

Silvina Odete Bustos

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

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bustos, Silvina Odete

Resposta celular associada à expressão de galectina-3 em linhagens de melanoma expostas a irradiação / Silvina Odete Bustos. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

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

USP/FM/DBD-30/14

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

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Processos da carcinogênese	1
1.2 – Câncer de pele	2
1.3 – Resposta celular a radiações não ionizantes	6
1.4 – Radiação UVB e dano ao DNA	8
1.5 – Galectina-3	10
1.5.1 Estrutura de galectina-3	10
1.5.2 Localização e implicações de galectina-3 na carcinogênese	12
1.6 Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	18
2. OBJETIVO GERAL	23
2.1 -OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 –Cultivo de Células	25
3.2 –Irradiação com UVB	25
3.3 –Ensaio de Ciclo e Morte Celular	26
3.4 –Extração de proteínas	26
3.5 – Eletroforese em gel de Poliacrilamida e Western blot	27
3.6 –Imunofluorescência	28
3.7 –Detecção de galectina-3 extracelular	28
3.8 –Ensaio em <i>transwell</i> com meio condicionado	29
3.9 Ensaio clonogênico	29
3.10 –Ensaio de proliferação	30
3.11–Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em células da epiderme expostas a UVB	31
3.12 –Imunoprecipitação	32
3.13 Avaliação do conteúdo de vacúolos ácidos	33
3.14 Avaliação da massa mitocondrial e do conteúdo lisosomal	33

3.15 Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
3.16 Ensaio com LY290042.....	34
3.17 Inibição de JNK	35
3.18 Extração de DNA e determinação do número de cópias de DNA mitocondrial por PCR quantitativa em tempo real.....	36
3.19 Ensaio de siRNA.....	37
3.20 Isolamento mitocondrial para extração de proteínas.....	38
3.21 Análises estatísticas.....	38
CAPÍTULO 1	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 – A exposição à luz UVB mostrou indução de morte celular	40
4.2 – Avaliação da expressão de galectina-3 através de <i>western blot</i>	41
4.3 – Detecção de Gal-3 extracelular no sobrenadante da linhagem melan-a após irradiação e análise do efeito de Gal-3 no meio extracelular	42
4.4 – Análise do efeito de galectina-3 exógena através do ensaio clonogênico....	46
4.5 – Caracterização da localização subcelular de galectina-3 em Melan-a.....	48
4.6 – Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio após a exposição à luz UVB.....	55
4.7 – Detecção e quantificação de vacúolos ácidos após exposição à luz UVB e estudo de proteínas associadas à autofagia.....	61
4.8 – A detecção e quantificação do conteúdo lisossomal mostrou maior atividade de degradação na linhagem Tm1.....	64
4.9 – Avaliação do efeito do inibidor LY290042 no ciclo celular e no processo autofágico da linhagem Tm1.....	66
4.10 – Avaliação da massa mitocondrial e determinação do número de cópias de mtDNA	69
4.11 – O estudo da ativação de vias de sinal ativadas pelo estresse demonstrou a ativação de JNK em Tm1.....	75
4.12 – A análise da distribuição de JNK foi diferente entre Tm1 e melan-a após irradiação.....	77
4.13 – A análise da distribuição de JNK foi diferente entre Tm1 e melan-a após irradiação.....	82
4.14 – A inibição de galectina-3 em melan-a induziu morte celular após exposição à luz UVB.....	87
4.15 – A inibição de galectina-3 não modificou os níveis de produção de superóxido em melan-a.....	90
5. SUMÁRIOS DOS RESULTADOS	91

6. CONCLUSÕES	93
CAPÍTULO 2	94
2. OBJETIVO GERAL	95
2.1 -OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 - A avaliação da ativação de MAPKs após diferentes doses de UVB mostrou que essas vias são responsivas ao estímulo induzido pela luz UVB	96
3.2 - Caracterização da expressão de galectina-3 das linhagens em estudo.....	100
3.3 – O ensaio de coimunoprecipitação evidenciou a interação entre galectina-3 e ERK	105
3.4 – O fracionamento mitocondrial mostrou a presença de ERK na mitocôndria	107
3.5 – O ensaio de siRNA contra galectina-3 mostrou regulação da via de ERK... ..	109
3.6 – A análise de crescimento celular em células silenciadas para galectina-3 revelou uma alteração no perfil de crescimento	113
3.7 – As moléculas de ERK modificaram sua localização após UVB em células LOX silenciadas para galectina-3.....	116
3.8 – Análises de proliferação e imunofluorescência na linhagem SK-MEL-37 mostraram um perfil de resposta parecido ao observado em células LOX.....	116
4. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	125
5. CONCLUSÕES	126
6. CONCLUSÃO GERAL	127
COMITÊ DE ÉTICA	128
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	129

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

APS: Persulfato de amônio

CDR: domínio de reconhecimento a carboidratos

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

DHR: dihidrorodamina 123

ERK: extracellular signal –regulated kinase

GAL-3: galectina-3

INCA: Instituto Nacional do Câncer

JNK: c-Jun N terminal kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MMPs: Matriz Metaloproteinases

mtDNA: DNA mitocondrial

O₂^{·-}: superóxido

PBS: Tampão fosfato salina

ROS: Reactive Oxygen Species

SAPK: stress-activated protein kinase

SDS: dodecil sódio sulfato

siRNA: small interfering RNA

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

UVB: ultraviolet B light

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:

