

BEATRIZ ESSENFELDER BORGES

**PAPEL DA GALECTINA-3 FRENTE A ESTÍMULOS DE ESTRESSE OXIDATIVO
PROMOVIDO PELOS COMPOSTOS $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e
 $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ EM CÉLULAS DE MELANOMA TM1G3 E TM1MNG3.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Lia Sumie Nakao

CURITIBA

2009

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar todo seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como poucos)”.

Newton Freire Maia

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professor Silvio Zanata e professora Lia, pela oportunidade, incentivo, confiança e especialmente pela amizade.

A professora Adriana Mercadante pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos e colegas do laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, em especial Michele, Márcia, Chelin, Luiz, Katya, Sofia e Beth, pela paciência e ajuda nas horas difíceis. E todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram para a realização desse trabalho.

Aos alunos do laboratório de Matriz Extracelular, pela grande ajuda e empréstimos.

Aos colaboradores desse trabalho, Prof^a. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira do Instituto de Química da USP e Prof. Dr. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da USP. Sem a ajuda deles esse trabalho não teria acontecido.

Aos meus pais, José Borges Neto e Cléa Mara Essenfelder Borges, que fizeram o possível e o impossível para que um dia eu me tornasse uma profissional e, finalmente, pudesse dar os meus primeiros passos, depois de tantos tombos.

Em especial agradeço ao Kacco, pela imensa paciência quando dava chiliques porque o computador não funcionava, quando ligava desesperada dizendo que não conseguia usar um programa, quando perdia a paciência por qualquer coisa, ou seja, agradeço ter sobrevivido a essa fase.

Ao CNPq (Jovem Pesquisador), CAPES – PROCAD e Instituto do Milênio pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira me apoiaram para terminar esse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MELANOMA.....	1
1.2 GALECTINAS.....	3
1.3 GALECTINA-3.....	5
1.4 METAIS DE TRANSIÇÃO.....	11
1.5 METALODROGAS.....	14
1.6 LIGANTES DE COBRE INSPIRADOS EM BIOMOLÉCULAS COMO POSSÍVEIS AGENTES ANTITUMORAIS.....	15
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CULTURAS CELULARES.....	18
3.2.1 <i>Preparação dos Extratos Celulares</i>	19
3.2.2 <i>SDS – PAGE</i>	19
3.2.3 <i>Western Blot</i>	20
3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA OBSERVAÇÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS TM1MNG3 E TM1G3.....	21
3.4 FRACIONAMENTO CELULAR PARA LOCALIZAÇÃO DA GALECTINA-3.....	22
3.5 ENSAIOS DE DENSIDADE CELULAR.....	23
3.5.1 <i>Densidade celular por coloração Cristal Violeta</i>	23
3.5.2 <i>Densidade celular por MTT</i>	24
3.6 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR.....	24
3.7 SOLUÇÃO DOS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	25
3.8 TRATAMENTO DAS LINHAGENS TM1MNG3 E TM1G3 COM OS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	26
3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELOS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	26
3.9.1 <i>Citotoxicidade analisada por Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI)</i>	26
3.9.2 <i>Citotoxicidade por MTT</i>	27

3.10 DENSIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	27
3.11 ADESÃO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	27
3.12 PROTEÍNAS CARBONILADAS	28
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS CELULARES	29
4.2 IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA OBSERVAÇÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS CELULARES TM1MNG3 E TM1G3	30
4.3 FRACIONAMENTO CELULAR PARA LOCALIZAÇÃO DA GALECTINA-3.....	30
4.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	33
4.6 CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELOS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	34
4.7 DENSIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	36
4.8 ADESÃO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS [CU(ISAEPY) ₂](CLO ₄) ₂ , [ZN(ISAEPY)CL ₂] E [CU(ENIM)H ₂ O](CLO ₄) ₂	37
4.9 PROTEÍNAS CARBONILADAS	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	- Albumina sérica bovina
CDK	- <i>cyclin-dependent kinases</i>
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNPH	- <i>2,4-dinitrophenyl hydrazine</i>
FITC	- <i>fluorescein isothiocyanate</i>
Gal-3	- Galectina-3
GSH	- Glutaciona reduzida
GSSG	- Glutaciona disulfeto
HBSS	- Solução balanceada de sal de Hank
HEPES	- N-[2-hidroxietil]piperazina-N` - [2-etanosulfonato]
MEC	- matriz extracelular
MTT	- Metiltiazoltetrazólio
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PFA	- Paraformaldeído
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SFB	- Soro fetal bovino
SOD	- superóxido dismutase
TBST	- solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 20
TEMED	- <i>N,N,N,N</i> – tetrametil etilenodiamina
TM1G3	- Células de melanoma murino transfectadas com vetor com gene para proteína galectina-3
TM1MNG3	- Células de melanoma murino transfectadas com vetor vazio para proteína galectina-3
TRAIL	- <i>tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	- Tris (hidroximetil) amino metano
[Zn(isaepy)Cl ₂]	- Composto de Zinco com ligante isaepy: Zn(isaepy)
[Cu(isaepy) ₂](ClO ₄) ₂	- Composto de cobre com ligante isaepy: Cu(isaepy)
[Cu(enim)H ₂ O](ClO ₄) ₂	- Composto de cobre com ligante enim: Cu(enim)

RESUMO

A incidência do melanoma tem aumentado, e este câncer apresenta uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Além disso, poucos agentes demonstram atividade antitumoral significativa contra o melanoma metastático, o que justifica a busca por novos quimioterápicos. Neste sentido, muito esforço tem sido feito para se entender os mecanismos moleculares das etapas de progressão tumoral e metástase. A galectina-3 é uma proteína que participa de diversos processos importantes na biologia tumoral. Entretanto, a interpretação dos dados reportados é complexa, pois o papel desta proteína depende da sua localização celular, das interações protéicas envolvidas e da célula. Portanto, neste trabalho, investigamos a influência da expressão ectópica da galectina-3, nas respostas de células de melanoma ao tratamento com complexos de cobre. Complexos de cobre são compostos interessantes devido as suas propriedades redox, que podem ser moduladas pelos ligantes do íon cobre. Já foi demonstrado que complexos de cobre com isatinas ou derivados de isatinas possuem atividade anti-neuroblastoma. O composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ foi citotóxico tanto para as células que não expressam (TM1MNG3) como para as que expressam a galectina-3 (TM1G3), de forma dose-dependente nas concentrações de 25, 50 e 75 μM por 24h de exposição. Além disso, este composto também induziu estresse carbonílico, e inibiu a adesão a proteínas da matriz extracelular (MEC) após 24h. Estes efeitos foram mais pronunciados nas células TM1G3, indicando que a galectina-3 aumenta a susceptibilidade celular a danos oxidativos, perda da adesão e morte celular. O composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, por sua vez, produziu efeitos citotóxicos apenas após 48h de tratamento e em concentrações mais altas, como 100 μM , atingindo principalmente as células TM1MNG3. Estas células, de fato, apresentaram menos estresse carbonílico e mais inibição à adesão que as TM1G3 após tratamento com $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. O composto redox inativo $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2\text{Cl}_2]$ não produziu nenhum efeito em nossas condições experimentais. Assim, nossos dados indicam que dependendo do ligante, a reatividade dos complexos de cobre pode variar, modulando a intensidade de suas propriedades pró-oxidantes, e que a expressão da galectina-3 nas células de melanoma determina as respostas celulares aos estímulos pró-oxidantes dos complexos metálicos.

ABSTRACT

Melanoma incidence has increased, and this malignant neoplasia poorly responds to chemotherapy. In addition, few agents have demonstrated a significant antitumoral activity against metastatic melanoma, justifying the search for novel drugs. In this context, efforts have been done to elucidate the molecular mechanisms underlying tumor progression and metastasis. Galectin-3 is a protein involved in several important processes to tumor progression. However, interpretation of the available data is complex, since galectin-3 functions strongly depend on its cellular localization, protein interactions and on the cell. Therefore, in this work, we investigated the influence of ectopic expression of galectin-3 in melanoma responses to copper complex treatments. Copper complexes are interesting compounds due to their redox properties, which can be modulated by the metal ligands. It has been shown that Cu-isatin or isatin-derived ligands complexes have anti-neuroblastoma activity. Compound $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ was cytotoxic for both galectin-3-expressing (TM1G3) or -null cell (TM1MNG3), in a dose-dependent manner in concentrations of 25, 50 and 75 μM for 24h-treatment. Moreover, this compound also induced carbonyl stress and inhibited cell adhesion to extracellular matrix (ECM) proteins after 24h. These effects were more prominent in TM1G3 cells, indicating galectin-3 increases cell susceptibility to oxidative damage, loss of adhesion and cell death. Compound $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ produced cytotoxic effects only after 48h exposure and at higher concentrations, such as 100 μM , mainly in TM1MNG3 cells. These cells, in fact, presented less carbonyl stress and increased adhesion inhibition than TM1G3 cells after treatment with $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. Redox inactive $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2\text{Cl}_2]$ produced no effect in our experimental conditions. Thus, our data show that depending on the metal ligand, reactivity of the copper complexes can vary, modulating the intensity of their prooxidant property, and that galectin-3 expression in melanoma cells determines the cell response to prooxidant stimuli induced by the metal complexes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

Neoplasias malignas que se desenvolvem através de transformação de melanócitos são chamadas de melanoma. Essa neoplasia acomete principalmente a pele (melanoma cutâneo), mas pode também ocorrer no olho (melanoma ocular ou intra-ocular) e, outras áreas onde existem melanócitos como o tubo digestivo e as meninges (TUCKER & GOLDESTEIN, 2003). Os melanócitos surgem de células pluripotentes da crista neural. Sua sobrevivência, migração, e diferenciação estão relacionadas à expressão de determinadas moléculas, não apenas nas células que migram, mas também nos outros tipos celulares justapostos e na matriz extracelular (HERLYN & SATYAMOORTHY, 2001).

Apenas 4% de todos os tumores dermatológicos correspondem a melanoma cutâneo. Apesar de ser o menos freqüente é o mais agressivo, sendo responsável por aproximadamente 80% dos casos de morte de câncer de pele (HOUGHTON & POLSKY, 2002, KUPHAL & BOSSERHOFF, 2009). A incidência dessa neoplasia tem aumentado em diversos países; nos EUA foi a doença com aumento mais expressivo, tendo o número de casos dobrado nas últimas três décadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006). No Brasil, existem estimativas de que em 2009 ocorram 9.700 novos casos de melanoma. Os estados brasileiros com as maiores incidências de melanoma são: São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (INCA, 2009).

A radiação ultravioleta (UV) é o fator ambiental de maior risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo. Estudos sugerem que o risco de desenvolver câncer de pele está significativamente mais associado com um padrão de exposição intenso e intermitente ao sol que com um padrão de exposição

acumulativo (GILCHREST *et al.*, 1999). O histórico familiar de melanoma também é um fator de risco relacionado com a incidência desse tipo de câncer de pele. Aproximadamente 10% dos pacientes com melanoma apresentam um parente afetado por essa doença (CHUDNOVSKY *et al.*, 2005).

De acordo com as características clínicas e histopatológicas do tumor, a literatura vem propondo cinco estágios da progressão do melanoma (MEIER *et al.*, 1998; BALDI *et al.*, 2003). Primeiro estágio: nevus congênito, com características estruturais normais de melanócitos; segundo estágio: nevus displásico com estrutura atípica; terceiro ou de fase de crescimento radial primitivo em melanoma primário (RGP); o quarto estágio é o de fase de crescimento vertical avançado em melanoma primário (VGP), com potencial metastático; e por último melanoma metastático. Porém, devido à falta de marcadores co-relacionados com os estágios da doença há uma dificuldade em se determinar o estágio em que o tumor se encontra (GARBE, 2005). Um maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na transformação e progressão do melanoma é essencial para o estudo de marcadores e abordagens terapêuticas eficazes para essa neoplasia (MEIER *et al.*, 1998; BALDI *et al.*, 2003).

