SK-MEL-37, Melan-a, Tm1M e explante à acidez

As células foram plaqueadas em garrafas de cultivo de 25cm² com número inicial de células de 2,5x10⁵, 8x10⁵, 6x10⁵ e 3,5x10⁵ para as linhagens SK-MEL-37, Melan-a, Tm1M e o explante Tm1MT Ø, respectivamente. Após a aderência de todas as células, o meio foi trocado pelo meio de pH 6,7, que foi suplementado com 25 mM de tampão 2-(*N-Morpholino*) ethanesulfonic acid (MES), e as garrafas foram hermeticamente fechadas para impedir a ação tamponante do bicarbonato de sódio presente no meio de cultivo. As células dessa condição experimental ficaram expostas ao pH 6,7 por até 96 horas. O grupo controle desse experimento foram as células expostas ao pH 7,2. Os meios tanto de pH 7,2 quanto de pH 6,7 foram trocados a cada 24 horas para tentar minimizar a oscilação dos valores de pH e garantir a distinção

dessas duas condições, além de minimizar o efeito da diminuição de nutrientes ao longo do tempo. A cada 24 horas, os respectivos pontos amostrais foram retirados para a análise dos níveis de RNAm e proteicos de galectina-3, como descrito mais adiante.

Exposição da linhagem SK-MEL-37 à hipóxia aguda e intermitente

As células foram plaqueadas em placas de 6 cm com número inicial de $2,5 \times 10^5$ células em meio próprio de cultivo, como citado anteriormente. Após 12 horas para aderência de todas as células, as placas foram colocadas na câmara de hipóxia H35 *Hypoxystation* (Whitley), com concentrações fixas de 1.0% de O₂ e 5% de CO₂, e condições controladas de umidade e temperatura (37 °C). As células foram expostas a duas condições experimentais diferentes: a exposição aguda e a intermitente, tentando aproximar ao máximo do que é visto em tumores sólidos. Na exposição aguda, as células ficaram em hipóxia por 24 ou 48 horas, já na exposição intermitente, foram feitos ciclos de hipóxia e reoxigenação, sendo as células incubadas por 24 horas em hipóxia e seguidas de 24 horas de reoxigenação em estufa de cultivo, este representando o fechamento do primeiro ciclo. Foram realizados até três ciclos de hipóxia e reoxigenação, sendo que grupos amostrais foram retirados ao final do primeiro, segundo e terceiro ciclo. Os pontos amostrais foram retirados para a análise dos níveis de RNAm e proteicos de galectina-3, como descrito mais adiante.

3.3 *Ensaios in vivo*

Modelo experimental dos implantes subcutâneos de melanoma

Todos os inóculos realizados com as linhagens Tm1N3, Tm1G2 e Tm1M, Tm1MT DE Luc 2 e explantes foram padronizados com a quantidade de 2×10^5 células totais, suspensas em 100 μ L de meio RPMI não suplementado, inoculadas de forma subcutânea no ventre de cada camundongo. Para o modelo realizado com a linhagem SK-MEL-37 utilizou-se a quantidade de 5×10^5 células totais por inóculo, seguindo as especificações anteriores. O acompanhamento do crescimento tumoral começou quando o tumor foi detectado como sendo uma massa PNM (palpável não mensurável), onde, a partir desse momento, os animais foram observados diariamente e as medidas do eixo maior e menor anotadas. A detecção da massa PNM levou cerca de 7 a 10 dias, dependendo da linhagem inoculada, e essas informações estão representadas no gráfico denominado “Curva de aparecimento do tumor”. Após aparecimento do tumor, as medidas dos eixos foram mensuradas com auxílio de um paquímetro e o cálculo do volume tumoral foi determinado através da fórmula do volume de um esferoide, baseado na premissa que o formato tumoral se assemelha, morfolologicamente, à figura geométrica de uma elipse. Decorridos os dias de captação das medidas, os animais foram sacrificados, como detalhado anteriormente, e os tumores removidos cirurgicamente. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com o Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, cujo número do protocolo de aprovação é 290/12 para uso dos camundongos C57BL6 e 068/14 para uso dos camundongos Balb/c NUDE.

Acompanhamento do crescimento tumoral por bioluminescência

O sistema de imagem por bioluminescência foi realizado com o equipamento IVIS® Spectrum (PerkinElmer). Para a aquisição das imagens *in vivo*, os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano (1-3%) e o substrato D-luciferina (150 mg/kg diluído em PBS) (Promega) foi injetado intraperitonealmente. Os animais foram colocados no equipamento imediatamente após o inóculo da D-luciferina e o tempo de aquisição das imagens foi de 1 minuto, sendo o tempo total de exposição relativo à curva de intensidade de fótons liberados por cada grupo experimental. Os animais foram fotografados nos dias 7, 10, 14, 17 e 21 após a data do inóculo das células tumorais. As imagens escolhidas para compor a sessão de resultados representam aquelas com o número de fótons máximo captado pelo equipamento.

3.4 Análise da transcrição gênica e do nível proteico de galectina-3

Extração de RNA

A extração de RNA total das amostras foi feita com Trizol (Invitrogen – Life Technologies), segundo o protocolo do fabricante. As células foram lisadas em 1 mL de Trizol e, após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck®) e os tubos foram vertidos vigorosamente por 15 segundos. Seguiu-se de uma nova incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000 g, 4 °C, por 15 minutos. Em seguida, a fase aquosa contendo RNA total foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, evitando contaminação com as outras duas fases contendo DNA e proteína. À fase aquosa foi

adicionado 0,5 mL (para cada 1 mL de Trizol) de isopropanol (Merck®) 100% e as amostras foram deixadas precipitando *overnight* a -80 °C. Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, 4 °C, por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, os precipitados foram lavados com 1 mL de etanol (Merck®) 75%, homogeneizados brevemente em vórtex e centrifugados a 7500 g, 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi deixado secar por 10 minutos. O RNA foi então ressuspendido em água livre de RNase e as amostras colocadas em banho seco a 60 °C por 15 minutos. O RNA obtido foi quantificado através da leitura a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop 1000, sendo as relações de 260/280 e 260/230 consideradas para evitar contaminação das amostras por impurezas orgânicas e inorgânicas, e proteínas. Entre 200 – 500 ng de RNA extraído foi aplicado em gel de agarose 1% (TBE 1X em água livre de RNase) para análise da integridade através da observação das bandas ribossomais de 28S e 18S.

Produção de cDNA

O RNA obtido foi tratado com o kit DNase I Amplification Grade (Invitrogen – Life Technologies) e posteriormente convertido em cDNA através da reação de transcrição reversa pela enzima SuperScript® III (Invitrogen – Life Technologies), seguindo sempre os protocolos do fabricante. Para isso, brevemente, 1 µg de RNA tratado, 1 µL de Oligo dT, 1 µL dNTP Mix e água DEPC q.s.p (quantidade suficiente para) 20 µL foram incubados previamente a 65 °C por 5 minutos, e em seguida, resfriados rapidamente em gelo. Decorrido esse tempo, foi adicionada às amostras uma mistura contendo 4 µL de tampão 5X *first strand* e 2 µL de DTT 0,1 M. Após incubação a 42 °C por 2 minutos, foi adicionado 1 µL da enzima SuperScript III (200

U/ μ L) e as amostras foram novamente incubadas a 42 °C por 50 minutos e posteriormente inativadas a 70 °C por 15 minutos.

PCR quantitativa (qRT-PCR)

Para análise de expressão gênica em tempo real foi utilizada a metodologia do SYBR[®] Green. Para a reação foram utilizados 10 μ L de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) (Invitrogen – Life Technologies), que já contém os reagentes necessários para a reação, 1 μ g de cDNA, o volume específico para cada par de *primer* e água ultrapura GIBCO[®] suficiente para um volume final de 20 μ L por reação. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems 7500). Foram avaliadas as expressões dos genes de galectina-3 (humano e murino), Car9 (Anidrase carbônica 9) (murino) e β -actina (humano e murino), cujas sequências dos pares de *primers* estão descritas na tabela 1. As eficiências para cada par de *primer* foram calculadas de acordo com a equação

$E = 10^{-1/\text{slope}}$, onde o valor do *slope* foi obtido pelo *software* do equipamento após a análise da curva padrão. A expressão relativa das amostras foi calculada pelo método de comparação dos valores de CT (limiar de detecção) do gene alvo em relação ao gene de referência da β -actina, através da equação

_____, como descrito por Pfaffl (2001). A

escolha do melhor gene de referência foi analisada anteriormente ao prosseguimento do experimento, sendo que para as análises experimentais propostas o gene da β -actina foi o que obteve a menor variação entre as amostras testadas e os respectivos controles.

Tabela 1 – Pares de *primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR

<i>Primer</i>	<i>Sequência Forward</i>	<i>Sequência Reverse</i>
Galectina-3 (murina)	5'CCTGGAGCTTATCCTGGTCA3'	5'GTCACCACTGATCCCCAGTT3'
Galectina-3 (humana)	5'AGACAGTCGGTTTTCCCATTT3'	5'ACCAGAAATTCCCAGTTTGCT3'
β -actina (humana e murina)	5'TGTTACCAACTGGGACGACA3'	5'CTGGGTCATCCTTTCACGGT3'
Car9 (murina)	5'CAGTTTTGGCTGCCTTTCTGC3'	5'TATCGGTAGTAGCGGCTGAG3'

Extração de Proteínas

Para obtenção dos extratos proteicos, as células foram desaderidas dos frascos de cultura com solução de tripsina, lavadas com PBS 1X (tampão salina fosfato) e as células foram ressuspensas em tampão de lise NP40 Cell Lysis Buffer (Invitrogen – Life Technologies) (50 mM Tris, pH 7,4; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1% Nonidet P40 e 0.02% NaN₃) acrescido de 2 µg/mL aprotinina e 1 mM PMSF. O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 4 °C e posteriormente centrifugado por 15 minutos, 13000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C. Para determinar a concentração proteica dos extratos foi utilizado o Kit “Ensaio de Proteína BCA – Método de Lowry Modificado” da BioAgency.

Western Blot

O extrato proteico (30 µg) em tampão de amostra (120 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% bromofenol blue, 20% glicerol e 5 mM DTT) foi submetido primeiramente à eletroforese em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e tampão de corrida pH 8,5 (250 mM de Tris base, 190 mM de glicina, 1% de SDS) e posteriormente transferido para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*). A transferência para membrana de PVDF foi a 100 V constante, durante 1 hora a 4 °C, imerso em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 20% Metanol). Após a transferência, a membrana foi incubada em PBS 1X, 0,05% Tween 20, 5% leite em pó desnatado Molico® por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos. A seguir, a membrana foi imersa em sobrenadante derivado do hibridoma TIB-166 (*American Type of Culture Collection*, ATCC) produtor do anticorpo primário monoclonal anti-galectina-3 M3/38 na titulação 1:10, a 4 °C por um período de 8 a 12 horas ou a temperatura ambiente durante 1 hora. A incubação com o anticorpo primário monoclonal anti-GAPDH (feito em coelho) (Sigma®), na titulação de 1:5000 em PBS 1X, foi durante 1 hora, temperatura ambiente e sob agitação constante. Após sucessivas lavagens (3 vezes de 10 minutos) com PBS 1X, 0,05% Tween 20, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários para galectina-3 e GAPDH (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase e anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, respectivamente) (Sigma®) na titulação de 1:5000 em PBS e mantida a temperatura ambiente por 1 hora também sob agitação constante. Novamente, após sucessivas lavagens (3 vezes de 10 minutos) com PBS 1X, 0,05% Tween 20, a detecção das bandas específicas de galectina-3 e β -actina foi realizada através da reação de

quimioluminescência. A captação das imagens foi feita utilizando-se a câmara CCD (ImageQuant LAS 4000– GE).

