

LUCIANA NOGUEIRA DE SOUSA ANDRADE

**Evidência da dualidade funcional de galectina-3  
no crescimento de melanoma murino**

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

Área de concentração: Oncologia  
Orientador: Dr. Roger Chammas

São Paulo

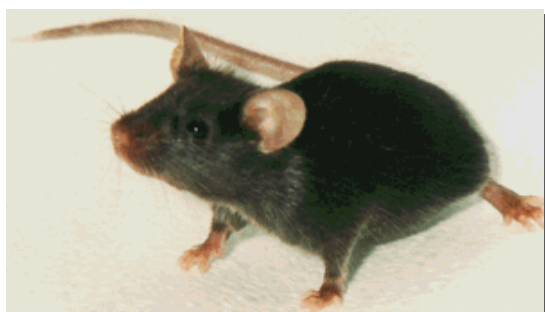
2007

*There are more things in the heaven and earth,  
Horatio/Than are dreamt of your philosophy.*

Hamlet, W. Shakespeare

*Yes, but we are working on it!*  
Unweaving the rainbow, Richard Dawkins

## **Dedicatória**



Camundongo da linhagem C57BL/6

**A todos animais que contribuem para o progresso da ciência.**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
LISTA DE ABREVIATURAS .....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VII
INTRODUÇÃO .....	1
Tumores como microambientes compostos por diferentes tipos celulares.....	1
Imunidade inata e câncer: o papel de macrófagos na progressão de tumores.....	3
Neutrófilos e câncer: efeito pró versus anti-tumoral.....	6
Outros tipos de células da imunidade inata envolvidas com a progressão de tumores..	6
Angiogênese tumoral como resultado das interações entre os diferentes tipos celulares do microambiente.....	7
Lectinas, galectinas e galectina-3.....	14
Galectina-3 e câncer.....	19
Galectina-3: importante molécula moduladora do processo inflamatório. Uma possível correlação com a progressão de tumores?.....	25
OBJETIVO GERAL .....	29
Objetivos específicos .....	29
METODOLOGIA .....	31
1. Manutenção de células em cultura.....	31
Animais .....	32
2. Análise do acúmulo de galectina-3 por <i>Western Blot</i> .....	32
2.1 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares.....	32
2.2 Quantificação protéica.....	33
2.3 Eletroforese e transferência para membrana PVDF.....	33
3. Curva de proliferação de células Tm1 gal-3 <sup>-</sup> e Tm1 gal-3 <sup>+</sup> <i>in vitro</i> .....	35
4. Ensaio de sensibilidade dos clones Tm1 gal-3 <sup>-</sup> e Tm1 gal-3 <sup>+</sup> à estaurosporina.....	35
5. Cinética de implantação de tumores derivados de células Tm1 gal-3 <sup>-</sup> e Tm1 gal-3 <sup>+</sup> e caracterização morfológica do microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos selvagens C57BL/6.....	36
6. Histo e imunoistoquímica do microambiente de tumores implantados no coxim plantar e no subcutâneo de camundongos C57BL/6.....	37
7. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene de galectina-3.....	39
8. Extração, quantificação e integridade do RNA dos tumores .....	39
9. Ensaio de proteção à ribonuclease ( <i>Ribonuclease Protection Assay-RPA</i> ).....	41
10. Análise morfológica dos cortes imunoistoquímicos de tumores subcutâneos.....	43
11. Análise estatística.....	44
RESULTADOS.....	46
Acúmulo de galectina-3 em células de melanoma murino Tm1 transfectadas.....	46
Crescimento de células Tm1 gal-3 <sup>-</sup> e Tm1 gal-3 <sup>+</sup> <i>in vitro</i> .....	46
Sensibilidade à morte de células Tm1 gal-3 <sup>-</sup> e Tm1 gal-3 <sup>+</sup> .....	46
Cinética de recrutamento de células estromais galectina-3 positivas no microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos C57/BL6 selvagens.....	47

---

Análise da transplantabilidade e do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.....	49
Análise do microambiente tumoral subcutâneo de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3. ....	50
Análise da expressão gênica de fatores angiogênicos no microambiente tumoral-ensaio de proteção a ribonuclease. ....	53
DISCUSSÃO .....	66
Galectina-3 na proliferação e sensibilidade à morte em células de melanoma murino Tm1. ....	66
Galectina-3 na implantabilidade de melanoma murino <i>in vivo</i> .....	71
Galectina-3 no crescimento tumoral de melanoma murino <i>in vivo</i> : evidências da participação de galectina-3 na angiogênese tumoral.....	74
<i>Insight</i> mecanístico do processo de angiogênese modulado por galectina-3 em melanoma murino.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

APS: persulfato de amônio

aFGF ou FGF-1: fator de crescimento de fibroblasto ácido

bFGF ou FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto básico

CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato

CSF-1: fator estimulador de colônia 1 (*colony stimulating factor-1*)