O diagnóstico precoce do melanoma é fundamental para o tratamento clínico do paciente, uma vez que são curáveis cirurgicamente quando detectados nos primeiros estágios. Dessa maneira, a identificação das alterações moleculares envolvidas em cada uma das fases da progressão dessa doença é importante para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos (CHIN, 2003).

Os mecanismos moleculares que levam à desregulação da homeostase que envolve os melanócitos são ainda desconhecidos (HAASS *et al.*, 2005). Porém, o

que já se sabe é que a transformação de melanócitos em melanomas ocorre devido a mutações gênicas em aproximadamente 25 a 40% dos casos (GHIORZO, 2003).

De acordo com estudos recentes as investigações por métodos de imagens são importantes na detecção inicial dessa neoplasia. Entretanto, são ineficientes na maioria das vezes na detecção de metástases e ainda produzem cerca de 7% de resultados falso-positivos (GARBE, 2005). As proteínas S-100 e MIA (atividade inibitória de melanoma) são marcadores tumorais promissores para o monitoramento tumoral, embora ainda pouco caracterizados (GARBE, 2005).

O melanoma apresenta uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Poucos agentes demonstram atividade antitumoral significativa contra o melanoma metastático (RODRIGUEZ-VICENTE *et al.*, 1998; HUNCHAREK *et al.*, 2001; LOTZE *et al.*, 2001). Os agentes quimioterápicos que têm sido amplamente utilizados no tratamento do melanoma metastático incluem, por exemplo, os agentes alquilantes (dacarbazina) (HUNCHAREK *et al.*, 2001; LOTZE *et al.*, 2001), análogos da platina (LOTZE *et al.*, 2001), nitrosouréias (RODRIGUEZ-VICENTE *et al.*, 1998; LOTZE *et al.*, 2001) e agentes antimitóticos (LOTZE *et al.*, 2001). O tratamento com agentes quimioterápicos geralmente leva a resistência das células tumorais a droga. O mecanismo de resistência permite que as células tumorais reparem as lesões provocadas pelas drogas no DNA, anulando seus efeitos citotóxicos e escapando da morte celular (COLVIN, 2001).

1.2 GALECTINAS

As galectinas são proteínas da família das lectinas animais que apresentam como características principais a afinidade por oligossacarídeos contendo β -galactose e alto grau de similaridade no domínio de reconhecimento de carboidratos

(CRD) (BARONDES *et al.*, 1994 a). As lectinas estão distribuídas pelo reino animal, sendo encontradas tanto nos invertebrados como nos vertebrados (YANG & LIU, 2003).

Atualmente já foram identificados 15 tipos diferentes de galectinas em tecidos de diversas espécies. Elas são classificadas em três grupos de acordo com o número e a organização estrutural do domínio de reconhecimento de carboidrato: grupo protótipo, repetição em *tandem* e químera (Figura 1). O grupo protótipo apresenta uma seqüência N-terminal curta e um único CRD, nesse grupo estão as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15. As galectinas do grupo repetição em *tandem* apresentam dois CRD diferentes unidos por uma seqüência curta com aproximadamente 70 aminoácidos. Dentro desse grupo estão as galectinas 4, 6, 8, 9, 12. E por último o grupo químera que apresenta um único CRD ligado ao domínio N-terminal que possui seqüências de resíduos de tirosina, prolina e glicina que se repetem de 8 a 12 vezes e o único representante deste grupo é a galectina-3 (COOPER, 2002).

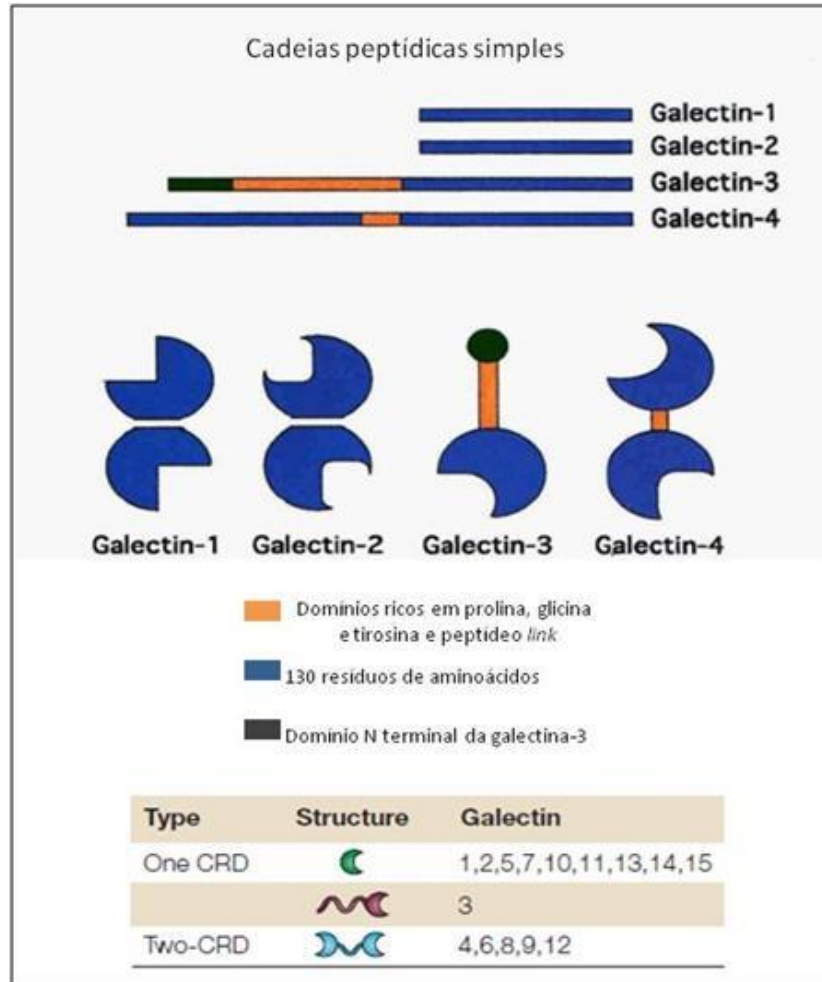


Figura 1: Esquema representativo da família das galectinas. O domínio conservado de reconhecimento de carboidratos (CRD) é constituído por cerca de 130 aminoácidos que são responsáveis pela ligação de carboidratos. Os 15 membros da família podem ser divididos em três grupos: grupo *protótipo* que contém um CRD (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15), grupo de *repetição em tandem* que contém dois CRD distintos em paralelo, ligados a um vinculador de até 70 aminoácidos (galectina-4, 6, 8, 9 e 12) e por último a galectina 3 pertencente ao grupo *quimera* que possui um único CRD com seqüências curtas de repetições de resíduos ricos em tirosina, prolina e glicina fundidas ao seu CRD. Adaptado de BARONDES *et al.*, 1994 e LIU *et al.*, 2005.

1.3 GALECTINA-3

A galectina-3 é uma proteína monomérica com cerca de 30 a 35 kDa (MAZUREK *et al.*, 2005). Apresenta três domínios estruturais distintos, o domínio amino terminal composto de 12 aminoácidos, uma seqüência similar a colágeno rica em tirosina, prolina e glicina que serve como substrato para metaloproteases e o domínio carbóxi-terminal de estrutura globular onde está localizado o CRD (BARONDES *et al.*, 1994 b). A galectina-3 humana é codificada pelo gene *LGALS3*

localizado no cromossomo 14. Essa proteína humana é similar a de murino, o que difere é a estrutura do éxon 1 e a organização dos sítios de início de transcrição (KADROFSKE *et al.*, 1998).

A galectina-3 é expressa por células inflamatórias, fibroblastos, células dendríticas, neurônios e células epiteliais como de intestino, mama, pele, rim e glândulas salivares (LE MARER, 2000). Esta proteína apresenta distribuição ubíqua, sendo encontrada tanto no meio intracelular, na membrana plasmática e no meio extracelular, na forma secretada (OCHIENG *et al.*, 2004). O mecanismo de secreção ainda não é conhecido. Sabe-se apenas que não ocorre pela via clássica, pois não apresenta peptídeo sinal (GONG *et al.*, 1999). Há inúmeros trabalhos que evidenciam que a porção amino terminal pode estar envolvida no processo de secreção, já que a deleção da porção provoca alteração na compartimentalização e função da galectina-3 (GONG *et al.*, 1999; DUMIC, *et al.*, 2006).

Em termos funcionais, a galectina-3 está envolvida em diversos processos celulares, como proliferação, adesão, migração e apoptose (LIU *et al.*, 2002; VILLA-VERDE *et al.*, 2002). Entretanto, os papéis desempenhados por esta proteína em cada um destes processos parecem ser dependentes da sua localização celular e das moléculas com quem ela interage (LIU *et al.*, 2002).

A galectina-3 que está presente no meio extracelular pode interagir com glicoconjugados da superfície celular e com proteínas da matriz extracelular, modulando interações célula-célula e célula-matriz (Figura 2). Diversos trabalhos relatam que essa proteína pode atuar como uma molécula de desadesão celular (KIM *et al.*, 1999; VILLA-VERDE, *et al.*, 2002), mas a maioria dos trabalhos indica que, neste ambiente, a galectina-3 atue promovendo adesão célula-matriz e adesão homotípica (DUMIC *et al.*, 2006). Além disso, essa lectina pode promover ligação

cruzada entre glicoconjugados presentes na superfície celular provocando ativação de vias de sinalização associadas a apoptose e proliferação celular (HUGHES, 2001).