Verificação de galectina-3 extracelular e intracelular por citometria de fluxo

As células das linhagens e explantes tumorais foram desaderidas e 5×10^5 células foram separadas para cada condição amostral de análise, seja a marcação extra e intracelular, ou somente extracelular de galectina-3. As mesmas foram lavadas com 2 mL de PBS 1X gelado e centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos. Para o bloqueio, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS-BSA 5% e incubadas por 30 minutos a 4 °C, onde foi adicionado o anticorpo primário anti-galectina-3 M3/38 (titulação 1:10) e incubado por mais 60 minutos a 4 °C. As células foram lavadas com 2 mL de PBS 1X gelado e centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos, onde o “pellet” celular foi ressuspensado com 100 μ L de PBS/BSA 1% contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com Alexa 488) (Invitrogen – Life Technologies) (titulação 1:500) e incubado por 60 minutos também a 4 °C. Cada ponto amostral foi novamente lavado 2 vezes com 2 mL de PBS 1X gelado e as células centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos. As amostras que foram permeabilizadas para análise intracelular de galectina-3 foram fixadas com 300 μ L de PFA 1%. Já as células com apenas marcação extracelular foram fixadas com 300 μ L de PFA 4%. Ambas foram lavadas mais uma vez com PBS-BSA 1% para retirar o excesso do agente fixador. Para prosseguimento da etapa de marcação intracelular, as células foram incubadas por 60 minutos com 100 μ L de solução permeabilizadora (BSA 1% e 1% saponina) contendo o anticorpo primário anti-galectina-3 M3/38 (titulação 1:10).

Posteriormente, foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS 1X gelado e centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos. As amostras foram então incubadas por 60 minutos a 4 °C com 100 µL de solução permeabilizadora contendo o anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com Alexa 488) (Invitrogen – Life Technologies) (titulação 1:500), e em seguida lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos. As células dessa marcação intracelular também foram fixadas com 300 µL de PFA 4% e lavadas com PBS-BSA 1%. Por fim, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 4 minutos e ressuspensas em 200 µL de PBS 1X. A leitura da fluorescência foi realizada no equipamento FACS Calibur (BD).

Verificação de galectina-3 por imunoistoquímica

Os tumores derivados dos implantes subcutâneos em camundongos foram retirados cirurgicamente e imersos imediatamente em formol tamponado (10% em PBS) por 24 horas. A seguir, foram feitas lavagens sucessivas com água destilada para remoção do formol e então os tumores foram imersos e mantidos em etanol 70% (Merck®). O material foi incluído em blocos de parafina e os cortes de 3µm de espessura foram obtidos através do serviço de patologia do ICESP. Todo o processo seguinte de desparafinização, bloqueio, incubação com os anticorpos específicos, contracoloração com hematoxilina, montagem das lâminas e digitalização das imagens foram feitas no Centro de Pesquisa “*Moffitt Cancer Research Center*” em Tampa – Flórida, utilizando-se o aparelho automatizado Ventana (Roche). As lâminas de *tissue microarray* contendo amostras de lesões melanocíticas humanas (com seções representativas de nevo, melanoma primário, metástase linfonodal e metástase visceral

de melanomas) também foram processadas em colaboração com o Centro de Pesquisa “*Moffitt Cancer Research Center*” em Tampa – Flórida.

3.5 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 4.0 para o Windows (*GraphPad Software*, San Diego California USA). Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (*One-way* ANOVA e *Two-way* ANOVA seguidos da correção de Bonferroni ou teste t) ou não paramétricos (Mann Whitney) após passarem pelo teste de normalidade. Para as curvas de aparecimento do tumor foi utilizado o teste de Kaplan Meier. Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações com valor de p menor que 0,05 ($p < 0,05$). Todos os experimentos foram conduzidos ao menos em triplicata técnica, com 2 a 3 repetições independentes.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da expressão de galectina-3 em amostras de pacientes com melanoma

Para verificar o perfil de expressão de galectina-3 na progressão de melanomas humanos, foi feita uma colaboração com o Centro de Pesquisa “*Moffitt Cancer Research Center*” em Tampa – Flórida, utilizando serviços do National Cancer Institute (http://dctd.cancer.gov/ProgramPages/cdp/tools_disease-specific.htm), e que consta de amostras de 273 pacientes americanos com lesões melanocíticas em diferentes estágios de progressão (representativas de nevo, melanoma primário, metástase linfonodal e metástase visceral). Este material foi disponibilizado após aprovação do comitê de ética local (pesquisadores responsáveis Roger Chammas e Robert J. Gillies).

Os cortes foram marcados para galectina-3 (marcação rosa) e contracorados com hematoxilina. As imagens representativas de cada estágio da progressão tumoral (Figura 1A, B, C e D) nos permitiu primeiramente observar que esses tumores apresentam algumas áreas com marcação citoplasmática e nuclear positiva para galectina-3 (marcação em rosa), enquanto em outras áreas não observamos marcação para galectina-3, o que denota a existência de um perfil heterogêneo envolvendo a expressão dessa lectina em melanoma. Essas amostras foram quantificadas e a frequência de marcação de galectina-3 foi plotada em relação à localização celular (citoplasma ou núcleo) e ao estágio da progressão tumoral (Figura 1E). Com essa análise também foi possível constatar outro fenômeno em relação à expressão de

galectina-3: a tendência da diminuição da expressão ao longo da progressão do melanoma, fato principalmente observado para a marcação nuclear. Metástase linfonodal e visceral apresentam uma menor frequência, em porcentagem, da expressão de galectina-3 quando comparadas à expressão de nevo e melanoma primário. Além disso, essa quantificação também corroborou a observação do perfil heterogêneo de expressão de galectina-3 em todos os estágios da progressão, como se pode mostrar pela dispersão das frequências de positividade entre as amostras analisadas, atingindo de 0 a 100% de marcação.

Figura 1. Análise por imunoistoquímica da expressão de galectina-3 nuclear e citoplasmática (marcação rosa) em nevos e melanomas humanos em diferentes estágios de progressão. **(A)** Nevo (mediana nuclear = 30.1%); **(B)** Melanoma primário (mediana nuclear = 19.7%); **(C)** Metástase linfonodal (mediana nuclear = 19.7%); **(D)** Metástase visceral (mediana nuclear = 3.4%). As barras em branco representam 100µm. **(E)** Gráfico de caixas mostrando os escores para a expressão de galectina-3, sendo as medianas representadas pelas linhas horizontais, a parte superior e inferior das caixas o percentil 25th e 75th, respectivamente, e a barra vertical a dispersão dos dados. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, sendo que o símbolo £ representa a diferença estatística da marcação citoplasmática entre os casos de metástase visceral em relação aos outros três grupos: nevo, melanoma primário e metástase linfonodal; e * representa a diferença estatística da marcação nuclear entre os casos de metástase visceral também em relação aos outros três grupos. N= número de casos analisados.

4.2 A expressão de galectina-3 é modulada in vivo em modelo de melanoma murino

A partir do observado nos resultados anteriores para melanoma humano, utilizamos os modelos experimentais de melanoma murino disponíveis no nosso grupo para tentar verificar o padrão de expressão de galectina-3 no desenvolvimento tumoral. Para isso, os tumores derivados das linhagens Tm1M e Tm1N3 em animais gal3^{-/-} foram primeiramente analisados por imunoistoquímica. Dados já publicados pelo nosso grupo mostram que essas duas linhagens não apresentam acúmulo proteico de galectina-

3 já que o promotor do gene dessa lectina encontra-se inteiramente metilado (MACHADO, et al., 2014).

Como se pode observar na figura 2 B e C, as imagens representativas desses tumores mostram áreas positivas para galectina-3 (marcação rosa) e com marcações difusas no parênquima tumoral, o que evidencia uma modulação positiva da expressão de galectina-3 após formação de um nicho microambiental favorável para o crescimento do tumor. Relembrando que essas linhagens não expressam galectina-3 *in vitro* em níveis suficientes para detecção pela técnica de Western Blot e os animais utilizados nesse modelo são modificados geneticamente para não expressarem galectina-3. Ainda nesses tumores foi possível observar a presença de áreas negativas para galectina-3 (regiões sem marcação rosa), corroborando a existência de um perfil heterogêneo dessa lectina em modelo de melanoma murino. A figura 2 A representa o controle positivo da reação de imunoistoquímica, sendo o tumor derivado de animais selvagens para a expressão de galectina-3, portanto esperado que se encontre marcações positivas derivadas das células presentes no estroma tumoral.

Figura 2. Paineis da expressão de galectina-3 em tumores subcutâneos de melanoma murino extraídos dezoito dias após o inóculo das células. A expressão de galectina-3 (rosa) foi avaliada utilizando um anticorpo policlonal que reconhece uma sequência específica dessa proteína. Os tecidos foram contra-corados com hematoxilina. **(A)** Tumor derivado da linhagem Tm1M em animais C57BL-6 selvagens (WT - *wild type*). **(B)** Tumor derivado da linhagem Tm1M em animais C57BL-6 gal3^{-/-}. **(C)** Tumor derivado da linhagem Tm1N3 em animais C57BL-6 gal3^{-/-}. **(D)** Tumor derivado do explante Tm1MT Ø em animais C57BL-6 gal3^{-/-}. As barras em branco representam 100µm.

Com o objetivo de verificar e confirmar *in vitro* esse aumento de expressão de galectina-3 *in vivo*, os tumores derivados das duas linhagens Tm1N3 e Tm1M foram removidos por excisão cirúrgica, dissociados e mantidos em cultura como apresentado no item 3.1. A partir da linhagem Tm1N3 foram derivados três explantes e a partir da linhagem Tm1M foram derivados seis explantes. Antes de serem analisadas nos

experimentos discutidos a seguir, essas células foram cultivadas por pelo menos 10 passagens, a fim de evitar a permanência em cultura de fibroblastos ou outras células do microambiente tumoral e, portanto, tentar analisar apenas as células tumorais.

A primeira conduta foi analisar os níveis de RNAm de galectina-3 nos explantes acima mencionados, através da técnica de qRT-PCR. Com essa técnica, foi possível observar uma maior quantidade de RNAm codificante para galectina-3 nos três explantes quando comparados à linhagem parental Tm1N3 (Figura 3). O mesmo foi observado para os seis explantes obtidos da linhagem Tm1M (Figura 4). De acordo com o cálculo proposto por Pfaffl (2001) e como abordado no item 3.4, a expressão relativa de cada explante em relação à linhagem parental encontra-se plotada no gráfico. A linha vermelha representa a intersecção onde a expressão relativa das duas amostras comparadas é igual, sendo então que o limite superior à linha representa o aumento da expressão de acordo com os valores representados no eixo y do gráfico.

Figura 3. Análise da expressão relativa de galectina-3 por qRT-PCR da linhagem Tm1N3 e seus explantes. O aumento da expressão de galectina-3 foi observado nos três explantes obtidos N3T DD, N3T D e N3T Ø. As barras representam os níveis de expressão de galectina-3 de cada explante em relação à expressão basal encontrada na linhagem Tm1N3 e levando em consideração o gene de referência β -actina.

Figura 4. Análise da expressão relativa de galectina-3 por qRT-PCR da linhagem Tm1M e seus explantes. O aumento da expressão de galectina-3 foi observado nos seis explantes obtidos: Tm1MT E, Tm1MT DE e Tm1MT Ø (**A**) e também Tm1MT2 DE, Tm1MT2 E e Tm1MT2 EE (**B**). As barras representam os níveis de expressão de galectina-3 de cada explante em relação à expressão basal encontrada na linhagem Tm1M e levando em consideração o gene de referência β -actina.

Portanto, todos os explantes, tantos os derivados da Tm1N3 quanto da Tm1M, apresentaram aumento da expressão de galectina-3 a nível transcricional, corroborando os dados de imunoistoquímica representados na figura 2 e da ideia de modulação da expressão dessa lectina por algum processo biológico do microambiente tumoral.

Para avaliar os níveis proteicos de galectina-3 nos explantes, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo com o intuito de tentar observar a variabilidade da expressão de galectina-3 em células provenientes da massa tumoral, o que permitiria corroborar os dados da heterogeneidade intratumoral dessa lectina em tumores de melanoma humanos, como observado nas imunoistoquímicas (Figura 1).

Foram realizadas marcações intracelulares e de superfície celular e, tanto para os explantes derivados da linhagem Tm1N3 (Figura 5) quanto para os da Tm1M (Figura

6), foi possível concluir que (1) os níveis proteicos de galectina-3 parecem ser realmente muito baixos, como visualizado no pequeno desvio à direita da curva de fluorescência das células imunopositivas (curva vermelha e azul) quando comparadas ao controle de inespecificidade do anticorpo secundário (curva cinza), o que em alguns explantes não difere muito do encontrado para a linhagem parental e, (2) adicionalmente, surge a percepção de que a positividade para galectina-3 não ocorre em toda a população de células, tanto intra quanto entre os explantes derivados. Como exemplo, o explante N3T DD e N3T D (Figura 5) mostram um padrão de dois picos na curva de fluorescência da marcação extracelular, representando subpopulações positivas e negativas para galectina-3. Dessa forma, a variabilidade de positividade em relação à galectina-3 novamente remonta o fenômeno de heterogeneidade intratumoral verificado em tumores humanos e murinos.

Figura 5. Expressão de galectina-3 extracelular (coluna à esquerda) e intracelular (coluna à direita) por citometria de fluxo das linhagens Melan-a e Tm1N3 e dos explantes N3T (D) e N3T (DD). Na análise de *overlay*, o traço preto representa o controle de autofluorescência após fixação das células com paraformaldeído 4%, o traço cinza e verde representa o controle de inespecificidade do anticorpo secundário anti-rat Alexa 488, e o traço vermelho e azul representa a reação positiva de galectina-3 após marcação extracelular e intracelular, respectivamente. O eixo y representa o número de eventos e no eixo x, a leitura da fluorescência. Essa figura é a representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

Figura 6. Expressão de galectina-3 extracelular (coluna à esquerda) e intracelular (coluna à direita) por citometria de fluxo das linhagens Melan-a e Tm1M e dos explantes Tm1MT DE, Tm1MT E e Tm1MT Ø. Na análise de *overlay*, o traço preto representa o controle de autofluorescência após fixação das células com paraformaldeído 4%, o traço cinza e verde representa o controle de inespecificidade do anticorpo secundário anti-rat Alexa 488, e o traço vermelho e azul representa a reação positiva de galectina-3 após marcação extracelular e intracelular, respectivamente. O eixo y representa o número de eventos e no eixo x, a leitura da fluorescência. Essa figura é a representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

4.3 A hipóxia não foi capaz de modular a expressão de galectina-3 em melanoma humano

Com base nos dados encontrados até agora, é possível confirmar que a expressão de galectina-3 é modulada *in vivo* ao longo do crescimento tumoral e há uma tendência à manutenção de um perfil heterogêneo dentro de um mesmo tumor. Para traçar qual o possível processo microambiental envolvido na modulação da expressão de galectina-3, decidiu-se analisar *in vitro* o papel de dois fatores físicos intratumorais: a hipóxia e a acidose.

Baseado no que se sabe sobre a formação mal organizada dos vasos tumorais e a consequente dinâmica de perfusão de oxigênio nesse tecido, decidiu-se testar duas exposições diferentes para mimetizar as condições de hipóxia tumoral, a exposição aguda e a intermitente, como descrito na sessão do material e métodos. Para isso utilizou-se a linhagem de melanoma humano SK-MEL-37, que sabidamente expressa galectina-3.

Nesse contexto, o que foi encontrado para essa pressão ambiental é que, na linhagem utilizada, nem a exposição aguda nem a intermitente de hipóxia foi capaz de alterar a expressão de galectina-3 *in vitro*. Na figura 7 estão representados os níveis proteicos de galectina-3 mensurados por citometria de fluxo após a exposição aguda de 24 ou 48 horas de hipóxia. No gráfico, é possível perceber que não houve deslocamento das curvas de fluorescência representativas da marcação para galectina-3 intracelular em hipóxia (linha azul clara), indicando então que não houve alteração no conteúdo proteico dessa lectina nessa condição e nesses tempos experimentais em relação à normóxia.

Figura 7. Análise da expressão proteica de galectina-3 intracelular por citometria de fluxo nas células de melanoma humano SK-MEL-37. As células foram mantidas por 24 ou 48 horas em condições de normóxia e hipóxia. No gráfico, o traço roxo e o traço rosa representam o controle de inespecificidade do anticorpo secundário anti-rato conjugado à Alexa 488 nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente, e o traço azul escuro e azul claro representam a positividade de galectina-3 nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente. O eixo y representa o número de eventos e no eixo x, a leitura da fluorescência. A análise de *overlay* mostra que não houve diferença nos níveis de galectina-3 nessas condições até 48 horas de incubação. Essa figura é a representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

Já na figura 8 estão representados os níveis proteicos (A) e de RNAm (B) de galectina-3 mensurados por citometria de fluxo e qRT-PCR após a exposição intermitente das células SK-MEL-37 à três ciclos independentes de hipóxia seguida de reperfusão. Nessa nova exposição, também foi possível perceber que não houve deslocamento das curvas de fluorescência representativas da marcação para galectina-3 intracelular nem houve diferença no conteúdo de RNAm nos três ciclos consecutivos de hipóxia e reperfusão, corroborando, então, que a hipóxia não é capaz de modular galectina-3 nessas condições experimentais.

Figura 8. (A) Análise da expressão proteica de galectina-3 por citometria de fluxo e (B) análise da expressão de galectina-3 por qRT-PCR da linhagem de melanoma humano SK-MEL-37 submetida à ciclos de hipóxia e reoxigenação com duração de 24 horas cada, chegando ao total de três ciclos consecutivos. No gráfico A, o traço roxo e o traço rosa representam o controle de inespecificidade do anticorpo secundário anti-rato conjugado à Alexa 488 nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente, e o traço azul escuro e azul claro representam a positividade de galectina-3 nas condições de normóxia e hipóxia, respectivamente. O eixo y representa o número de eventos e no eixo x, a leitura da fluorescência. A análise de *overlay* mostra que não houve diferença nos níveis de galectina-3 nessas condições até 48 horas de incubação. As barras em B representam os níveis do RNAm de galectina-3 da condição de hipóxia seguida de reoxigenação (1, 2 e 3 ciclos) em relação aos níveis da condição controle (normóxia). Essa figura é a representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

Além disso, durante os ensaios de hipóxia observamos as diferenças na morfologia e na porcentagem de células viáveis nas condições de exposição acima mencionadas. A maioria das células expostas à hipóxia intermitente mostrou, principalmente no terceiro ciclo, um aumento da porção citoplasmática em relação à

porção nuclear (Figura 9), o que sugere possíveis mudanças de adesão e migração celular e/ou alterações do ciclo celular como senescência, entretanto esses dados precisam ser investigados. Já em relação à citotoxicidade dos diferentes tempos de exposição em hipóxia, não foi possível notar uma relevante diferença da porcentagem de células viáveis em relação aos controles mantidos em normóxia (Figura 10), como verificado pela exclusão de azul de tripan, por isso a hipóxia não parece ser um potencial estímulo de morte para essas células.

1º Ciclo

2º Ciclo

3º Ciclo

Figura 9. Micrografia de células SK-MEL-37 mantidas em um, dois e três ciclos de 24 horas de normóxia seguida por 24 horas de hipóxia. As imagens foram capturadas utilizando o software AxionVision (Zeiss) e representam três campos independentes. Todas as imagens foram capturadas no aumento de 40x.

Figura 10. Curva de viabilidade por azul de tripan da linhagem de melanoma humano SK-MEL-37 submetida à **(A)** 24 ou 48 horas de hipóxia e à **(B)** ciclos de hipóxia e reoxigenação com duração de 24 horas cada, chegando ao total de três ciclos consecutivos. Cada ponto no gráfico representa as médias e o erro padrão das replicatas experimentais. A análise estatística foi feita através do teste *Two-way*ANOVA seguido do teste de Bonferroni e não mostrou diferença estatística entre os dois grupos analisados (normóxia e hipóxia) em cada tempo tanto na exposição aguda (A) quanto na exposição intermitente (B). Figura representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

4.4 A acidose modula negativamente a expressão de galectina-3

A combinação de uma vascularização mal formada de tumores sólidos, focos regionais de hipóxia, aumento da massa tumoral e aumento da taxa metabólica celular levam à acidose extracelular, com valores do pH de até 6,5. Nesse sentido, o objetivo foi analisar o efeito da variação de um pH normal fisiológico para um pH ácido na expressão de galectina-3, mimetizando esse fenômeno de acidose intratumoral.

Primeiramente, foi escolhida a linhagem Tm1M (negativa para galectina-3) e seu explante Tm1MT DE, como sendo um dos explantes com o mais baixo nível de expressão dessa proteína (Figura 4 A). Além disso, para garantir que as células estariam respondendo à condição mimética de acidose extracelular, utilizou-se a molécula Car9

(Anidrase Carbônica 9) como marcador nesse experimento, já que é conhecido o aumento da expressão dessa enzima em condições de hipóxia e acidose (WYKOFF, et al., 2000).

Nesse experimento verificamos, primeiramente, que essas linhagens de melanoma murino disponíveis no nosso laboratório apresentam uma expressão basal de galectina-3, a qual não é detectada em níveis proteicos. Ainda assim, verificamos que a acidose foi capaz de alterar os níveis transcricionais de galectina-3 *in vitro*. Mais especificamente, a acidose exerce um efeito negativo na expressão de galectina-3, fato observado para os dois modelos de melanomas murinos testados: Tm1M, Tm1MT Ø e também para a linhagem não tumorigênica Melan-a (Figura 11). Interessantemente, a acidose foi capaz de reduzir ainda mais os níveis transcricionais de galectina-3 nesses modelos de melanoma. Dessa forma, decidimos repetir esses experimentos na linhagem SK-MEL-37, pois, além de ser um modelo de melanoma humano, ela possui maior expressão de galectina-3.

A expressão de Car9 é provavelmente muito reduzida em Melan-a, independentemente até do tempo de exposição à condição ácida, uma vez que foram observadas curvas de amplificação muito tardias durante os ensaios de qRT-PCR (dados não mostrados). Por isso, a expressão relativa de Car9, usada como controle, não está ilustrada no gráfico da linhagem Melan-a.

Figura 11. Análise da expressão de galectina-3 por qRT-PCR da linhagem Tm1M, seu explante Tm1MT ϕ , e a linhagem Melan-a submetidos à condição de acidose (pH 6,7) durante 24, 48, 72 e 96 horas. As barras representam a expressão de galectina-3 da condição ácida em relação à condição normal (pH 7,2) de cada tempo e levam em consideração a expressão do gene de referência β -actina. A expressão de Car9 foi usada como marcador da condição de acidose. As tabelas representam os valores de pH medidos após a retirada de cada ponto amostral, durante 24, 48, 72 e 96 horas. Figura representativa de dois experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

Com o intuito de corroborar os resultados em melanoma murino e extrapolar para modelos celulares humanos, a regulação da expressão de galectina-3 em pH ácido

também foi testada na linhagem de melanoma humano SK-MEL-37, seguindo o mesmo delineamento experimental feito anteriormente, porém com um tempo menor visto a dificuldade de manter o pH 7,2 do controle após 48h em cultura (tabelas apresentadas na figura 11). Para essa linhagem de melanoma foi possível constatar o mesmo fenômeno anteriormente observado: há a diminuição da expressão de galectina-3 em pH 6,7, visualizado tanto nos níveis de RNAm quanto na proteína total intracelular (Figura 12 A e B, respectivamente), indicando que as condições acídicas do microambiente tumoral podem agir como moduladores negativos para essa proteína.