DAB: 3,3-tetraidrocloro de diaminobenzidina

DEPC: dietil pirocarbonato

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: dietiltritol

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

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

PBS: tampão fosfato salina

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

PVDF: do inglês, *Hydrophobic polyvinylidene difluoride*

SDS: dodecil sódio sulfato

TAMs: macrófagos associados a tumores (*Tumor-Associated Macrophages*)

TEMED: N,N,N,N tetra metiletilenodiamina

TGF-  $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$

TIE-2 e -1: receptores de angiopoietina 1 e 2

UTP: uridina trifosfato

VEGF ou VEGF-A: fator de crescimento de endotélio vascular-A

VEGF-C: fator de crescimento de endotélio vascular-C

VEGFR-1 (ou Flt-1): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular-1

VEGFR-2 (ou Flk-1/KDR): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular-2

VEGFR-3 (ou Flt-4): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular

## RESUMO

Tumores são definidos como microambientes compostos não só pelas células malignas, mas também por células endoteliais, fibroblastos e leucócitos, que promovem o crescimento tumoral e a angiogênese. Galectina-3, uma proteína que se liga a  $\beta$ -galactosídeos, é abundantemente expressa por monócitos/macrófagos, dentre outros leucócitos. Inúmeras evidências sugerem que galectina-3 atua como uma molécula reguladora da resposta inflamatória. Tendo em vista que o infiltrado inflamatório pode promover a progressão de tumores, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se galectina-3, expressa tanto pela célula tumoral como pelas células estromais, modula o crescimento de melanoma. Para tal, células de melanoma murino Tm1 foram transfectadas com o gene de galectina-3. Ambos clones celulares (galectina-3 positivos e negativos) foram injetados na intrafáscia ou no subcutâneo de camundongos (fêmeas) C57BL/6 selvagens e/ou nocautes para o gene de galectina-3 para análise da implantabilidade e crescimento tumoral. Com relação à implantabilidade, não foi observado diferenças no estabelecimento de uma massa tumoral proliferativa em animais selvagens inoculados com células Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3 em animais selvagens.

Em relação a taxa de crescimento dos tumores, nenhum animal nocaute inoculado com células Tm1 galectina-3 positivas apresentou tumores de dimensões mensuráveis até o 11º dia pós-inóculo. Independente do nível de expressão de galectina-3 pela célula tumoral, os tumores originados nos animais nocautes apresentavam menor massa em gramas comparados ao grupo selvagem, sugerindo que galectina-3 expressa



---

pelas células estromais promove o crescimento tumoral. Ainda, os tumores originados nos animais nocautes e no grupo selvagem inoculado com células Tm1 galectina-3 positivas apresentavam menor extensão de área necrótica do que os animais selvagens inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas. Interessantemente, os animais selvagens e nocautes inoculados com células Tm1 galectina-3 positivas apresentaram tumores com menor área vascular e menor número de estruturas vasculares funcionais quando comparados aos animais selvagens inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas. A análise de expressão gênica nos tumores mostrou que os níveis relativos de RNAm de VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) foram menores nos animais inoculados com células Tm1 galectina-3 positivas em relação aos inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas, indicando que galectina-3 expressa pelas células tumorais atua como uma molécula anti-angiogênica. Finalizando, o presente trabalho sugere que galectina-3 pode atuar como uma molécula pró- ou anti-tumoral, dependendo do tipo celular que a expressa no microambiente tumoral.

**Descritores:** melanoma, galectina-3, neovascularização patológica

---

## ABSTRACT

Tumors have been described as microenvironments composed not only by malignant cells, but also by endothelial cells, fibroblasts and leukocytes, which can promote tumor growth and angiogenesis. Galectin-3, a  $\beta$ -galactoside binding protein, is expressed by monocytes/macrophages and others leukocytes. In fact, several lines of evidence suggest that galectin-3 act as master regulators of the inflammatory response. Based on the fact that the inflammatory infiltrate can promote tumor progression, the proposal of this study was to evaluate if galectin-3, either from tumor or stromal cells could modulate melanoma growth. Tm1 murine melanoma cell line was transfected with the galectin-3 gene. Both clones (galectin-3 negative and positive) were injected in the foot pad or subcutaneous in female C57BL/6 wild-type (WT) and galectin-3 knock-out (KO) mice to tumor engraftment and growth analysis. There was no difference in the tumor engraftment between animals injected with Tm1 galectin-3 positive or negative cells.

In addition, any knock-out mice injected with galectin-3 positive cells had measurable tumors up to day 11 post inoculation. Regardless the galectin-3 expression level in the melanoma cell, tumors from galectin-3 KO mice were smaller than those from WT animals, suggesting that galectin-3 expressed by stromal cells promotes tumor growth. Moreover, tumor necrotic area was smaller in KO mice and in wild-type animals injected with Tm1 galectin-3 positive cells compared to wild type animals injected with Tm1 galectin-3 negative cells. Interestingly, both vascular area and the number of functional vessels in animals injected with galectin-3 positive Tm1 cells were smaller in

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