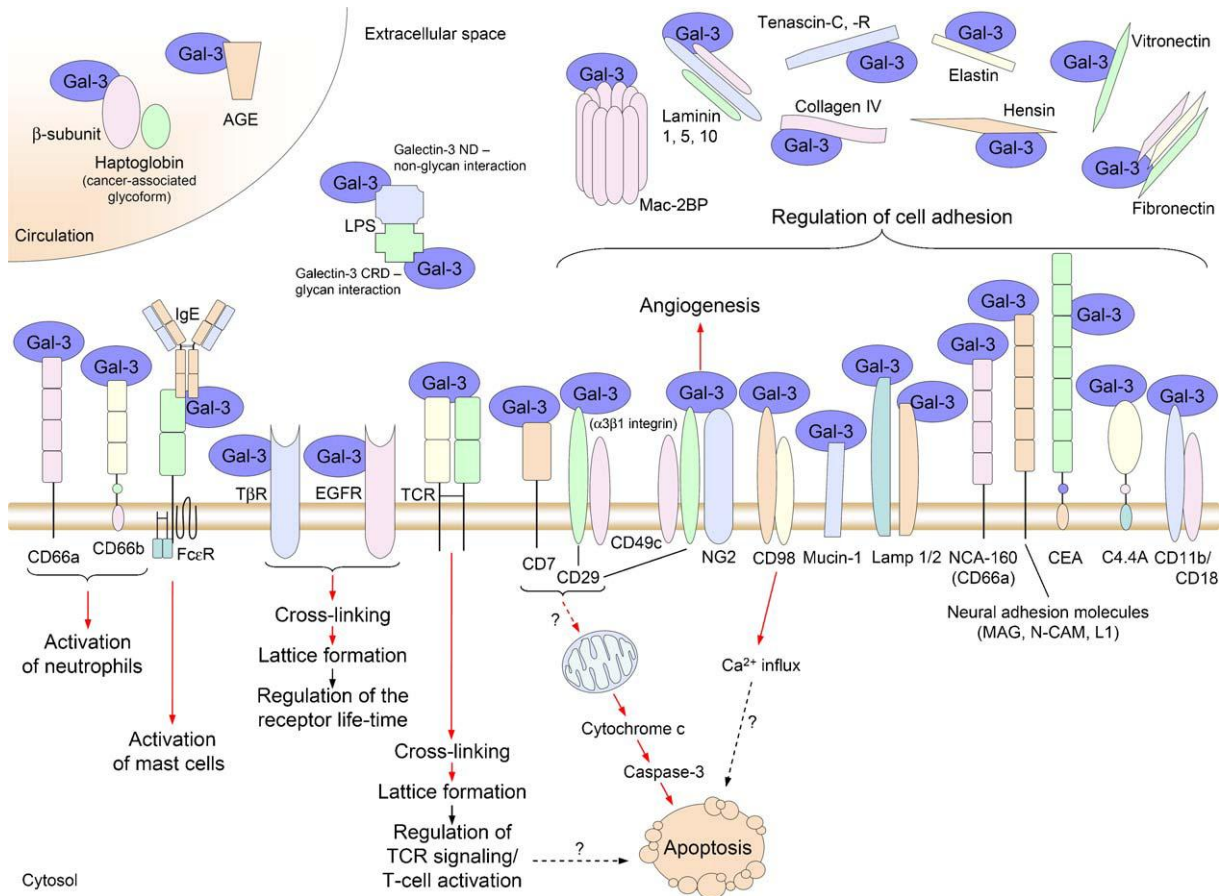


Figura 2: Esquema da interação da proteína galectina-3 no meio extracelular. A figura mostra as interações que a proteína galectina-3 faz no meio extracelular. As setas vermelhas representam os efeitos positivos. DUMIC, *et al.*, 2006.

Galectina-3 intracelular pode ser encontrada no citoplasma e núcleo (DAVIDSON *et al.*, 2002). A do citoplasma está envolvida no controle do processo de apoptose, estimulando adesão a matriz e a sobrevivência pós estímulos apoptóticos (MATARESE *et al.*, 2000 a), enquanto que a nuclear está envolvida no processo de *splicing* de RNA e na ativação de fatores de transcrição específicos (LIU *et al.*, 2002), (Figura 3).

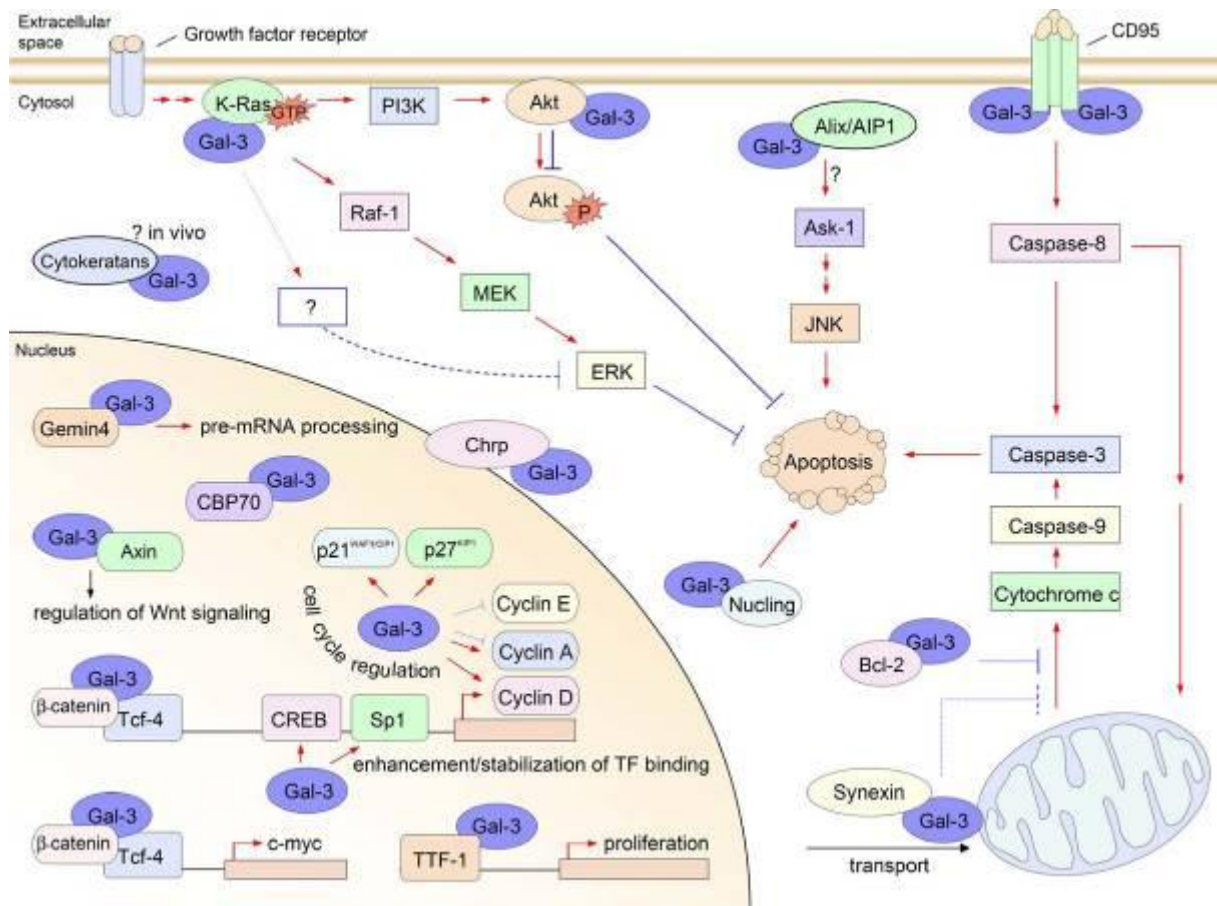


Figura 3: Esquema da interação da proteína galectina-3 no meio intracelular. A figura mostra as interações que a proteína galectina-3 faz no meio intracelular. As setas vermelhas representam os efeitos positivos. DUMIC, *et al.*, 2006.

Essa proteína também pode estimular ou inibir a proliferação celular (KIM *et al.*, 1999; ELLERHORST *et al.*, 2002). Os mecanismos que regulam tal proliferação celular ainda não são bem compreendidos, mas estudos recentes demonstram que a galectina-3 pode atuar na expressão de proteínas do ciclo celular, como ciclinas (A e E) e inibidores das quinases dependentes de ciclina (p21 e p27), mediar a ativação de vias de sinalização e aumentar a expressão de fatores de transcrição (PARON *et al.*, 2003; SHIMURA *et al.*, 2005). Muitos estudos têm demonstrado o papel de galectina-3 como molécula anti-apoptótica. Linfócitos B transfectados com galectina-3 são mais resistentes a apoptose induzida por estaurosporina (HOYER *et al.*, 2004). AKAHANI *et al.*, 1997, mostrou que células de câncer de mama que

expressam galectina-3 são mais resistentes a apoptose induzida por *anoikis* (perda de ancoragem). Da mesma forma, macrófagos de camundongos *knockout* para o gene da galectina-3 são mais sensíveis a apoptose que macrófagos de camundongos controle (HSU *et al.*, 2000).

O mecanismo que a proteína galectina-3 exerce sua atividade anti-apoptótica não é totalmente elucidado. Entretanto existem evidências que sugerem que depois de um estímulo apoptótico, ela é translocada do núcleo ou citoplasma para a mitocôndria onde provavelmente previne a perda de integridade mitocondrial e inibe a liberação do citocromo c (YU *et al.* 2002). Um trabalho de Oka e colaboradores, 2005, demonstrou que a galectina-3 aumenta a resistência de células de carcinoma de bexiga a apoptose induzida pela molécula TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) por ativar a via de sinalização PI3K/Akt (OKA *et al.*, 2005). Nesse sentido, outro estudo demonstrou que a atividade anti-apoptótica de galectina-3 é regulada por fosforilação (YOSHII *et al.*, 2001). A fosforilação da galectina-3 ocorre nos resíduos de serina⁶ pela ação da caseína quinase I (HUFLEJT *et al.*, 1993). Quando esse resíduo de serina é mutado, a proteína não pode ser fosforilada e sua atividade anti-apoptótica é diminuída, sugerindo dessa maneira que a fosforilação nesta posição esteja relacionada com a função anti-apoptótica da galectina-3 (YOSHII *et al.*, 2001). Além disso, a fosforilação é essencial para a exportação da galectina do núcleo após estímulo apoptótico (TAKENAKA *et al.*, 2004). Outros estudos têm demonstrado que a galectina-3 pode atuar como uma molécula pró-apoptótica, modulando a apoptose através da via de sinalização CD95 em células T (FUKUMORI *et al.*, 2004) ou através da interação com o complexo C29/CD7 presente na superfície de linfócitos (FUKUMORI *et al.*, 2003). Dessa maneira, as funções exercidas pela galectina-3 sugerem que a

expressão e a atividade dessa molécula sejam reguladas pela sua localização celular, glicosilação ou modulação da expressão de seus ligantes e, principalmente através do seu controle transcricional (CHIARIOTTI *et al.*, 2004).

Quase não tem informações na literatura que reportam o papel da galectina-3 na progressão de melanomas. De um modo geral, os relatos existentes indicam que a expressão da galectina-3 encontra-se aumentada ao longo da progressão de melanomas e os níveis de galectina-3 no soro de pacientes com melanoma metastático eram maiores que os níveis encontrados no soro de indivíduos saudáveis (VERECKEN *et al.*, 2006). Estudos também mostraram que melanomas metastáticos acumulam grandes quantidades de galectina-3 e que a expressão dessa proteína está associada com a apoptose de linfócitos relacionados ao tumor (ZUBIETA *et al.*, 2006). Prieto e colaboradores, 2006, mostraram que melanócitos adquirem altos níveis de galectina-3 ao longo da progressão tumoral, particularmente no núcleo e que melanomas originários de exposição intermitente ao sol eram caracterizados por uma intensa expressão de galectina-3 no citoplasma, enquanto que a expressão de galectina-3 no núcleo era restrita a melanomas originários de lesões de exposição crônica e contínua ao sol, sugerindo dessa maneira um envolvimento da radiação ultravioleta na ativação de galectina-3, e uma associação entre a translocação de galectina-3 para o núcleo e padrão de exposição crônico ao sol (PRIETO *et al.*, 2006).

A galectina-3 modula vários eventos que são essenciais para o desenvolvimento do câncer, como por exemplo, a proliferação, apoptose, angiogênese e a invasão tecidual (INOHARA *et al.*, 1996). Pesquisadores demonstraram que a fosforilação da galectina-3 contribui para a transformação

maligna de células epiteliais de mama por agir na modulação da atividade de genes importantes no processo de tumorigênese (MAZUREK *et al.*, 2005).

É crescente o número de evidências que demonstram que a galectina-3 modula a capacidade de migração das células tumorais (MATARE SSE *et al.*, 2000 a), possivelmente pela capacidade dessa proteína de se ligar a glicoconjugados presentes na superfície celular e na matriz extracelular (OCHIENG *et al.*, 1998). A galectina-3 também pode regular a expressão de integrinas, e dessa maneira atuar na invasão tumoral (MATARE SSE *et al.*, 2000 b).

O papel da galectina-3 tem sido demonstrado em câncer de tireóide. Já vem sendo descrito que é possível estabelecer uma correlação entre expressão de galectina-3 e a aquisição de um fenótipo mais agressivo nesse tipo de neoplasia. (COLI *et al.*, 2002).