Figura 12. (A) Análise da expressão de galectina-3 por qRT-PCR da linhagem de melanoma humano SK-MEL-37 submetida à condição de acidose (pH 6,7) durante 24

ou 48 horas. As barras representam a expressão de galectina-3 da condição ácida em relação à condição normal (pH 7,4) de cada tempo e levam em consideração a expressão do gene de referência β -actina. **(B)** Análise da expressão proteica de galectina-3 intracelular por citometria de fluxo nas células de melanoma humano SK-MEL-37. As células foram mantidas por 24 ou 48 horas em condições de pH neutro (pH 7,4) e em condições de acidose (pH 6,7). No gráfico B, o traço roxo e o traço rosa representam o controle de inespecificidade do anticorpo secundário anti-rato conjugado à Alexa 488 nas condições de pH neutro e ácido, respectivamente, e o traço verde e azul claro representam a positividade de galectina-3 nas condições de pH neutro e ácido, respectivamente. O eixo y representa o número de eventos e no eixo x, a leitura da fluorescência. A análise de *overlay* mostra uma diminuição dos níveis de galectina-3 na condição de acidose após 48 horas de incubação. Esses dados são representativos de três experimentos independentes com replicata técnica de n=3.

Outro fenômeno observado durante os ensaios de acidose foi a mudança morfológica e proliferativa das células expostas a essas condições, em que as células expostas em pH 6,7 apresentaram, principalmente após 24 horas, uma diminuição da relação núcleo/citoplasma em comparação às condições de pH normal (Figura 13 A). Esse aumento da porção citoplasmática das células em pH ácido pode ser devido à alteração na adesão celular e, talvez, na capacidade migratória dessas células, o que necessitaria futuros experimentos para confirmar essa premissa. Da mesma forma, foi possível observar que o pH ácido alterou a capacidade proliferativa (Figura 13 B), apesar de não alterar a viabilidade celular (Figura 13 C), mostrando então que ambientes acídicos, assim como os hipóxicos, são potencialmente citostáticos, mas não citotóxicos.

A

24 horas

48 horas

Figura 13. (A) Micrografia de células SK-MEL-37 mantidas em pH 7,4 e pH 6,7 durante 24 ou 48 horas. As imagens foram capturadas utilizando o software AxionVision (Zeiss). É possível observar a presença de vacúolos citoplasmáticos na condição de pH 6,7 (setas brancas). (B) e (C) representam as curvas de proliferação e viabilidade por azul de tripan da linhagem SK-MEL-37 mantida em pH 7,4 e pH 6,7 por 24 ou 48 horas. Os pontos no gráfico representam as médias aritméticas $\pm$ erro padrão das replicatas técnicas experimentais ($n=3$) de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita através do teste *Two-way*ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Houve diferença estatística no número total de células (B) entre os grupos de pH 7,4 e pH 6,7 nos tempos de 24 e 48 horas.

4.5 A expressão heterogênea de galectina-3 favorece o crescimento tumoral

Como foi apresentado anteriormente, a presença da heterogeneidade intratumoral para galectina-3 parece ser um fenômeno comum em melanomas humanos e murinos. Nessa sessão tentou-se verificar se haveria então alguma vantagem implicada no perfil heterogêneo de expressão de galectina-3 em tumores e, como modelo experimental, utilizou-se o crescimento tumoral subcutâneo de melanoma primário para evidenciar esse mecanismo. Primeiramente, comparamos o crescimento tumoral dos explantes tumorais derivados e de seus respectivos parentais, negativos para galectina-3, Tm1N3 e Tm1M (Figura 14A e 15A) ao longo de aproximadamente 18 dias após o

inóculo em camundongos $gal3^{-/-}$, além também de comparar a massa tumoral (Figura 14B e 15B) e a curva de aparecimento do tumor entre esses grupos (Figura 16 e 17). A escolha de cada explante foi relacionada principalmente com a maior expressão de galectina-3 verificada por qRT-PCR e por citometria de fluxo, como foi visto anteriormente, sendo que tomou-se como base para a escolha dos explantes a noção de ser uma população de células tumorais com alta variabilidade na marcação positiva para galectina-3, mimetizando então uma população inicialmente heterogênea para a expressão dessa lectina.

Figura 14. (A) Volume (cm^3) e (B) Massa (g) dos tumores originados das linhagens Tm1N3 e do explante N3T DD em camundongos C57BL/6 $gal3^{-/-}$. (A) Os tumores dos grupos Tm1N3 (n=6) e N3T DD (n=6) foram monitorados por 17 dias após o inóculo e cada ponto na curva representa a média aritmética $\pm$ erro padrão das medidas diárias dos volumes tumorais. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi feita através do teste t para valores pareados. (B) O gráfico representa os valores das massas tumorais para Tm1N3 (n=4) e N3T DD (n=6) em torno da media aritmética de cada grupo. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney. Os valores de p estão indicados no gráfico.

Figura 15. (A) Volume (cm³) e (B) Massa (g) dos tumores originados das linhagens Tm1M e o explante Tm1MT Ø em camundongos C57BL/6 gal3^{-/-}. (A) Os tumores dos grupos Tm1M (n=5) e Tm1MT Ø (n=5) foram monitorados por 18 dias após o inóculo e cada ponto na curva representa a média aritmética $\pm$ erro padrão das medidas diárias dos volumes tumorais. A análise estatística foi feita através do teste t para valores pareados. Os valores de p estão indicados no gráfico. (B) O gráfico representa os valores das massas tumorais para Tm1M (n=4) e Tm1MT Ø (n=3) em torno da media aritmética de cada grupo. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi feita através do teste de Mann Whitney e não mostrou valor de p significativo.

Figura 16. Acompanhamento do aparecimento de tumores nos animais inoculados com as linhagens Tm1N3 (n=6) e o seu explante N3T DD (n=6). A curva mostra a porcentagem de animais livres de tumor em função do tempo, evidenciando a diferença

da latência tumoral entre os dois grupos. A análise estatística foi feita através do teste de Kaplan Meier com valor de $p < 0,0001$.

Figura 17. Acompanhamento do aparecimento dos tumores nos animais inoculados com as linhagens Tm1M (n=5) e os seus explantes Tm1MT DE e $\emptyset$ (n=5). A curva mostra a porcentagem de animais livres de tumor em função do tempo, evidenciando a diferença da latência tumoral entre os três grupos. A análise estatística foi feita através do teste de Kaplan Meier e obteve um valor de $p=0,0007$.

Os gráficos mostram que os dois explantes N3T DD e Tm1MT $\emptyset$ demonstram ter maior velocidade na formação dos tumores como representado pelas curvas de latência tumoral nas figuras 16 e 17, respectivamente, apesar da diferença estatística ter sido observada apenas para o explante N3T DD. Da mesma forma, os dois explantes também apresentaram o maior volume tumoral em cm^3 (Figura14A e 15A) decorrido os dias após o inóculo. Dessa forma, nesse modelo de melanoma primário, parece que os níveis de galectina-3 ofertados inicialmente de forma heterogênea na fase de implantação tumoral são importantes para ditar como será o sucesso do

desenvolvimento tumoral ao longo do tempo, conferindo vantagens importantes para esse processo.

Entretanto, é de nosso conhecimento a dificuldade de correlacionar a vantagem de crescimento dos tumores derivados desses explantes somente com o fato deles expressarem mais galectina-3 quando comparados às linhagens parentais. Quando se compara com o que ocorre na outra linhagem de melanoma murino, B16F10, sabe-se que ela é mais invasiva que a parental B16F1 pelo fato de já ter passado nove vezes a mais pelo organismo do camundongo. Nesse sentido, não é possível afirmar estritamente que a maior agressividade alcançada por um explante seja correlacionada especificamente com o grau elevado da expressão de galectina-3.

Portanto, com intuito de melhorar o sistema experimental, camundongos *gal3^{-/-}* foram inoculados com as linhagens Tm1N3 (*gal3^{-/-}*), Tm1G2 (*gal3^{+/+}*) ou com a mistura dessas duas populações em iguais proporções, mimetizando assim um tumor heterogêneo para galectina-3. Com isso, foi possível observar que o grupo heterotípico (Tm1N3+Tm1G2) obteve a maior taxa de crescimento quando comparado aos outros dois grupos isolados (Figura 18), corroborando o resultado anterior e a ideia da vantagem evolutiva dos tumores heterogêneos em relação à galectina-3.

Figura 18. Crescimento tumoral representado através do monitoramento do volume (cm^3) de tumores originados das linhagens Tm1N3 ($n=7$), Tm1G2 ($n=10$) e da mistura entre elas na proporção 1:1 ($n=11$) após 10 dias de injeção subcutânea em camundongos C57BL/6 gal3^{-/-}. Cada ponto da curva representa a média aritmética $\pm$ erro padrão das medidas diárias dos volumes tumorais de cada grupo. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi realizada com o teste OneWay ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Com o intuito de corroborar os achados acima em tumores humano, utilizamos as células de melanoma humano SK-MEL-37 silenciadas para galectina-3 (Figura 19 C) para mimetizar os experimentos realizados com as células de melanoma murino Tm1N3 e Tm1G2. Para isso, células SK-MEL-37 controle (*scramble*) e silenciadas (shGal-3) para galectina-3 foram inoculadas separadamente (SK-MEL-37 sh*Scramble*, com 5×10^5 células; e SK-MEL-37 shGal-3, com 5×10^5 células) ou misturadas em igual proporção (SK-MEL-37 sh*Scramble* com $2,5 \times 10^5$ células + SK-MEL-37 shGal-3 com $2,5 \times 10^5$ células, totalizando 5×10^5 células) no subcutâneo de camundongos imunodeficientes (nude), e o crescimento tumoral foi acompanhado por 12 dias após o aparecimento dos tumores. O número amostral para cada grupo foi de cinco camundongos. Este experimento é extremamente relevante, pois estamos utilizando uma importante

ferramenta experimental, que é o silenciamento estável de galectina-3 por transdução viral, e nos aproximando ainda mais do que pode ser visto na clínica através da utilização de um modelo celular humano de melanoma.

Representamos dois gráficos de crescimento tumoral, um designado para os valores médios de cada grupo (Figura 19 A) e o outro para os valores individuais de cada animal (Figura 19 B), a fim de ressaltar a variabilidade em cada grupo (dos cinco animais inoculados, dois desenvolveram tumor no grupo SK-MEL-37 shGal-3, três no grupo SK-MEL-37 sh*Scramble* e três também no grupo SK-MEL-37 sh*Scramble* + SK-MEL-37 shGal-3). De fato, os resultados representados abaixo (Figura 19) mostram que a taxa de crescimento tumoral é maior no grupo heterotípico em relação aos grupos que foram inoculados com somente um tipo celular. Portanto, esse experimento finaliza o conjunto de dados representados anteriormente e representa a robustez do fenômeno de heterogeneidade intratumoral de galectina-3, corroborando os resultados anteriores em modelos murinos (Figuras 14, 15 e 18) e a nossa hipótese de que tal heterogeneidade favorece o sucesso evolutivo de melanomas.

Figura 19. Crescimento tumoral representado por grupo (A) e por animal (B) através do monitoramento do volume (cm^3) de tumores originados das linhagens SK-MEL-37 shScramble (n=5), SK-MEL-37 shGal-3 (n=5) e da mistura entre elas (SK-MEL-37 shScramble + SK-MEL-37 shGal-3) em proporção 1:1 (n=5) após 16 dias de injeção subcutânea em camundongos Balb/c Nude. Em A, cada ponto da curva representa a média aritmética $\pm$ erro padrão das medidas diárias dos volumes tumorais de cada grupo. Após feito o teste de normalidade, a análise estatística foi realizada com o teste OneWay ANOVA seguido do teste de Bonferroni. (C) Análise da expressão de galectina-3 por Western Blot das linhagens SK-MEL-37, SK-MEL-37 shScramble e SK-MEL-37 shGal-3. A quantidade de amostra aplicada em cada poço foi de 30 μg .

4.6 A fração de células galectina-3 negativas se mantém ao longo do crescimento tumoral

Para tentar ilustrar a manutenção das populações de células positivas e negativas (e consequentemente da heterogeneidade) para galectina-3 quando inoculadas simultaneamente (grupo heterotípico), utilizou-se a técnica de bioluminescência para traçar o perfil de crescimento da população das células tumorais negativas na geração de tumores heterogêneos nos animais $\text{gal}3^{-/-}$. O clone de células Tm1MT DE Luc 2, transfectado com o gene repórter da luciferase, representa a fração de células negativas para galectina-3, enquanto que para representar a fração de células positivas para essa lectina, utilizamos a linhagem Tm1G2 (Figura 20). Para isso foram formados três grupos experimentais compostos pelos animais inoculados no subcutâneo com 1×10^5 células Tm1MT DE Luc 2, 2×10^5 células Tm1MT DE Luc 2 e 2×10^5 da mistura dessas duas células (1×10^5 células Tm1MT DE Luc 2 + 1×10^5 células Tm1G2). O objetivo foi minimizar o viés experimental, tentando comparar principalmente o grupo Tm1MT DE Luc 2 + Tm1G2 com o Tm1MT DE Luc 2 (1×10^5 células), os quais se iniciam com o mesmo número de células repórter (Tm1MT DE Luc 2). O grupo Tm1MT DE Luc 2

(2×10^5 células) foi utilizado como controle positivo da técnica de bioluminescência, por representar o inóculo com o número total de células padronizado para esse experimento.

Figura 20. Análise do perfil de expressão de galectina-3 por Western Blot das linhagens Tm1G2 e Tm1MT DE Luc 2. A quantidade de amostra aplicada em cada poço foi de 30 μ g.

As imagens dos animais foram adquiridas nos dias 7, 10, 14, 17 e 21 após o inóculo e estão representadas na figura 21 A, B, C, D e E, respectivamente, e a intensidade máxima de fótons emitidos está representada em cada imagem (Max=). Portanto, quando comparamos os valores da intensidade máxima para os grupos Tm1MT DE Luc 2 + Tm1G2 e Tm1MT DE Luc 2 (1×10^5 células), é possível observar que, a partir do 14º dia (Figura 21 C), o sinal proveniente das células repórteres é maior no grupo constituído pelo inóculo de células positivas e negativas (Max= 234) em relação ao grupo constituído por somente as células negativas para galectina-3 (Max= 72). Esse fenômeno se mantém até a última aquisição, no 21º dia (Figura 21 E), onde os valores são Max= 636 para o grupo Tm1MT DE Luc 2 + Tm1G2 e Max= 111 para o grupo Tm1MT DE Luc 2 (1×10^5 células).

A **B** **C**

Figura 21. Análise da bioluminescência adquirida ao longo do tempo em três grupos experimentais independentes de camundongos *gal3^{-/-}* inoculados com 1x10⁵ células Tm1MT DE Luc 2, 2x10⁵ células Tm1MT DE Luc 2 e 2x10⁵ da mistura dessas duas células (1x10⁵ células Tm1MT DE Luc 2 + 1x10⁵ células Tm1G2). As imagens apresentam o valor máximo (Max=) de bioluminescência por grupo obtido pelo aparelho IVIS ao longo de 7 (A), 10 (B), 14 (C), 17 (D) e 21 (E) dias após o inóculo.

Portanto, esses resultados sugerem que a heterogeneidade inicial em relação à galectina-3 pode favorecer o crescimento das populações vistas de forma isolada, já que a viabilidade das células galectina-3 negativas (Tm1MT DE Luc 2) foi maior quando inoculadas juntamente com as células galectina-3 positivas (Tm1G2) em vez de quando inoculadas isoladamente. Mais interessante ainda, foi possível observar que essa população de células negativas para galectina-3 se mantém na massa tumoral ao longo

do tempo, coexistindo com a população positiva e, possivelmente, contribuindo de alguma forma para o sucesso evolutivo no tumor.

Porém, esse experimento precisa ser repetido devido ao pequeno número amostral e também à diferença das datas de nascimento dos animais utilizados, que variaram entre uma a três semanas de diferença de idade.

5. DISCUSSÃO

Apesar de raras exceções, os tumores espontâneos se originam de uma única célula, mas no momento do diagnóstico clínico, a maioria dos tumores humanos é heterogêneo, isto é as células não são mais idênticas genotípica e fenotipicamente. Esta heterogeneidade traduz-se em muitas características morfológicas e fisiológicas, como potencial invasivo, angiogênico, proliferativo, expressão gênica e metabolismo (MARUSYK; POLYAK, 2010). Como foi observado nesse trabalho, a análise de *tissue microarray* com amostras de melanoma humano de diversos pacientes em diferentes estágios de progressão apontou para a ocorrência da heterogeneidade tanto intratumoral quanto entre os diferentes estágios de progressão de melanomas humanos no que diz respeito à expressão de galectina-3 (Figura 1 A - D). Além disso, também foi possível constatar uma tendência na diminuição da expressão de galectina-3 ao longo da progressão do melanoma, fato principalmente observado para a marcação nuclear, de modo que os melanomas primários possuem maior expressão dessa lectina quando comparados aos melanomas metastáticos (Figura 1 E).

A galectina-3 é uma proteína pertencente à família das lectinas, importantes por possuírem a função de reconhecimento e ligação a β -galactosídeos de glicolipídeos e glicoproteínas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, podendo desempenhar distintas funções biológicas (LIU; RABINOVICH, 2005). Dessa forma, a galectina-3 está envolvida tanto em processos fisiológicos e patológicos como o câncer, podendo modular a diferenciação celular, proliferação, sobrevivência, adesão, migração,

ativação celular e quimioatração, dependendo da sua localização espacial intracelular e extracelular (LIU; RABINOVICH, 2010).

De fato, um número considerável de estudos em modelos pré-clínicos e em pacientes com câncer mostra significativa associação entre a expressão da galectina-3 e a agressividade de diferentes tipos tumorais. Em um estudo de correlação com câncer de mama, 98 lesões de mama foram analisadas, incluindo fibroadenomas, lesões fibrocísticas, carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, sendo que a maior expressão de galectina-3 foi encontrada no tecido mamário normal adjacente às lesões e também nas lesões benignas. A expressão de galectina-3 foi significativamente reduzida nos carcinomas *in situ* e essa diminuição foi ainda mais pronunciada nos carcinomas invasivos, principalmente àqueles associados com a infiltração dos linfonodos axilares (CASTRONOVO, et al., 1996). Em modelo de câncer de próstata, Laderach et al. (2013) analisaram o perfil dessa proteína em prostatectomias retiradas de 61 pacientes diagnosticados como não passíveis de tratamento. Nesse estudo também foi mostrado que os níveis de galectina-3 eram reduzidos em estágios mais avançados da doença. Outros dois estudos mais recentes também apontam para essa correlação entre a diminuição da expressão de galectina-3 com a progressão e agressividade do tumor, como em câncer gástrico (LEAL, et al., 2014) e neuroblastoma (VESCHI, et al., 2014). Entretanto, também há trabalhos que mostram o aumento da expressão de galectina-3 associado aos perfis mais agressivos da doença, como em carcinoma papilífero da tireoide (SALAJEGHEH, et al., 2014), carcinoma renal (VON KLOT, et al., 2014) e osteosarcoma (ZHOU, et al., 2014).

Em melanomas, as informações encontradas na literatura são poucas e ainda conflitantes, mas dados consistentes indicam que melanomas primários expressam

significativamente mais galectina-3 quando comparados aos nevos (PIETRO, et al., 2006; BROWN, et al., 2012). Mais recentemente, um estudo mais recente envolvendo 524 pacientes com lesões melanocíticas (incluindo nevos benignos, nevos displásicos, melanoma *in situ*, melanoma primário e melanoma metastático) investigou a expressão da galectina-3 durante a progressão tumoral e fez a correlação com o prognóstico desses pacientes. Através de análises por imunoistoquímica, os autores mostraram que a expressão de galectina-3 possui uma distribuição bimodal, com aumento da expressão de galectina-3 nuclear e citoplasmática em melanomas de fina espessura (<1mm) comparado aos nevos benignos, e a diminuição da expressão em melanomas metastáticos, mais evidentemente no núcleo. Além disso, a presença de galectina-3 nuclear e citoplasmática em melanoma primário foi correlacionada com a melhora da sobrevida global e específica da doença. Portanto, a progressão do melanoma pode estar associada à diminuição dos níveis intracelulares de galectina-3, uma vez que a diminuição dessa lectina está relacionada com maior capacidade metastática e pior prognóstico do melanoma (BROWN, et al., 2012).

Portanto, com os dados observados nesse trabalho e pelo que é encontrado na literatura, galectina-3 parece ser modulada ao longo da progressão de tumores, de modo que sub-populações tumorais positivas e negativas para essa proteína coexistam no tecido tumoral. De fato, observamos que o inóculo de células de melanoma murino negativas para galectina-3 (Tm1N3 e Tm1M) originou tumores subcutâneos em camundongos *gal3^{-/-}* constituídos por uma fração das células tumorais que passaram a expressar galectina-3, como observado por imunoistoquímica dos tecidos tumorais (Figura 2). Além da imunoistoquímica, também dissociamos os tumores derivados dessas duas linhagens e estabelecemos explantes tumorais para analisar a expressão de

galectina-3. De fato, tanto por RT-qPCR (Figuras 3 e 4) quanto por citometria de fluxo (Figuras 5 e 6), foi possível observar o aumento de expressão de galectina-3 dos explantes em relação às respectivas linhagens parentais e, curiosamente, nem todos os explantes apresentaram perfis semelhantes de marcação para galectina-3 por citometria de fluxo, evidenciando uma variação da expressão na população de células, possuindo então células positivas e negativas.

Nesse sentido, hipotetizamos que fatores do microambiente tumoral possam modular a expressão de galectina-3 nas células de melanoma. Assim, se torna importante entender quais seriam as possíveis pressões do microambiente tumoral capazes de regular a expressão de galectina-3, uma vez que, apesar do considerável progresso no entendimento do papel das galectinas na biologia do tumor, ainda falta uma visão integrada das interações envolvendo galectinas e o microambiente tumoral, incluindo os mecanismos responsáveis pela regulação dessas proteínas sincronizados às suas respectivas funções biológicas (COMPAGNO, et al., 2013). Neste trabalho, avaliamos se a hipóxia e a acidose atuam como pressões microambientais capazes de regular, positiva ou negativamente, os níveis de galectina-3, já que essas condições produzem efeitos similares no que diz respeito à alteração fenotípica e adaptação das células tumorais, uma vez que a hipóxia e acidose são capazes de influenciar o programa de expressão gênica e transdução de sinais dessas células (FANG, et al., 2008).

A hipóxia é uma característica comum de tumores sólidos e, como consequência, há geração de diferentes tipos de adaptações celulares frente a essa condição, como alteração no metabolismo glicolítico, diminuição da proliferação celular, aumento da migração e invasão e aumento da angiogênese (GATENBY; GILLIES, 2004). Essas

mudanças ocorrem como consequência do remodelamento de um programa transcricional ativado principalmente pelo fator de transcrição HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*), que funciona como um sensor de oxigênio o qual, na ausência deste, ativa a transcrição de genes executores dessas respostas adaptativas, incluindo transportadores de glicose e lactato, enzimas glicolíticas, fatores e receptores pró-angiogênicos, transportadores de íons, entre outros (SEMENZA, 2012).