1.4 METAIS DE TRANSIÇÃO

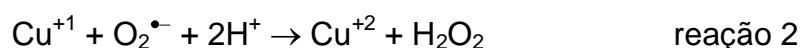
Metais de transição da primeira linha do bloco *d* da tabela periódica são importantes biologicamente, principalmente o ferro e o cobre, que constituem sítios funcionais de várias proteínas e enzimas. Os organismos desenvolveram mecanismos complexos e proteínas específicas para transportar, armazenar e entregar diferentes íons de metais de transição às proteínas específicas, minimizando sua disponibilidade como catalisadores de reações de óxido-redução nocivas (NTZIACHRISTOS *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2005).

O cobre há muito foi reconhecido como elemento de incontestável valor à vida, sendo um micronutriente para sobrevivência das células. O cobre participa de vários processos metabólicos sendo constituinte de diversas enzimas do organismo, como cofator de metalo-enzimas. As mais conhecidas são: a superóxido dismutase

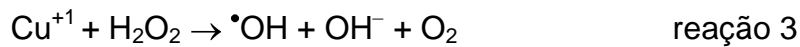
citoplasmática e a extracelular (SOD) que auxilia o organismo na eliminação de radicais superóxido, a citocromo c oxidase, essencial para a respiração celular, a tirosinase, envolvida na melanogênese e a dopamina β hidroxilase, importante na conversão de dopamina em noradrenalina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O cobre também participa na síntese da elastina e do colágeno, na síntese dos hormônios da tireóide e da hemoglobina e protege a bainha de mielina dos nervos (GAETKE & CHOW, 2003).

O cobre é um mineral amplamente distribuído nos alimentos, o que torna mais rara a sua deficiência. Os casos de déficit de cobre não são devidos à deficiência de cobre no organismo, mas à diminuição da sua proteína de transporte no sangue (ceruloplasmina) (DUTRA *et al.*, 2005). As deficiências de cobre também podem ser devidas a um excesso de zinco, manganês e molibdênio. Estes competem com o cobre nos locais de absorção. A condição mais comum de deficiência simultânea de zinco e cobre é a falta desses minerais na dieta ou aumento de fibras que diminuem a absorção dos mesmos. O excesso de chumbo, mercúrio e cádmio também dificulta a absorção do cobre. A baixa de cobre em estágios mais avançados causa anemia microcítica resistente ao tratamento habitual com ferro. Pode causar também mechas brancas precoces no cabelo, osteoporose e fragilidade vascular formando veias tortuosas. (BREWER, 2007).

Os íons de cobre existem dois estados de oxidação: Cu^{+1} e Cu^{+2} . Ambas as espécies são capazes de reagir com o radical superóxido, transformando-o em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (reações 1 e 2). Estas são as reações de catálise da SOD.



O Cu^{+1} também pode participar da geração de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), através de reação de Fenton (reação 3)



Assim, apesar de sua importância em diversos processos biológicos, íons de cobre livre, ou complexados com determinadas biomoléculas, podem induzir processos oxidativos em proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, podendo iniciar condições patológicas (da SILVEIRA *et.al.*, 2008). Estas propriedades redox de íons cobre têm direcionado pesquisas para o desenvolvimento de agentes antitumorais capazes de causar apoptose induzido por variados estímulos, incluindo o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2003). Particularmente, o papel pró-apoptótico do cobre tem sido extensivamente investigado baseado na proposta de ser um agente de baixa toxicidade (LINDER, 2001; ROTILIO *et al.* 2000; COYLE *et al.*, 2004).

Estudos têm sido feitos no sentido de observar a ação de compostos orgânicos na apoptose celular (CERCHIARO *et al.*, 2005). Esses compostos são amplamente empregados no combate ao câncer através da indução da apoptose nas células tumorais, ou bloqueando o ciclo celular em determinada fase (SCHIFF *et al.*, 1979). Entretanto, devido à complexidade das estruturas estudadas, as suas sínteses para produção em larga escala na terapia antitumoral tornam-se quase inviáveis. Dessa maneira a busca por terapias antitumorais mais econômicas e simples tornou-se um grande desafio, e tem iniciado uma busca por drogas pró-apoptóticas baseadas em complexos metálicos (WEST *et al.*, 1991). Diversos complexos de Cu(II) tiveram suas atividades biológicas avaliadas, especialmente relacionadas a danos ao DNA e a apoptose (DANIEL *et al.*, 2004). Particularmente, alguns destes complexos podem gerar eficientemente espécies reativas de oxigênio

(ROS), durante a catálise de substratos endógenos, que atacam biomoléculas, causando o estresse oxidativo (ex. SOD, tirosinase, citocromo oxidase) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.5 METALODROGAS

O interesse nos componentes metálicos para utilização em novas drogas e agentes de diagnósticos é comumente observado na área de investigação científica médica. A investigação nesta área baseia-se na possibilidade de interação destes íons metálicos com diversas biomoléculas, para contribuir no desenvolvimento de novas terapêuticas. Uma ampla quantia de complexos metálicos é usada clinicamente e encorajam futuros estudos para novas metalodrogas com atividade antitumoral (HARTINGER & KEPPLER, 2007). O estudo de metalodrogas ou metalofármacos constitui um enorme desafio na química de coordenação, já que inclui, entre outros tópicos, a especiação de metais em condições fisiológicas relevantes; métodos sensíveis de detecção e determinação dessas espécies contendo íons metálicos; as interações específicas dos metais com biomoléculas importantes, como proteínas, DNA, lipídios, carboidratos e membranas; além da elucidação dos mecanismos moleculares de sua ação no meio biológico (THOMPSON & ORVIG, 2003).

Neste contexto, são vários os exemplos de complexos metálicos, com ligantes naturais, sintéticos ou semi-sintéticos, que têm sido estudados com o objetivo de melhorar suas ações biológicas, incluindo atividade antiácida, antiinflamatória, fungicida, antimicrobiana, antiviral e antitumoral (MING, 2003). No caso dos agentes antitumorais, estudos pioneiros utilizavam metais não-essenciais como platina ou rutênio (LIPPARD, 1994). Estudos mais recentes têm sido também desenvolvidos

com metais essenciais, como o cobre, já que se espera que o nível de toxicidade dos compostos seja menor (CERCHIARO *et al.*, 2005).

1.6 LIGANTES DE COBRE INSPIRADOS EM BIOMOLÉCULAS COMO POSSÍVEIS AGENTES ANTITUMORAIS

Existe crescente interesse em estudar propriedades químicas e biológicas de complexos de cobre com ligantes de bases de Schiff, contendo grupos indol e pirazol, focando suas características estruturais e sua reatividade. Ligantes derivados de isatina, um indol endógeno, apresentam propriedades pró-apoptóticas em células humanas tumorais (LANE *et al.*, 2001), além de apresentarem atividade pró-oxidante (FERREIRA *et al.*, 2000), especialmente na oxidação de carboidratos e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (CERCHIARO *et al.*, 2004).

Estudos anteriores já mostraram que complexos de cobre com ligantes derivados de isatina, ou 2,3 dioxindol, apresentam atividade pró-apoptótica significativa em células de neuroblastoma (CERCHIARO *et al.*, 2005). Outros trabalhos mostram que esses ligantes foram inspirados em biomoléculas que ativam a sinalização para apoptose (COYLE *et al.*, 2004) o que torna a utilização destes compostos interessantes do ponto de vista antitumoral.

Diversos estímulos podem induzir processo apoptótico, incluindo a geração de ROS. Utilizando diferentes ligantes de cobre é possível modificar o potencial redox deste metal e modular outros processos biológicos fundamentais, como ciclo celular (LI *et al.*, 2005). Dentre as várias abordagens no estudo das moléculas-alvo para agentes quimioterapêuticos contra o câncer, destacam-se o desenvolvimento

de inibidores de quinases dependentes de ciclina, as chamadas CDK (*cyclin-dependent kinases*) (JEFFREY *et al.*, 1995).

Complexos de cobre podem ser agentes quimioterápicos promissores, se o ligante adequado proporcionar ações pró-apoptóticas, pró-oxidativas ou interferir em vias de sinalização antitumoral.

2 OBJETIVOS

Devido à importância do melanoma e ao possível papel da galectina-3 no comportamento tumoral, neste projeto avaliamos o papel desta proteína frente aos estímulos de dois complexos de cobre com possível ação oxidante, em células de melanoma. Além disso, avaliamos a modulação dos efeitos celulares pelos ligantes do cobre.

Particularmente analisamos:

- 1) a expressão e localização da galectina-3 nas células TM1G3 e TM1MNG3;
- 2) a proliferação e a adesão das células TM1MNG3 e TM1G3
- 3) a citotoxicidade induzida pelos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ nas células TM1G3 e TM1MNG3;
- 4) a proliferação e a adesão das células TM1MNG3 e TM1G3 sobre moléculas de matriz após exposição aos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$;
- 5) o estresse carbonílico gerado pelos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})_2\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ nas células TM1G3 e TM1MNG3;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURAS CELULARES

As linhagens celulares TM1MNG3 e TM1G3 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Roger Chammas, do laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Essas linhagens são derivadas da linhagem TM1, a qual foi obtida durante a progressão tumoral de melanócitos murino (melan-a) após inúmeros ciclos de desadesão (OBA-SHINJO *et.al.*, 2006). Análise dos genes e de proteínas expressos por essas células mostrou que durante o processo de transformação houve uma perda da expressão da galectina-3 (de SOUZA *et al.*, 2006). As células TM1 foram então transfectadas com 1 µg de plasmídeo contendo o gene da galectina-3 humana (pEF1-neo-Gal-3), ou com 1 µg do plasmídeo vazio (pEF1- neo) com Lipofectamina™ (Invitrogen). Estes vetores foram fornecidos pelo Dr. Fu-Tong Liu (Universidade da Califórnia, Davis, CA). As células transfectadas foram mantidas em RPMI contendo 5% do soro fetal bovino. Em seguida houve a seleção, surgindo assim, as duas linhagens que foram usadas nesse trabalho, TM1MNG3 (sem galectina-3) e TM1G3 (com galectina-3). (TEIXEIRA *et al*, comunicação pessoal). Estas linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) em pH 6.9 suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB Cultilab). O repique celular foi realizado 3 vezes por semana, numa proporção de 1:5 em placas p100. As células foram mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ e umidade controlada.

3.2 EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS CELULARES

3.2.1 Preparação dos Extratos Celulares

Células (TM1MNG3 e TM1G3) foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 células/placa p100 (TPP) com meio RPMI pH 6.9 (Cultilab) suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas em estufa, estas foram colocadas em gelo e lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) gelada. Após esse procedimento, foram adicionados 300 μ l de tampão de lise (1% NP40 em PBS), acrescido de inibidores de protease (0,01 M iodocetamida, 0,01 M benzamidina, 0,001 M NEM, 0,01 M 2-fenantrolina, 0,01 M PMSF) e de fosfatases (0,001 M NaPPi, 0,005 M NaF e 0,001 M Na_3VO_4) em cada placa. As células foram então raspadas das placas e com o auxílio de uma ponteira de micropipeta do tipo p-200 foi feita uma lise mecânica por 15 minutos. O conteúdo de cada placa foi coletado separadamente em microtubos (Axygen) e centrifugado a uma velocidade de 5000 g durante 20 minutos a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e o precipitado descartado.

A concentração de proteínas de cada amostra foi detectada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas a - 20°C.