A noção de que a hipóxia é capaz de regular a expressão de galectina-3 já vem sendo encontrada em alguns trabalhos na literatura. Greijer et al. (2005) mostraram, a partir da análise de expressão diferencial por *microarray* em fibroblastos murinos derivados de animais selvagens e *knockout* para HIF-1 α , que a galectina-3 foi um dos genes identificados como sendo positivamente regulado por HIF-1. Zeng et al. (2007) também mostraram que HIF-1 α regula a expressão de galectina-3 no disco intervertebral de ratos através da interação com elementos responsivos à hipóxia (HRE - *hypoxia response elements*) presentes na região promotora do gene dessa lectina. Além disso, altos níveis de expressão de galectina-3 foram relacionados com áreas de hipóxia *in vivo* em carcinomas mamários, tanto para o subtipo carcinoma ductal *in situ* (REGO, et al., 2013) como para o carcinoma ductal invasivo (REGO, et al., 2014). Em nosso laboratório, também se observou a colocalização *in vivo* por imunoistoquímica de galectina-3 em áreas de pseudopaliçada em modelo de glioblastoma humano, sendo estas descritas como áreas hipercelulares organizadas ao redor de ambientes necróticos e, portanto, hipóxicos. Corroborando esses achados, observou-se o aumento dos níveis de RNAm e proteicos de galectina-3 em células de glioma híbridos e humano após 48 horas de exposição a hipóxia (Tese de Doutorado de Rafael Yamashita Ikemori, Processo FAPESP Nº 2009/10857-0). Na linhagem de melanoma murino B16-F10

houve o aumento da expressão de galectina-3, através da análise de *microarray*, quando essas células foram expostas a condições de hipóxia por 24 horas (OLBRYT, et al., 2006).

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho em modelo de melanoma humano, não foi possível associar mudança dos níveis de RNAm e proteicos de galectina-3 com essa pressão microambiental, tanto em exposições agudas de hipóxia (24 e 48 horas) (Figura 7) quanto em exposições intermitentes (três ciclos seguidos de hipóxia e reoxigenação) (Figura 8). Galectina-3 é reportada por seu papel anti-apoptótico frente a diferentes condições de estresse, como quimioterápicos, anticorpos anti-Fas, que interagem com o receptor de morte celular Fas, e inibidores de proteína quinase como a estaurosporina (YANG, et al., 1996; AKAHANI, et al., 1997; XU, et al., 2013). Baseado na literatura descrita anteriormente, poderia se especular que a hipóxia levaria a um aumento da expressão de galectina-3 na tentativa de garantir a sobrevivência das células, entretanto, nossos resultados mostram que a hipóxia não atuou como uma pressão seletiva capaz de modular a expressão de galectina-3.

Um estudo até o momento corrobora nossos achados, Olbryt et al. (2011) investigaram a expressão de sete genes associados ao melanoma, entre eles o da galectina-3, em áreas de hipóxia microdissectadas de tumores experimentais murinos derivados da linhagem B16-F10. Além disso, também analisaram a expressão desses genes em seis linhagens de melanomas humanos expostas à condições de hipóxia *in vitro*. Os resultados divergentes mostram que a galectina-3 foi o gene mais induzido em B16-F10 sob hipóxia *in vitro* (aumento de 14 vezes), porém, nas análises das regiões de hipóxia microdissectadas *in vivo* em relação às áreas de normóxia, o aumento da expressão de galectina-3 não foi tão pronunciado (aumento de 3,4 vezes). Além disso, e

corroborando os nossos resultados, nenhuma diferença de expressão de galectina-3 foi encontrada nas cinco das seis linhagens de melanomas humanos analisadas quando em condições de hipóxia *in vitro*, sendo que os autores relatam que a expressão de galectina-3 nessas linhagens se mostrou ora discretamente aumentada, diminuída ou igual nessa condição, não mostrando diferenças significativas nos níveis de expressão de galectina-3.

A combinação do aumento da massa tumoral, da vascularização mal organizada, regiões hipóxicas e do aumento da taxa metabólica celular levam à acidose extracelular, outro importante fenômeno microambiental de tumores sólidos. A acidose aguda pode ser citotóxica, retardar a proliferação celular, induzir dormência e levar à apoptose, por outro lado, a acidose crônica é proposta como uma importante pressão seletiva para a células tumorais no modelo Darwiniano de evolução somática do câncer (DAMAGHI, et al., 2013). Portanto, o papel funcional da acidose na biologia tumoral é extremamente complexo, dependendo dos efeitos agudos e crônicos e do contexto biológico como o tipo celular, por exemplo.

Em relação ao mimetismo da acidose tumoral, estabelecemos nesse trabalho condições de exposição aguda e valor de pH 6,7 para as diferentes linhagens, já que, de acordo com a literatura, os valores do pH extracelular (pHe) tumoral variam entre 6,6 a 6,9 (SEDLAKOVA, et al., 2014). Interessantemente, o que observamos foi a diminuição da expressão de galectina-3 nessa condição em diferentes linhagens, como melanócitos (Melan-a) e melanomas murinos (Tm1M e Tm1MT Ø) e melanoma humano (SK-MEL-37), tanto nos níveis de RNAm quanto na proteína total intracelular (Figuras 11 e 12). Esses resultados indicam que as condições acídicas agem como moduladores negativos para galectina-3 em células normais e transformadas, sendo

então a acidose uma pressão do microambiente tumoral capaz de manter a fração de células negativas para galectina-3 na massa tumoral.

Além da compreensão fenomenológica em relação à regulação negativa de galectina-3 frente às condições de baixo pH proposta nesse trabalho, ainda torna-se necessária a compreensão mecanística desse processo. É possível elucidar o envolvimento do fator de transcrição NF- κ B nesse fenômeno, já que ele está descrito na literatura por ser uma molécula reguladora da expressão de galectina-3 (DUMIC; LAUC, 2000). Correlacionando com eventos de acidose extracelular, Peppicelli et al. (2014) mostraram que, em células de melanoma humano expostas a condições de acidose, houve uma regulação positiva de NF- κ B, uma vez que foi verificada a diminuição dos níveis de I κ B, o inibidor celular de NF- κ B, em condições de baixo pH. Além disso, Peppicelli et al. (2013) também observaram a localização intracelular diferenciada desse fator de transcrição em células de melanoma humano, sendo que em condições ácidas a marcação de NF- κ B era nuclear, principalmente nas primeiras horas após tratamento, enquanto que em condições de pH normal a localização era exclusivamente citoplasmática. Portanto, apesar da correlação aparentemente contrária com os nossos dados encontrados, já que observamos a diminuição dos níveis de galectina-3 em baixo pH, é plausível propor que NF- κ B esteja promovendo a regulação negativa de galectina-3 a nível transcricional. Em adição, existe a possibilidade de galectina-3 estar sendo realocada para o meio extracelular frente a esse estímulo, onde irá interagir com moléculas da matriz extracelular e de superfície celular, exercendo as funções envolvidas nos processos de adesão e migração celular.

Além disso, também é possível extrapolar outra forma de regulação de galectina-3 através de mecanismos epigenéticos. Os mecanismos epigenéticos são importantes por

modularem o potencial transcricional de um gene e incluem, entre os mais conhecidos, a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, silenciamento gênico por RNA não codificante e o remodelamento da cromatina dependente de ATP (MOHTAT e SUSZTAK, 2010; CAVAGNARI, 2012). Em mamíferos, a metilação do DNA não é fixa e pode ser reversível e passível de regulação, levando à perda ou ganho de funções biológicas e possibilitando a reprogramação do destino celular (BHUTANI, et al., 2011; CHOO, 2011).

Alguns trabalhos na literatura mostram que o grau de expressão de galectina-3 em tumores pode estar associado com eventos de metilação do promotor, como é o caso em adenocarcinoma da próstata (AHMED, et al., 2009), carcinoma cólon-retal (MAHMOUD, et al., 2011) e tumores de tireóide (KELLER, et al., 2013). De fato, em um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo, foi verificado que o promotor do gene de galectina-3 é passível de ser metilado em células de melanoma murino, diferentemente do encontrado para a linhagem de melanócitos imortalizada Melan-a (Machado et al., 2014). Assim são claras as evidências da ocorrência de mecanismos epigenéticos no controle da expressão de galectina-3 e, dessa forma, poderíamos sugerir que talvez a acidose fosse capaz de controlar esses eventos, diminuindo então a transcrição gênica dessa lectina.

Em um trabalho recentemente publicado, os autores mostraram que a dinâmica de acetilação e desacetilação das histonas, proteínas importantes na compartimentalização do DNA e regulação gênica, é responsiva às alterações do pH intracelular (pHi). Em pHi ácido, ocorre a desacetilação das histonas por ação das histonas deacetilases (HDACs), liberando moléculas de ácido acético da cromatina. O ácido acético é imediatamente convertido em ânion acetato, que, por sua vez, é

transportado com prótons para o meio extracelular pelos transportadores monocarboxilatos (MCTs), o que colabora com a redução de H^+ intracelular e com o reestabelecimento do pHi. Entretanto, nesse trabalho, os autores não conseguiram associar a hipoacetilação causada pelo baixo pH com a expressão média dos genes localizados nas regiões preditivas de histonas acetiladas, durante as 4 horas de exposição ao pH ácido. Ainda assim, foi possível obter uma lista com 740 genes *up-regulados* em pH ácido, incluindo os próprios genes da histonas, e genes envolvidos na regulação da transcrição, sinalização e metabolismo; e com 888 genes *down-regulados*, envolvidos em funções da membrana plasmática e matriz extracelular (MCBRIAN, et al., 2013). Portanto, é possível sugerir a partir desses dados que a acidose controla negativamente a expressão de galectina-3 através da dinâmica de acetilação das histonas.

Nesse mesmo sentido, Margadant et al. (2012) identificou uma via de *feedback* entre galectina-3 e integrinas em modelo de célula epitelial, mostrando que a subunidade $\beta 1$ de integrinas dispara a ativação transcricional de galectina-3 através da demetilação do promotor do gene de galectina-3. Por sua vez, o aumento de expressão de galectina-3 favorece a adesão mediada por integrinas $\beta 1$ aos substratos de matriz extracelular como fibronectina e laminina, favorecendo assim a migração celular. Interessantemente, foi possível observar que as células, após exposição em ambiente ácido, passam por alterações nas características morfológicas, como o aumento do espreadamento celular e a diminuição da refração da luz no microscópio ótico (Figura 13 A), sugerindo uma possível mudança na adesão celular. Além disso, é reportado que ambientes acídicos favorecem o comportamento migratório e invasivo de células tumorais (GATENBY; GILLIES, 2004), além de desencadear alterações fenotípicas

como a transição epitélio-mesenquimal em células de melanoma (PEPPICELLI et al., 2014). Portanto, poderíamos hipotetizar que a acidose altera o perfil de adesão das células de melanoma, refletindo na regulação da expressão de galectina-3 via mecanomodulação por integrinas.

Outra possível explicação para o fato da acidose regular a expressão de galectina-3 é através dos mecanismos de como as células percebem as mínimas variações de pH que ocorrem no meio extracelular. Um desses mecanismos é a modificação pós-traducional de determinadas moléculas, através da protonação da cadeia lateral de aminoácidos, especificamente o grupo lateral imidazol dos resíduos de histidina. A histidina é encontrada em receptores acoplados à proteína G (GPCRs), em moléculas intracelulares envolvidas na montagem do citoesqueleto de actina, e em bombas de prótons e canais de íons presentes na membrana plasmática. A protonação e a desprotonação dos resíduos de aminoácidos causam alterações na estrutura conformacional da proteína, que, conseqüentemente, irão alterar a afinidade de ligação entre proteínas, modificar a função, alterar a estabilidade proteica e a localização subcelular (DAMAGHI, et al., 2013). De fato, Li, et al. (2013) mostraram que a exposição aguda de células de linfoma em pH ácido causou a diminuição da expressão do oncogene c-Myc através da ativação do receptor TDAG8 (*T-cell death-associated gene 8*), que é um receptor acoplado à proteína G capaz de perceber e responder alterações no pH.