3.2.2 SDS – PAGE

Foi utilizada a técnica de SDS-PAGE para a separação eletroforética das proteínas celulares de TM1MNG3 e TM1G3. Quatro por cento de acrilamida/bis acrilamida em tampão 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) contendo 0,4% SDS foi utilizado para o gel de empilhamento. Para o gel de separação, foi utilizada uma concentração de 15% acrilamida/bis acrilamida em tampão 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) contendo 0,4% SDS. Agentes catalisadores (persulfato de amônio e *N, N, N, N*-tetrametil

etilenodiamina TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos. Quantidades iguais em microgramas de proteínas (50 µg) de cada amostra foram misturadas ao tampão de amostra redutor (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,2% SDS, 10% glicerol, 0,005% azul de bromofenol e 50 mM mercaptoetanol) na proporção de 1:5 (tampão de amostra: amostra) e fervidas durante aproximadamente 5 minutos. As amostras foram cuidadosamente aplicadas nos poços dos géis e submetidas a uma corrente de 10 mA até a entrada das proteínas no gel de separação, com posterior aumento da corrente para 20 mA até a saída do gel da frente de migração. Marcadores de pesos moleculares (29, 45, 66, 97, 116 e 205 kDa) foram utilizados para determinação das massas das proteínas de interesse.

3.2.3 *Western Blot*

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) durante 30 minutos sob voltagem constante de 10 V, em sistema de transferência *semidry*. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão de transferência contendo 192 mM glicina, 25 mM Tris, 0,037% SDS e 20% metanol. Após este processo, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,2% Ponceau, 3% ácido acético glacial) e escaneadas para a verificação da quantidade de proteína igual para todas as linhagens. As membranas foram lavadas até a completa retirada do corante e incubadas durante uma hora com solução TBS-T (120 mM NaCl, 20 mM Tris e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) para que houvesse um bloqueio, com proteínas inertes ao experimento, dos sítios livres da membrana. Então, as membranas foram incubadas sob agitação, por 16 horas a

4°C, com solução de anticorpo primário (anti-galectina-3 produzido em rato, gentilmente cedido pelo Prof. Dr Roger Chammas) diluído 1:10 em tampão de bloqueio (TBS-T leite). Após a lavagem das membranas com TBS-T cinco vezes por 3 minutos cada, estas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de rato conjugada com peroxidase, Sigma) na diluição de 1:1000 em tampão de bloqueio, por uma hora a temperatura ambiente, e sob agitação. Novas lavagens foram feitas e as membranas foram então reagidas com o substrato da peroxidase (H₂O₂). A reação foi evidenciada utilizando substrato quimioluminescente West Pico (Pierce Co.) sobre a membrana, a qual foi exposta a um filme para autoradiograma (Kodak).

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA OBSERVAÇÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS TM1MNG3 E TM1G3

As duas linhagens celulares foram semeadas (5×10^3 células/poço) sobre lamínulas de 13 mm em uma placa de 24 poços (TPP) e cultivadas por 24 horas. Após esse período as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) por 20 minutos. Depois, foram lavadas mais três vezes com PBS e permeabilizadas por 30 minutos com 0,01% saponina em PBS. Em seguida os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1% BSA durante 2 horas à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo anti-galectina-3 não diluído, durante 16 horas em câmara úmida a 4° C. Para retirada dos anticorpos não ligados, lavaram-se as lamínulas três vezes com PBS e então, adicionou-se o anticorpo secundário anti-Ig de rato conjugado a FITC (Molecular Probes), diluído 1:800 em 1% BSA em PBS. O anticorpo secundário foi incubado durante 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz (câmara escura). Após a

incubação com o secundário, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS. Para a marcação do núcleo das células, foi realizada a incubação com 3 μ M DAPI (4', 6-diaminidino-2-fenilindol, Invitrogen) durante dez minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e então foi feita a montagem das lâminas utilizando meio de conservação Gel Mount Aqueous™ (Sigma). As células foram visualizadas com microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot), e analisadas pelo Adobe Photoshop. Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.4 FRACIONAMENTO CELULAR PARA LOCALIZAÇÃO DA GALECTINA-3

Células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 células/placa p100 (TPP) com meio RPMI pH 6.9 (Cultilab) suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas, as placas foram colocadas em gelo e lavadas duas vezes com PBS gelado. Em seguida as placas foram raspadas e o conteúdo transferido para microtubos (Axygen). Esses microtubos foram centrifugados a 3000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o decantado foi ressuspendido em 200 μ l de tampão MOPS-SACAROSE (20 mM MOPS-KOH, 250 mM sacarose, pH 7.4 e o coquetel de inibidores de protease (ROCHE) (LI & SHAH, 2002). As células foram lisadas por 2 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido / descongelamento, seguidos de 2 ciclos de 10 segundos no sonicador. Esse lisado foi centrifugado a 200 *g* por 5 minutos a 4°C. O decantado foi descartado (células não lisadas) e o sobrenadante foi centrifugado a 1475 *g* por 15 minutos. O decantado dessa centrifugação foi separado (FRAÇÃO N = Núcleo) e o sobrenadante foi centrifugado a 10800 *g* por 15 minutos. O precipitado foi separado (FRAÇÃO C= Mitocôndrias e grandes organelas) e o sobrenadante centrifugado a 29000 *g* por 15 minutos. O precipitado

foi separado (FRAÇÃO D = Submitocôndrias e microssomos) e o sobrenadante foi centrifugado. O precipitado e o sobrenadante foram separados. O precipitado corresponde a FRAÇÃO E = Membranas e o sobrenadante corresponde a FRAÇÃO S = Proteínas citoplasmáticas (LI & SHAH, 2002). As frações tiveram suas concentrações protéicas determinadas pelo método de Bradford. Em seguida, a expressão da galectina-3 foi avaliada por Western blotting como descrito em 3.2.2. Esses ensaios foram realizados em 3 experimentos independentes.

3.5 ENSAIOS DE DENSIDADE CELULAR

3.5.1 Densidade celular por coloração Cristal Violeta

Em uma placa de 96 poços, células TM1MNG3 e TM1G3 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/poço em meio RPMI 1640, pH 6.9 suplementado com 5% de SFB. Essas linhagens foram incubadas em estufa durante 4 horas. Após este período, o meio foi substituído por RPMI suplementado com 0,1% de SFB. Essas células foram mantidas, sob as mesmas condições de cultivo citadas anteriormente, durante 24 horas. Após esse tempo o meio dos poços foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta P1000 e as células foram delicadamente lavadas com 200 μ l de PBS. Retirado o PBS, 100 μ l de 4% PFA foram adicionados em cada poço durante 10 minutos. Após a fixação, as células foram incubadas com 100 μ l de 2% metanol por 10 minutos. As células foram então coradas durante 10 minutos com 30 μ l de 0,5% Cristal Violeta (Sigma), em 20% metanol (Synth). Os poços foram lavados 2 vezes com 300 μ l de água e o corante foi extraído com 100 μ l de 0,1M citrato de sódio pH 4,2 (em 50% metanol, pH 4,2). A leitura das absorbâncias foi realizada em 550 nm. Esses ensaios foram

realizados em quintuplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.5.2 Densidade celular por MTT

Em uma placa de 96 poços, 5×10^3 células TM1MNG3 e TM1G3 /poço foram plaqueadas em meio específico para essas linhagens. Após 16 horas, o meio foi trocado por meio contendo 0,1% de SFB. Após 24 horas, o meio foi aspirado e 200 μ l de uma solução 0,5 mg/ml de MTT (preparada em HBSS) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37° C durante 3 horas. O meio contendo MTT foi cuidadosamente retirado e 200 μ l de DMSO (Sigma) foram adicionados em cada poço. O meio foi homogeneizado 10 vezes. O conteúdo de cada poço foi transferido para outra placa de 96 poços devidamente identificada. A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 570 nm e descontada dos valores de absorbância em 655 nm. Esses ensaios foram realizados em triplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.6 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Placas de 96 poços foram tratadas com 15 μ g/mL de fibronectina, laminina, matrigel, e vitronectina diluídas em PBS. Após incubação de 16 horas a 4° C, os poços foram lavados para retirar as proteínas não ligadas e então bloqueados com 1% BSA por 2 horas a 37° C. Células TM1MNG3 e TM1G3 foram soltas das placas, contadas em câmara de Neubauer e ressuspendidas em tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mg/mL D-glicose, pH 7,4) acrescido de cátions divalentes (Mg²⁺ e Ca²⁺ na concentração de 1 mM cada). Depois disso, as células foram plaqueadas (10^5 células/poço) sobre os poços previamente tratados e as placas

mantidas a 37° C durante duas horas para que ocorresse a adesão. Os poços foram lavados três vezes para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol). O corante foi extraído (0,5% ácido acético, 50% metanol) e a absorbância foi mensurada em 650 nm (LUQUE *et.al.*, 1994). Esses ensaios foram realizados em quintuplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.7 SOLUÇÃO DOS COMPOSTOS $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$

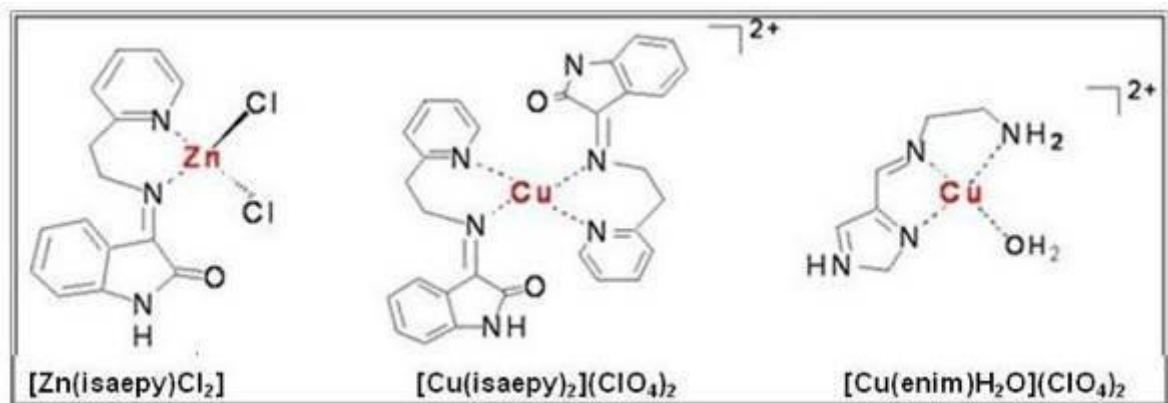


Figura 4: Estrutura química dos compostos utilizados nesse trabalho. Foram sintetizados pelo grupo da professora Doutora Ana Maria Ferreira do Instituto de Química da USP.

Esses compostos foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Prof^a. Dra Ana Maria da Costa Ferreira do Instituto de Química da Universidade de São Paulo com as massas moleculares: $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ 765 g/mol, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ 387 g/mol e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ 418,5 g/mol. Eles foram pesados e dissolvidos em uma mistura de água e DMSO (1:10 v/v) em uma concentração de 5 mM (solução estoque). Essas soluções foram então filtradas em membrana (Millipore) de 0,22 μm , divididas em alíquotas de 1 ml em tubos estéreis e estocadas a 20°C. Além dos compostos, foi preparada uma solução estoque do veículo (10% DMSO) para ser

utilizada como controle (FILOMENI *et al.*, 2007). A estrutura desses compostos está representada na figura 4.

3.8 TRATAMENTO DAS LINHAGENS TM1MNG3 E TM1G3 COM OS COMPOSTOS [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂] e [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂

Células foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células/placa p100 (TPP) com meio RPMI pH 6.9 (Cultilab) suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas, as células foram tratadas com os compostos de cobre e zinco em várias concentrações dependendo do ensaio realizado (25, 50, 75 e 100 μ M). O tempo de tratamento também dependeu do ensaio realizado, variando de 8, 16, 24 e 48 horas. Como controles, utilizaram-se os volumes correspondentes do veículo (10% DMSO).

3.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELOS COMPOSTOS [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂] e [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂

3.9.1 Citotoxicidade analisada por Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI)

As duas linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de 2×10^5 células/poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantidas por aproximadamente 4 horas. Após esse período, necessário para que ocorresse adesão celular, o meio dos poços foi trocado para RPMI 1640 suplementado com 0,1% de SFB. Durante este período com carência de soro, ocorre uma sincronização do ciclo celular. Após 24 horas, as células foram então tratadas com diferentes concentrações dos compostos (25, 50, 75, 100 μ M) e mantidas em cultura por mais 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, soltas com PBS-EDTA, coletadas e contadas em câmara de Neubauer. A

densidade celular foi ajustada para 10^6 células/condição. As células foram coletadas a 2000 g por 3 minutos e analisadas com o kit Annexin V-FITC (BD Pharmingen) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras analisadas possuíam um mesmo volume final e foram submetidas a contagem de necrose (positivas para iodeto de propídeo) e apoptose (positivas para anexina V) em um citômetro de fluxo (BD FacsCalibur) durante 1 minuto, sob fluxo constante. A contagem foi de 10.000 eventos. Os dados foram analisados no software CellQuest (BD FacsCalibur). Os tratamentos foram realizados em triplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes.

3.9.2 Citotoxicidade por MTT

Este ensaio foi realizado como já descrito (item 3.5.2), exceto pelo número de células semeadas. Aqui, foram plaqueadas 5×10^4 cel/poço.

3.10 DENSIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

[Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂] e [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂

Este ensaio foi realizado como já descrito (item 3.5.2), exceto pelo tratamento das linhagens celulares com 50 µM de cada composto por 24 horas.

3.11 ADESÃO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

[Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂] e [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂

Células TM1MNG3 e TM1G3 foram tratadas com os compostos [Cu(isaepy)₂](ClO₄)₂, [Zn(isaepy)Cl₂] e [Cu(enim)H₂O](ClO₄)₂ na concentração de 50 µM por 24 horas. Após este período, as células viáveis (avaliadas pelo método de exclusão de Tripán Blue) foram analisadas conforme descrito no item 3.6. O

composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ também foi analisado em 48 horas na concentração de 50 e 100 μM .

3.12 PROTEÍNAS CARBONILADAS

Extratos celulares de TM1MNG3 e de TM1G3 foram preparados como descrito em 3.2.1. Cinquenta μg de proteína total diluídos em 200 μL foram incubados com 1 mL de uma solução 10 mM DNPH (2,4-dinitrofenilidrazina, Alfa Aesear- Lancaster) dissolvida em 2 M HCl. A reação foi incubada em estufa a 37°C por uma hora e meia. Após esse tempo as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços preta (específica para fluorescência – Greiner) e a leitura foi realizada em 360 nm. As absorbâncias foram descontadas do valor das absorbâncias do branco (realizado na ausência de proteínas). Este ensaio foi realizado em triplicatas para cada experimento, em 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA com Tukey's post hoc test (GraphPad Prism software, San Diego, CA).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos experimentos realizados nesse trabalho foi realizada usando one-way ANOVA com Tukey's post hoc test (GraphPad Prism software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS CELULARES

Extratos das linhagens celulares TM1MNG3 e TM1G3 foram submetidos à SDS-PAGE para caracterização da expressão da proteína galectina-3. Após revelação pelo método de quimioluminescência foi observado que a linhagem TM1MNG3 não apresentou marcação positiva, enquanto que TM1G3 apresentou uma banda exatamente na altura de 30 kDa da proteína galectina-3 (Figura 5). Estes dados confirmam o silenciamento gênico da galectina-3 decorrente da progressão tumoral (OBA-SHINJO *et al.*, 2006), evidenciado pela ausência da proteína na linhagem transfectada com o vetor vazio, e também a expressão induzida pela transfecção com o vetor com o gene *LGALS-3*. As membranas reagidas com anti- β -actina demonstram que quantidades equivalentes dos dois extratos protéicos foram analisados (Figura 5).

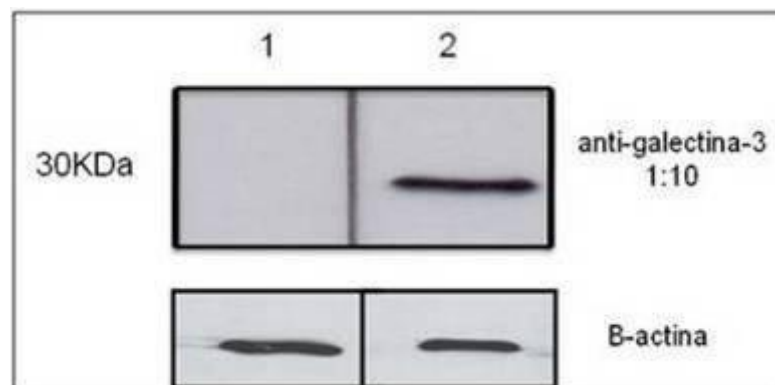


Figura 5: Caracterização das linhagens celulares. Extratos protéicos (40 μ g) das linhagens celulares TM1MNG3 (canaleta 1) e TM1G3 (canaleta 2) foram submetidos à SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Foi utilizado anticorpo anti-galectina-3 na diluição de 1:10. Empregou-se anticorpo secundário anti-Ig de rato – HRP na diluição 1:1000 e revelação por quimioluminescência. Reação com anticorpo anti- β -actina foi utilizada para demonstrar que foi colocada quantidade equivalente de extrato das duas linhagens celulares.

4.2 IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA OBSERVAÇÃO DA GALECTINA-3 NAS LINHAGENS CELULARES TM1MNG3 E TM1G3

A expressão e o padrão de expressão da galectina-3 foram analisados por imunofluorescência indireta nas duas linhagens celulares (Figura 6). Os resultados confirmaram que apenas a linhagem TM1G3 expressa galectina-3, e mostraram um padrão de expressão difuso no citossol celular. Não foi possível observar predominância em organelas.

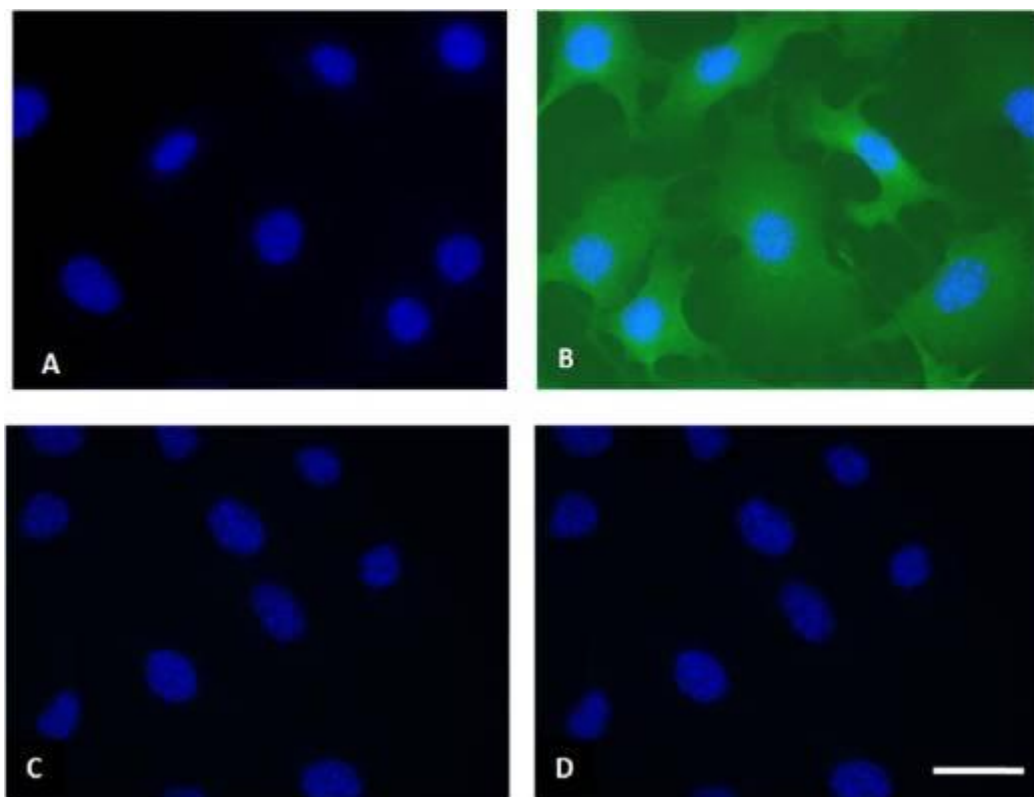


Figura 6: Expressão e localização subcelular da proteína galectina-3 por imunofluorescência. Células TM1G3 (painéis A e B) e TM1MNG3 (painéis C e D) foram incubadas com anticorpo anti-galectina-3 não diluído (B, D). Após sucessivas lavagens foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de rato FITC (1:800, Molecular Probes). Os núcleos das células foram marcados com DAPI. As imagens foram capturadas em microscopia de fluorescência (Zeiss Axophot) e posteriormente analisadas com o auxílio do software Adobe Photoshop. Aumento 60X. Barra = 50µm.

4.3 FRACIONAMENTO CELULAR PARA LOCALIZAÇÃO DA GALECTINA-3

Extratos celulares das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 foram submetidos a fracionamento celular através de centrifugações em velocidades diferentes para

separação de frações celulares. No caso da linhagem TM1G3 todas as frações isoladas apresentaram imunomarcação para galectina-3, sugerindo que a proteína está presente em todos os compartimentos celulares (Figura 7). A linhagem TM1MNG3, como esperado, não apresentou marcação em nenhuma das frações (Figura 7). A coloração das proteínas na membrana com Ponceau evidencia quantidades equivalentes de proteínas em cada fração aplicadas no gel. Esse resultado corrobora os dados obtidos por imunofluorescência, em que a galectina-3 está presente em todos os compartimentos celulares. Embora não tenha sido realizado um monitoramento para avaliar possíveis contaminações entre as frações, a centrifugação diferencial propicia o enriquecimento de proteínas de determinadas organelas, o que permite avaliar a presença da galectina-3 nas frações enriquecidas.