Outros estudos que envolvem galectina-3 e pH propõem alterações funcionais ou de localização dessa lectina em vez somente da ação sobre a expressão gênica. Von Mach et al. (2013) demonstraram que em condições de baixo pH a capacidade de ligação à carboidratos de galectina-3 e a formação de oligômeros é reduzida, revelando

que variações no pH são responsáveis por modular a interação entre galectina-3 e glicoconjugados. De maneira semelhante, Straube et al. (2013) mostraram que o processo cíclico de endocitose e exocitose de galectina-3 ocorre de maneira dependente do gradiente de pH entre o meio extracelular e o endossomo. Shwaderer et al. (2006) mostraram que, durante a acidose metabólica, a galectina-3 está mais expressa nas células do duto coletor cortical renal e facilita a polimerização de uma proteína denominada hensina, o que leva à diferenciação para um fenótipo celular secretor de íons H^+ e a conseqüente adaptação das células frente à esse estresse.

Assim, com o relato embasado nos resultados disponibilizados na literatura, nossos dados também reportam um importante papel da acidose intratumoral na atuação sobre processos intracelulares, como a regulação gênica. Nesse trabalho demonstramos que o pH ácido constitui um importante modulador negativo dos níveis de galectina-3 em melanomas (Figura 11 e 12) e melanócitos (Figura 11 - Melan-a), podendo então ser o fenômeno que contribui para a ocorrência da fração de células tumorais negativas para essa lectina dentro de uma mesma massa tumoral. Entretanto, vale ressaltar que outros mecanismos podem estar envolvidos na modulação tanto negativa quanto positiva de galectina-3 e estes precisam ser estudados.

Frente ao contexto de fatores capazes de modular a expressão de galectina-3 e mediante as análises de imunoistoquímica de melanomas humanos e murinos (Figuras 1 A, B, C e D; e 2 A, B, C e D) e o observado no ensaio de bioluminescência (Figura 21), o que fica evidente é a manutenção de um perfil heterogêneo de expressão de galectina-3 nesses tumores, com um porcentagem de células positivas e outra negativas para essa lectina. De fato, a heterogeneidade intratumoral tem um forte impacto para a evolução de tumores através de dois mecanismos principais. Primeiro, a diversidade de clones

fenotipicamente distintos comumente encontrados em tumores representa um cenário fértil por onde as forças de seleção podem atuar e, por outro lado, a coexistência desses clones pode resultar em uma complexa rede de interações biológicas entre eles que favorece o *fitness* individual de cada clone e a posterior manutenção da heterogeneidade intratumoral. Esses mecanismos, portanto, podem modular tanto a progressão do tumor quanto as suas respostas terapêuticas (AXELROD et al., 2006; MARUSYK e POLYAK, 2010).

Portanto, o favorecimento do crescimento tumoral nos modelos experimentais apresentados nesse trabalho (Figuras 14 A, 15 A, 18 e 19) pode ser devido à formação desse ambiente inicialmente heterogêneo em relação à expressão de galectina-3. O que ainda se faz necessário entender é o(s) mecanismo(s) pelo qual a heterogeneidade intratumoral de galectina-3 parece estar envolvida com o sucesso evolutivo do melanoma. Talvez seja pela promoção de interações celulares que determinam o *fitness* positivo da população tumoral como um todo, como é o caso da cooperação entre células tumorais proposta por Axelrod et al. (2006), na qual determinadas células podem fornecer os recursos limitados que outras células necessitam, permitindo a sobrevivência de um número maior de células e o subsequente acúmulo mais rápido de mutações; ou seja pela rede de interações formadas entre as células tumorais e as células que compõem o microambiente tumoral (estroma); ou ainda pela coexistência independente dessas populações celulares, cada uma com sua própria história evolutiva.

Como exemplo, a mutação no receptor do fator de crescimento epidermal, conhecido como Δ EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) é um marcador molecular comumente encontrado em glioblastoma multiforme e resulta na atividade constitutiva desse receptor independente da interação com o ligante. Bonavia et al.

(2011) demonstraram que há interação entre subpopulações que expressam Δ EGFR e subpopulações que expressam o receptor não mutado, denominado wtEGFR (*wild-type* EGFR). A expressão de Δ EGFR resulta na intensa indução e secreção de fatores solúveis como o IL-6 e/ou LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), os quais agem nas células wtEGFR e promovem o aumento da sobrevivência celular e do crescimento tumoral. Dessa forma, esse trabalho mostra evidências da existência de uma cooperatividade interpopulacional em glioblastomas, corroborando com a manutenção da heterogeneidade já reportada para esse tipo tumoral. Da mesma forma, Costa, et al. (2014) mostraram que tumores de mama invasivos exibem uma significativa heterogeneidade intratumoral em relação à expressão da ADAM23 (*A Desintegrin And Metalloproteinase 23*) e isso é crítico para o crescimento tumoral e estabelecimento de metástase. Os autores demonstraram que células tumorais ADAM23 negativas promovem o crescimento tumoral e metástase por aumentar a capacidade proliferativa e de invasão das células tumorais adjacentes ADAM23 positivas através da produção de LGI4 (*Leucine-rich Glioma Inactivated 4*) e óxido nítrico (NO), os quais são captados pelas células ADAM23 positivas.

De fato, a heterogeneidade intratumoral representa um grande obstáculo para o tratamento efetivo do câncer e para a medicina personalizada. Um maior número de estudos de alta qualidade é necessário para entender a composição dos tumores e monitorar as mudanças na população tumoral durante a progressão da doença e/ou tratamento e, então, melhorar o diagnóstico e o esquema terapêutico do câncer (ALMENDRO, et al., 2013). A galectina-3 é altamente conservada entre as espécies há milhões de anos e são as responsáveis pelo reconhecimento do que podemos chamar de “*glicocode*”. Dessa forma, é necessário entender melhor a complexidade das funções

executadas pela galectina-3, que é uma molécula pleiotrópica e de mecanismos duais, além de compreender o seu envolvimento na progressão tumoral e porque isso parece ser mantido ao longo da escala evolutiva do tumor. Portanto, ao utilizar uma molécula como alvo para estudar a dinâmica de progressão do melanoma, buscamos compreender os aspectos evolutivos nele inseridos e, futuramente, adicionar novos conceitos na elaboração de abordagens terapêuticas mais eficientes.

6. CONCLUSÕES

Tumores de melanomas murino e humano apresentam um perfil heterogêneo de expressão de galectina-3. A manutenção desse perfil heterogêneo aumenta o *fitness* da população de células positivas e negativas para galectina-3, favorecendo assim o crescimento tumoral. A expressão de galectina-3 pode ser modulada por acidose e não por hipóxia; a diminuição de expressão de galectina-3 frente à acidose tumoral pode ser uma explicação para a manutenção da fração de células tumorais negativas para essa lectina na massa tumoral.

ANEXO A

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para uso dos camundongos C57BL6

CÓPIA

INSTITUTO DE MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Assinado por:
 Data: 06/11/12
 Assinado por:

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 06.11.2012, após atendimento a diligência encaminhada APROVOU *ad-referendum* o Protocolo de Pesquisa nº 290/12 intitulado: "Modulação da expressão de galectina-3 frente às pressões seletivas de pH e oxigenação: um mecanismo para a heterogeneidade tumoral?" que utilizará 147 camundongos, apresentado pelo Departamento de Radiologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Roger Chammas

Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina Ferreira Cardoso

CEP-FMUSP, 06 de Novembro de 2012.

Prof. Dra. Maria A. Kato Foglia
 Vice Coordenadora de Pós-Graduação
 Área de Oncologia
 FMUSP

 Dr. Eduardo Pompeu
 Coordenador
 Comissão de Ética no Uso de Animais

 Prof. Dr. Paulo Buziapedes Marchiori
 Vice-Coordenador
 Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
 Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire, 2º andar CEP 01246-903 – Fone: 3061-8004
 mail: cep_fm@usp.br

ANEXO B

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para uso dos camundongos Balb/c NUDE

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29/05/2014, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 068/14 intitulado: "MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 FRENTE ÀS PRESSÕES SELETIVAS DE pH e OXIGENAÇÃO: UM MECANISMO PARA A HETEROGENEIDADE TUMORAL?" que utilizará 20 animais da espécie Camundongo, apresentado pelo DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA E ONCOLOGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Roger Chammas

Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina Ferreira Cardoso

CEUA-FMUSP, 29 de Maio de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO C

Carta de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Departamento de Radiologia

Av. Dr. Arnaldo, 455 – 4º andar – sala 4123
CEP 01246-903
São Paulo - SP - Brasil
Fone/Fax: (11) 3061.7161

APROVAÇÃO

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, APROVOU, em 13 de agosto de 2014, o projeto de pesquisa: **"Modulação da expressão de galectina-3 frente às pressões seletivas de pH e oxigenação: um mecanismo para a heterogeneidade tumoral?"**

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Roger Chammas

Pesquisador Executante: Ana Carolina Ferreira Cardoso

Supervisão: Luciana Nogueira de Sousa Andrade

São Paulo, 13 de agosto de 2014

Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai
Presidente da Comissão de Biossegurança
Departamento de Radiologia
FMUSP

7. BIBLIOGRAFIA

AHMED, H., CAPPELLO, F., RODOLICO, V., & VASTA, G. R. (2009). Evidence of heavy methylation in the galectin 3 promoter in early stages of prostate adenocarcinoma: development and validation of a methylated marker for early diagnosis of prostate cancer. *Transl Oncol*, 2(3):146-56.

AKAHANI, S., NANGIA-MAKKER, P., INOHARA, H., KIM, H. R., & RAZ, A. (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family . *Cancer Res*, 57 5272– 5276.

ALMENDRO, V., MARUSYK, A., & POLYAK, K. (2013). Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 8:277–302.

AXELROD, R., AXELROD, D. E., & PIENIA, K. J. (2006). Evolution of cooperation among tumor cells. *PNAS*, 13474–13479.

BHUTANI, N., DAVID, M. B., & BLAU, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* 146.

BONAVIA, R., INDA, M.-D.-M., & CANAVEE, W. K. (2011). Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: A Social Network . *Cancer Res*, 4055-4060.

BOSCHER, C., DENNIS, J. W., & NABI, I. R. (2011). Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 23:383–392.

BROWN, E. R., DOIG, T., ANDERSON, N., BRENN, T., DOHERTY, V., XU, Y., et al. (2012). Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. *European Journal of Cancer*, 8 6 5 –8 7 4.

CASTRONOVO, V., VAN DEN BRULE, F. A., JACKERS, P., CLAUSSE, N., LIU, F. T., GILLET, C., et al. (1996). Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol*, 179(1):43-8.

CAVAGNARI, B. M. (2012). Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanisms work. *Arch Argent Pediatr*, 110 (2), 132-136.

CHOO, K. B. (2011). Epigenetics in disease and cancer. *Malays J Pathol*, 33(2):61-70.

COMPAGNO, D., LADERACH, D. J., GENTILINI, L., JAWORSKI, F. M., & RABINOVICH, G. A. (2013). Delineating the “galectin signature” of the tumor microenvironment. *OncoImmunology*.

- COSTA, E. T., BARNABÉ, G. F., LI, M., DIAS, A. A., MACHADO, T. R., ASPRINO, P. F., et al. (2014). Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LGI4 and nitric oxide signals. *Oncogene*, doi: 10.1038/onc.2014.70.
- DAGHER, S. F., WANG, J. L., & PATTERSON, R. J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1213–1217.
- DAMAGHI, M., WOJTKOWIAK, J. W., & GILLIES, R. J. (2013). pH sensing and regulation in cancer. *Frontiers in Physiology*, 1-10.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G., & THOMPSON, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, (7): 11-20.
- DEMOTTE, N., STROOBANT, V., COURTOY, P. J., VAN DER SMISSEN, P., COLAU, D., LUESCHER, I. F., et al. (2008). Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity*, 28, 414–424.
- DI LELLA, S., SUNDBLAD, V., CERLIANI, J. P., GUARDIA, C. M., ESTRIN, D. A., VASTA, G. R., et al. (2011). When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*, 50, 7842–7857.
- DIAZ-CANO, S. J. (2012). Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable . *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 1951-2011.
- DUMIC, J., & LAUC, G. F. (2000). Expression of galectin-3 in cells exposed to stress - roles of Jun and NF- κ B. *Cell Physiol Biochem* , 10:149–158 .
- 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*, 279(33):34922–30.
- FANG, J. S., GILLIES, R. D., & GATENBY, R. A. (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, 330–337.
- FUKUMORI, T., OKA, N., TAKENAKA, Y., NANGIA-MAKKER, P., ELSAMMAN, E., KASAI, T., et al. (2006). Galectin-3 regulates mitochondrial stability and anti-apoptotic function in response to anti-cancer drugs in prostate cancer. *Cancer Res*, (66) 3114–3119.
- FUKUMORI, T., TAKENAKA, Y., YOSHII, T., KIM, H. R., HOGAN, V., INOHARA, H., et al. (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.*, 63 (23), 8302–8311.