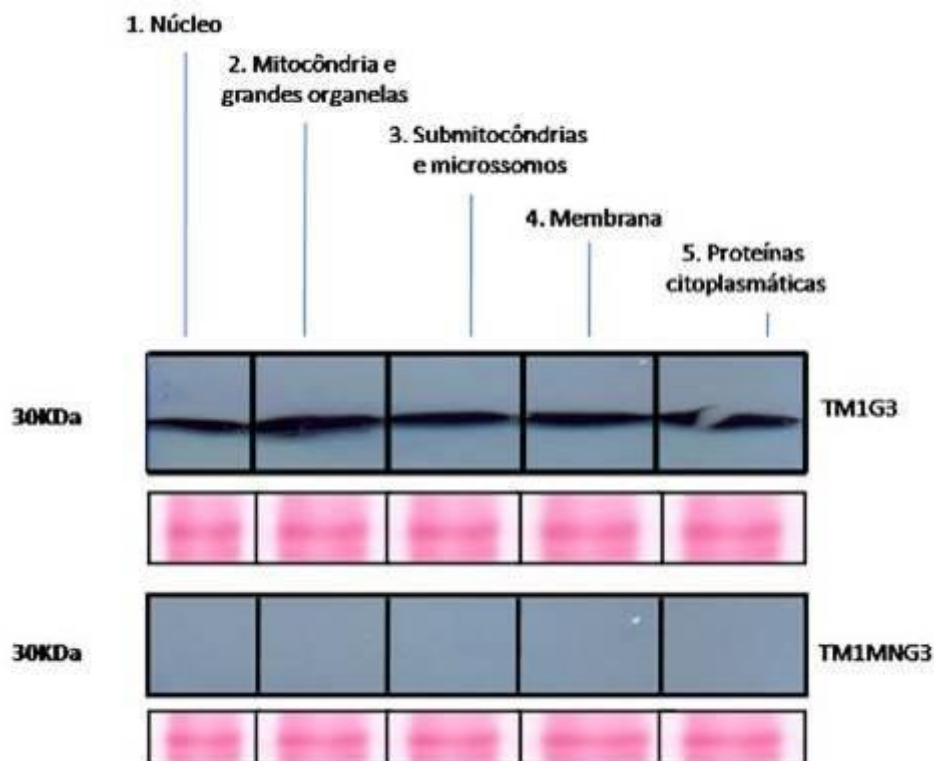


Figura 7: Localizações subcelulares da proteína galectina-3. Extratos de células TM1G3 e TM1MNG3 foram submetidos a fracionamento celular para a separação de diferentes frações. As frações foram submetidas à SDS-PAGE 15%, transferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por imunoblotting com anticorpo anti-galectina-3 na diluição de 1:10. Empregou-se anticorpo secundário anti-Ig de rato – HRP na diluição 1:1000 e revelação por quimioluminescência. Os painéis de baixo mostram a região de 30kDa na membrana de nitrocelulose corada com vermelho de Ponceau pra demonstrar quantidade equivalente de proteína total em todas as frações.

4.4 ENSAIOS DE DENSIDADE CELULAR

A análise da proliferação celular em células TM1MNG3 e TM1G3 foi realizada por dois diferentes métodos: metabolização do MTT e coloração por cristal violeta. O MTT é um composto amarelo solúvel que é metabolizado na mitocôndria, obtendo-se como produto final um composto púrpura insolúvel, que precipita dentro da mitocôndria. Assim, após a leitura da absorbância dos poços, foi feita uma correlação direta entre absorbância e densidade celular. Com esse experimento, nossos resultados demonstram que as células com galectina-3 proliferam menos que as células sem galectina-3 (Figura 8a). Estes dados foram confirmados pelo ensaio com coloração cristal violeta. O princípio de análise do método é o mesmo que do MTT: quanto mais células, maior coloração e conseqüentemente, maior a absorbância. Por este método, também observamos que as células com galectina-3 também apresentavam um menor crescimento celular em relação às células sem galectina-3 após 24 horas em cultura (Figura 8b).

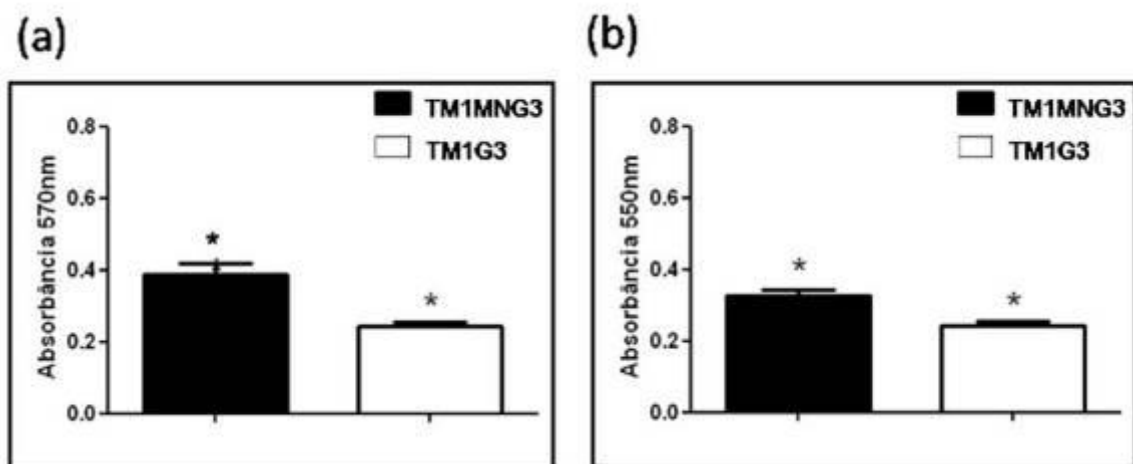


Figura 8: Densidade celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3. (a) As linhagens celulares foram submetidas a ensaio de MTT. Esse é um método no qual redutases mitocondriais reduzem o anel tetrazólio de MTT a cristais roxos de formazan na mitocôndria da célula viva. A solubilização dos cristais gera uma solução colorida que pode ser quantificada por absorbância. O aumento da intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de células vivas. A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 570 nm, descontada dos valores de absorbância em 655 nm. *, indica $p < 0,01$. (b) As linhagens celulares foram submetidas a ensaio de proliferação por cristal violeta. Após 24 horas, as células foram coradas com cristal violeta e a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm. *, indica $p < 0,01$.

4.5 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

A proteína galectina-3 está envolvida em diversos processos celulares, entre eles adesão celular e apoptose (LIU *et al.*, 2002). Por isso, a capacidade de aderir em proteínas de matriz extracelular foi avaliada nessas linhagens celulares. Células TM1MNG3 e TM1G3 foram cultivadas em placas de 96 poços pré-tratadas com 15µg/ml de diversas proteínas de matriz. Quando comparadas com a adesão sobre BSA, observa-se uma maior adesão na linhagem sem galectina (figura 9), demonstrando que possivelmente a proteína galectina-3 interfira na adesão celular sobre as moléculas de matriz avaliadas.

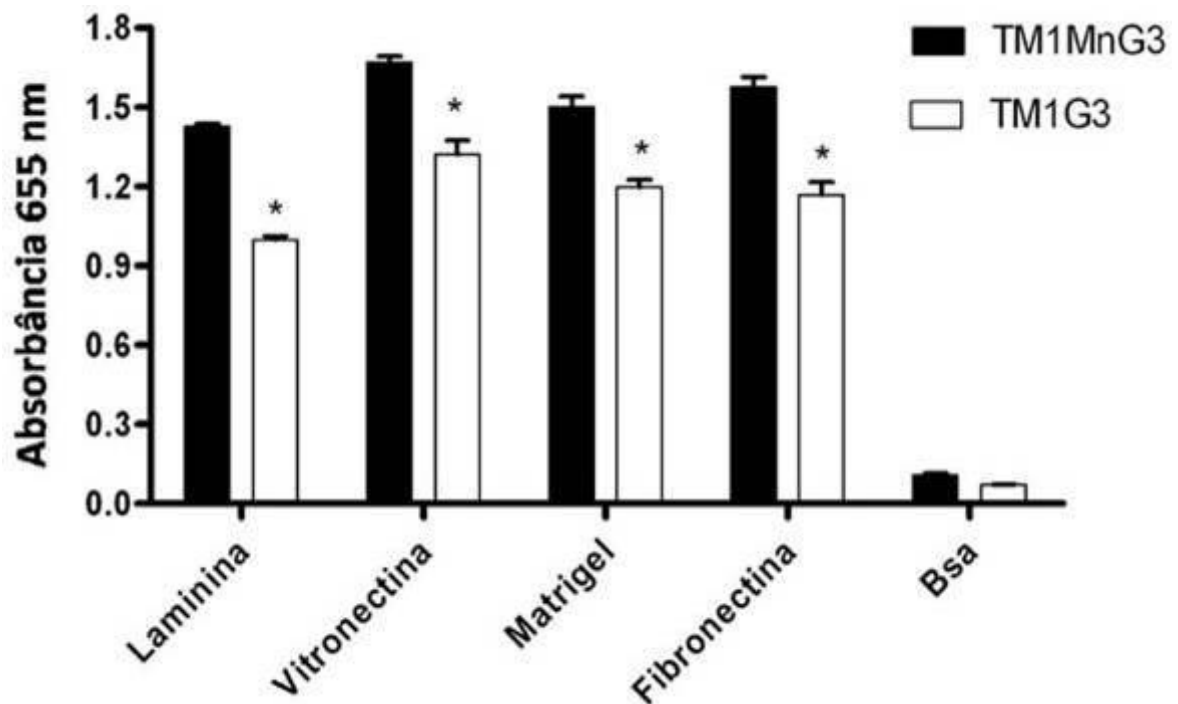


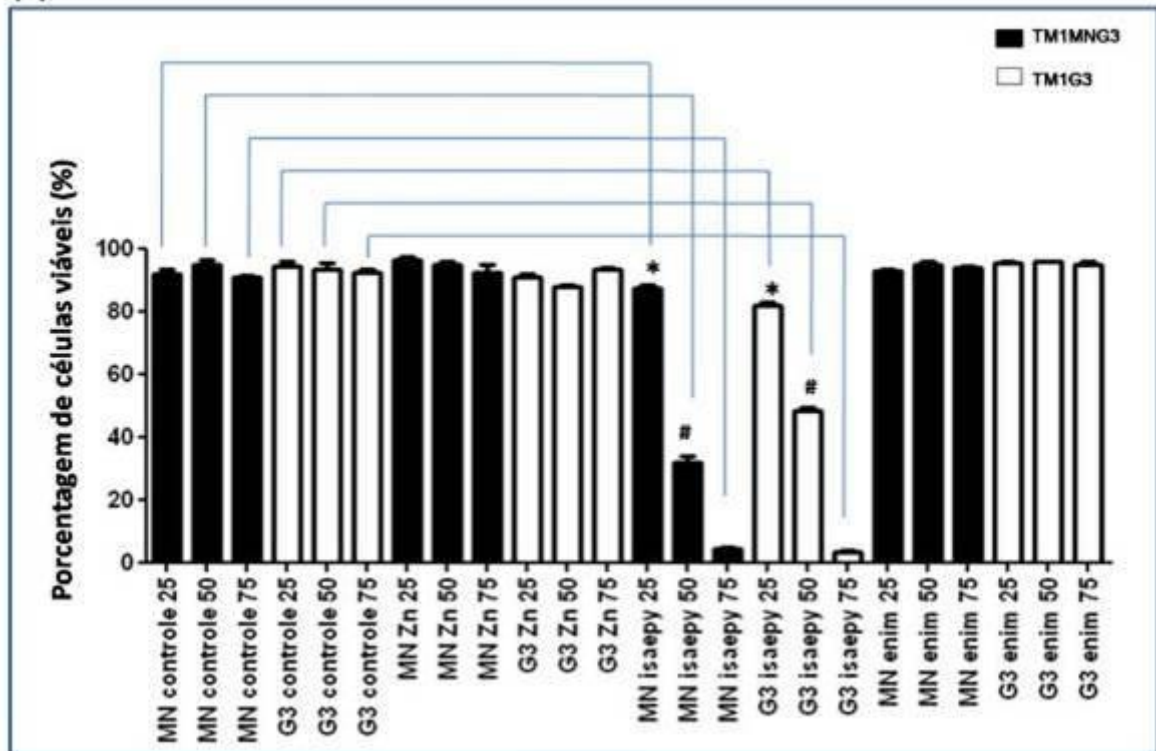
Figura 9: Adesão das células TM1MNG3 e TM1G3 sobre proteínas de matriz extracelular. As células foram plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (laminina, vitronectina, marigel e fibronectina) e BSA. Em seguida foi realizada a fixação e a coloração para quantificação colorimétrica. Esse ensaio foi realizado com diferentes clones e todos reproduziram esse padrão. * indicam $p < 0,01$ em relação as células sem galectina.