FUNASAKA, T., RAZ, A., & NANGIA-MAKKER, P. (2014). Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. *Seminars in Cancer Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.03.004>.

GATENBY, R. A., & GILLIES, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews*, (4): 891-899.

GHAZARIAN, H., IDONI, B., & OPPENHEIMER, S. B. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *acta histochemica*, 236–247.

GILLIES, R. J., & GATENBY, R. A. (2007). Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr*, 39:251–257.

GLINSKY, V. V., GLINSKY, G. V., GLINSKY, O. V., HUXLEY, V. H., TURK, J. R., MOSSINE, V. V., et al. (2003). Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res*, 63, 3805–3811.

GREIJER, A. E., VAN DER GROEP, P., KEMMING, D., SHVARTS, A., SEMENZA, G. L., MEIJER, G. A., et al. (2005). Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*, 206 (3): 291-304.

HANAHAHAN, D., & WEINBERG, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57–70.

HANAHAHAN, D., & WEINBERG, R. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–674.

HAUDEK, K. C., PATTERSON, R. J., & WANG, J. L. (2010). SR proteins and galectins: what's in a name? *Glycobiology*, 20(10):1199–207.

HOLLIDAY, R. (2006). Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*, 1:2, 76-80 .

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

KELLER, S., ANGRISANO, T., FLORIO, E., PERO, R., DECAUSSIN-PETRUCCI, M., TRONCONE, G., et al. (2013). DNA methylation state of the galectin-3 gene represents a potential new marker of thyroid malignancy. *Oncol Lett*, 6(1):86-90.

KIM, H. R., LIN, H. M., BILIRAN, H., & RAZ, A. (1999). Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res*, 4148–4154.

KRESO, A., & DICK, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 275 - 291.

LADERACH, D. J., GENTILINI, L. D., GIRIBALDI, L., DELGADO, V. C., NUGNES, L., CROCI, D. O., et al. (2013). A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res*, 73:86-96.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.

LAGADIC-GOSSMANN, D., HUC, L., & LECUREUR, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ*, 11, 953-961.

LARSEN, L., CHEN, H.-Y., SAEGUSA, J., & LIU, F.-T. (2011). Galectin-3 and the skin. *Journal of Dermatological Science*, 85–91.

LEAL, M., CALCAGNO, D. Q., CHUNG, J., FREITAS, V. M., DEMACHKI, S., ASSUMPÇÃO, P. P., et al. (2014). Deregulated expression of annexin-A2 and galectin-3 is associated with metastasis in gastric cancer patients. *Clin Exp Med*, DOI 10.1007/s10238-014-0299-0.

LI, Z., DONG, L., DEAN, E., & YANG, L. V. (2013). Acidosis decreases c-Myc oncogene expression in human lymphoma cells: a role for the proton-sensing G protein-coupled receptor TDAG8. *Int J Mol Sci*, 20236–20255.

LIN, H. M., PESTELL, R. G., RAZ, A., & KIM, H. R. (2002). Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*, 21, 8001–8010.

LIU, F. T., PATTERSON, R. J., & WANG, J. L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 263– 273.

LIU, F.-T., & RABINOVICH, G. A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, (1):29-41.

LIU, F.-T., & RABINOVICH, G. A. (2010). Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 158–182.

MACHADO, C. M., ANDRADE, L. N., TEIXEIRA, V. R., COSTA, F. F., MELO, C. M., DOS SANTOS, S. N., et al. (2014). Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGFβ1-induced macrophages. *Cancer Med*, doi: 10.1002/cam4.173. [Epub ahead of print].

- MAHMOUD, L. K., ARFAOUI, A., KHIARI, M., CHAAR, I., EL AMINE, O., HMIDA, A., et al. (2011). Loss of galectin-3 expression in mucinous colorectal carcinomas is associated with 5'CpG island methylation in Tunisian patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19(3):258-65.
- MARGADANT, C., VAN DEN BOUT, I., VAN BOXTEL, A. L., THIJSEN, V. L., & SONNENBERG, A. (2012). Epigenetic regulation of galectin-3 expression by betal integrins promotes cell adhesion and migration. *Journal of Biological Chemistry* , 44684–44693.
- MARKOWSKA, A. I., JEFFERIES, K. C., & PANJWANI, N. (2011). Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 29913–29921.
- MARKOWSKA, A. I., LIU, F.-T., & PANJWANI, N. (2010). Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J. Exp. Med.* 207, 1981-1993.
- MARUSYK, A., & POLYAK, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta. Author manuscript*, 1-28.
- MCBRIAN, M. A., BEHBAHAN, I. S., FERRARI, R., SU, T., HUANG, T.-W., LI, K., et al. (2013). Histone acetylation regulates intracellular pH. *Molecular Cell*, 49, 310–321.
- MOHTAT, D., & SUSZTAK, K. (2010). Fine tuning gene expression: the epigenome. *Semin Nephrol*, 30(5): 468–476.
- NANGIA-MAKKER, P., HONJO, Y., SARVIS, R., AKAHANI, S., HOGAN, V., PIENTA, K. J., et al. (2000). Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 156(3):899-909.
- NEWLACZYL, A. U., & YU, L.-G. (2011). Galectin-3 - A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Letters* 313, 123-128.
- OBA-SHINJO, S., CORREA, M., RICCA, T., MOLOGNONI, F., PINHAL, M., NEVES, I., et al. (2006). Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia*, 8(3):231-41.
- OLBRYT, M., HABRYKA, A., TYSKIEWICS, T., RUSIN, A., CICHON, T., JARZAB, M., et al. (2011). Melanoma-associated genes, MXI1, FN1, and NME1, are hypoxia responsive in murine and human melanoma cells. *Melanoma Res*, 21(5): 417-25.

OLBRYT, M., JARZAB, M., JAZOWIECKA-RAKUS, J., SIMEK, K., SZALA, S., & SOCHANIK, A. (2006). Gene expression profile of B16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions *in vitro*. *Gene Expr*, 13(3):191-203.

PARK, J. W., VOSS, P. G., GRABSKI, S., WANG, J. L., & PATTERSON, R. J. (2001). Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *NuclAcids Res*, (17):3595–602.

PEPPICELLI, S., BIANCHINI, F., CONTENNA, C., TOMBACCINI, D., & CALORINI, L. (2013). Acidic pH via NF- κ B favours VEGF-C expression in human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*.

PEPPICELLI, S., BIANCHINI, F., TORRE, E., & CALORINI, L. (2014). Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*.

PFAFFL, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9):e45.

PIETRO, V. G., MOURAD-ZEIDAN, A. A., MELNIKOVA, V., JOHNSON, M. M., LOPEZ, A., DIWAN, A. H., et al. (2006). Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. *Clin Cancer Res*, 12(22):6709-15.

RABINOVICH, G. A., & TOSCANO, M. A. (2009). Turning ‘sweet’ on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 338-352.

RACKER, E. (1974). History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell. Biochem.*, 5, 17–23.

RADOSAVLJEVIC, G., VOLAREVIC, V., JOVANOVIĆ, I., MILOVANOVIĆ, M., PEJNOVIĆ, N., ARSENIJEVIĆ, N., et al. (2012). The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res*, 52:100–110.

RAGHUNAND, N., GATENBY, R. A., & GILLIES, R. J. (2003). Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *The British Journal of Radiology*, 11-22.

REGO, M. J., MELLO, G. S., SANTOS, C. A., CHAMMAS, R., & BELTRÃO, E. I. (2013). Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. *Med Mol Morphol*, 46(2): 92-6.

REGO, M. J., SILVA FILHO, A. F., FERRAZ CORDEIRO, M., SANTOS, P. B., & BELTRÃO, E. I. (2014). The glycomic profile of invasive ductal carcinoma of the

breast is altered in patients with hypoxic regions: implications for tumor behavior. *Folia Histochem Cytobiol*, 52(2): 96-103.

SALAJEGHEH, A., DOLAN-EVANS, E., SULLIVAN, E., IRANI, S., RAHMAN, M. A., VOSGHA, H., et al. (2014). The expression profiles of the galectin gene family in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma with particular emphasis on galectin-1 and galectin-3 expression. *Exp Mol Pathol*, 96(2):212-8.

SANO, H., HSU, D. K., YU, L., APGAR, J. R., KUWABARA, I., YAMANAKA, T., et al. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.*, 165, 2156–2164.

SEDLAKOVA, O., SVASTOVA, E., TAKACOVA, M., KOPACEK, J., PASTOREK, J., & PASTOREKOVA, S. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in Physiology*, doi: 10.3389/fphys.2013.00400.

SEMENZA, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148, 339 - 408.

SHIMURA, T., TAKENAKA, Y., TSUTSUMI, S., HOGAN, V., A, K., & RAZ, A. (2004). Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res*, 64(18):6363–7.

SHWADERER, A. L., VIJAYAKUMAR, S., AL-AWQATI, Q., & SHWARTZ, G. J. (2006). Galectin-3 expression is induced in renal β -intercalated cells during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal*, 290: 148-158.

STRAUBE, T., VON MACH, T., HONIG, E., GREB, C., SCHNEIDER, D., & JACOB, R. (2013). pH-Dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*, 14: 1014–1027.

VALENT, P., BONNET, D., DE MARIA, R., LAPIDOT, T., COPLAND, M., MELO, J. V., et al. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 1 - 9.

VESCHI, V., PETRONI, M., BARTOLAZZI, A., ALTAVISTA, P., DOMINICI, C., CAPALBO, C., et al. (2014). Galectin-3 is a marker of favorable prognosis and a biologically relevant molecule in neuroblastic tumors. *Cell Death Dis*, 5(3): e1100.

VON KLOT, C. A., KRAMER, M. W., PETERS, I., HENNENLOTTER, J., ABBAS, M., SCHERER, R., et al. (2014). Galectin-1 and Galectin-3 mRNA expression in renal cell carcinoma. *BMC Clin Pathol*, 14: 1 - 7.

VON MACH, T., CARLSSON, M. C., STRAUBE, T., NILSSON, U., LEFFLER, H., & JACOB, R. (2013). Ligand binding and complex formation of galectin-3 is modulated

by pH variations. *Biochemical Journal Immediate Publication*, doi:10.1042/BJ20130933.

WYKOFF, C. C., BEASLEY, N. J., WATSON, P. H., TURNER, K. J., PASTOREK, J., SIBTAIN, A., et al. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*, 7075-83.

XU, Y., GU, X., GONG, M., GUO, G., HAN, K., & NA, R. (2013). Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 14:10, 897–906.

YANG, R.-I., RABINOVICH, G. A., & LIU, F.-T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, (10) 1-24.

YANG, R.-Y., HSU, D. K., & LIU, F.-T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (93) 6737–6742.

YOSHII, T., FUKUMORI, T., HONJO, Y., INOHARA, H., KIM, H. R., & RAZ, A. (2002). Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, (277) 6852–6857.

ZENG, Y., DANIELSON, K. G., ALBERT, T. J., SHAPIRO, I. M., & V, R. M. (2007). HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. *J Bone Miner Res*, (12):1851-61.

ZHOU, Z., JING, J., PENG, J., MAO, W., ZHENG, Y., WANG, D., et al. (2014). Expression and clinical significance of galectin-3 in osteosarcoma. *Gene*, 546(2):403-7.