4.6 CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELOS COMPOSTOS $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$

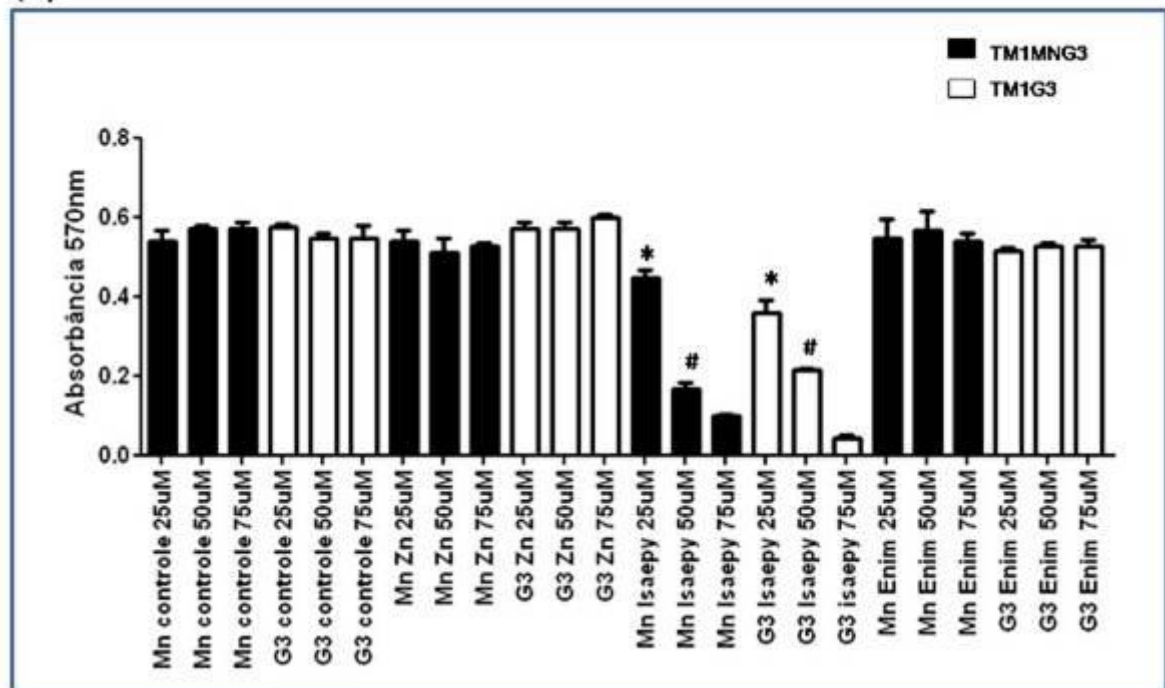
Foi feita a análise da citotoxicidade induzida pelos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por citometria de fluxo e MTT.

Os ensaios de citotoxicidade permitem a determinação da citotoxicidade basal, assim como o estabelecimento de uma faixa de concentração biologicamente ativa para um determinado composto. Dessa maneira os ensaios foram realizados para que pudéssemos saber quais as concentrações dos compostos eram mais efetivas. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 horas. O resultado demonstra que apenas o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ causou morte celular na faixa de concentração empregada, sendo que com 50 μM a porcentagem de morte foi de aproximadamente 50% tanto pela citometria de fluxo (figura 10a) como pelo método de MTT (Figura 10b). Os outros compostos não alteraram a viabilidade celular das linhagens de melanoma quando comparado ao controle (veículo), em nenhuma concentração testada. Dessa maneira resolvemos analisar o papel da galectina-3 na citotoxicidade induzida pelo composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, já que esse apresentou alteração da viabilidade celular. Para avaliar esse papel fizemos análise estatística usando teste t nas linhagens celulares sem considerar a concentração utilizada desse composto. E obtivemos como resultado que a galectina-3 interfere na citotoxicidade (figura 10c) diminuindo a viabilidade das células expostas ao complexo metálico.

(a)



(b)



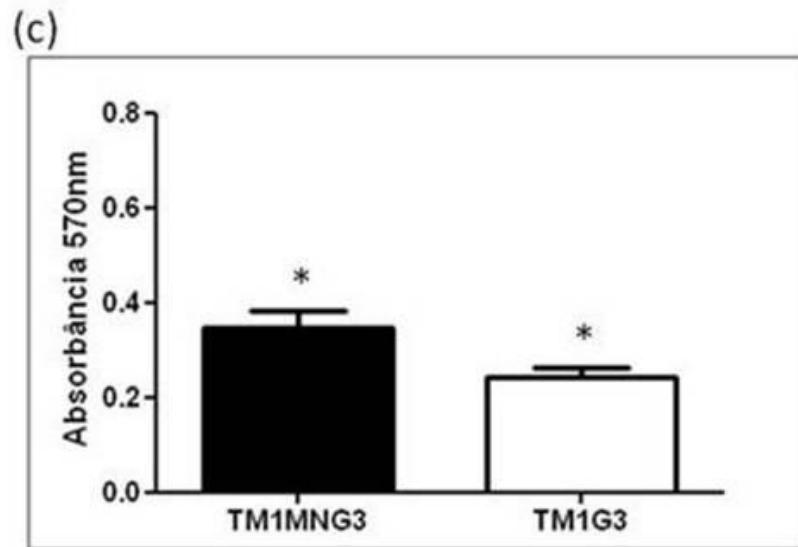


Figura 10: Avaliação da citotoxicidade (células viáveis), induzida pelos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ em células de melanoma TM1G3 e TM1MNG3 após 24 horas de tratamento. (a) As células foram tratadas por 24 horas com compostos de cobre e zinco em três concentrações diferentes 25 μM , 50 μM e 75 μM . Após o tratamento as células foram submetidas ao Kit Anexina V-FITC (BD Biosciences), e analisadas por citometria de fluxo. O gráfico demonstra a viabilidade das células de acordo com a concentração utilizada dos compostos, as barras e os * e # indicam $p < 0,01$. (b) método MTT, o gráfico demonstra a viabilidade das células de acordo com a concentração utilizada dos compostos. Os * indicam $p < 0,01$ em relação as células com e sem a galectina-3. (c) gráfico de avaliação do papel da galectina-3 através de análise estatística (teste t comparação entre colunas) sem levar em conta a concentração utilizada do composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, os * indicam $p < 0,01$.

4.7 DENSIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$

A proliferação das células tratadas com os compostos na concentração de 50 μM por 24 horas foi avaliada. A galectina-3, como demonstrado na figura 6, inibe a proliferação nas células não tratadas, tratadas com o veículo ou com o composto de Zn (Figura 11). Nas células expostas a ambos os compostos de Cu, a presença da galectina-3 também inibiu o crescimento celular. Esta inibição pode estar refletindo morte celular, ou perda da viabilidade celular, após exposição ao $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, já que este composto induz morte, e principalmente nas células que expressam galectina-3. No caso do $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, o resultado mostra que este composto não teve efeito sobre a proliferação celular, seja nas células

TM1MNG3 ou TM1G3, de acordo com os dados de citotoxicidade nestas condições experimentais (figura 10).

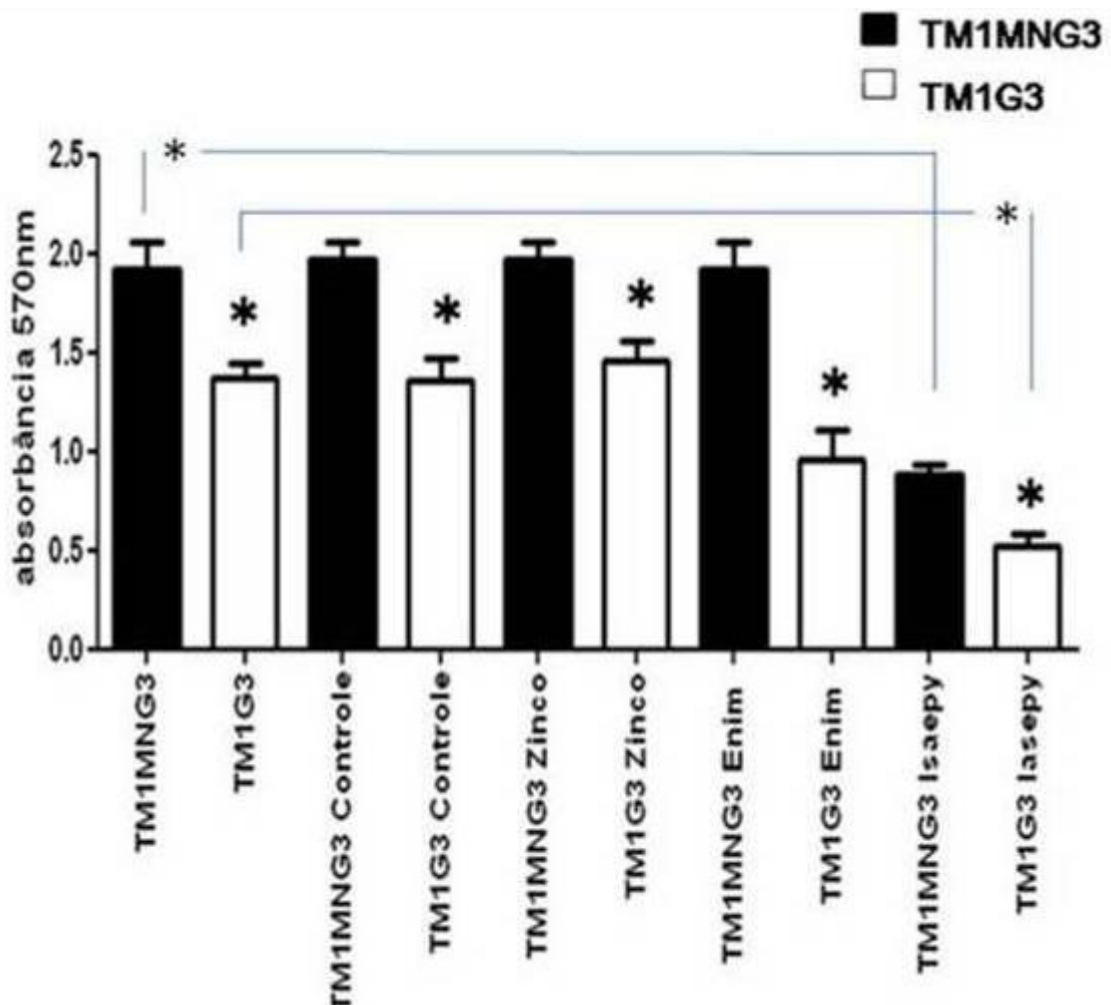


Figura 11: Densidade celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 após tratamento de 24 horas com 50 μM dos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. O método utilizado foi MTT. * indicam $p < 0,01$.

4.8 ADESÃO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS

$[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$

Após o estudo do comportamento adesivo das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 sem tratamento (figura 9), este foi avaliado após o tratamento com os compostos de cobre e zinco. As linhagens foram tratadas por 24 horas com 50 μM dos compostos de zinco e cobre. Primeiramente foi feito o ensaio com o composto de zinco (figura 12) que foi escolhido como um controle o centro metálico, pois o zinco é um metal

redox inativo. Pode-se observar que não existe diferença no tratamento com relação à galectina-3. A presença ou a ausência da proteína não interfere na ação desse composto. Interessantemente, as células tratadas apenas com o veículo apresentaram um padrão de adesão oposto ao apresentado pelas células sem nenhum tratamento (Figura 9). Aqui, verificou-se que a presença da galectina-3 contribuiu positivamente para a adesão celular sobre laminina, vitronectina e matrigel (Figura 12).

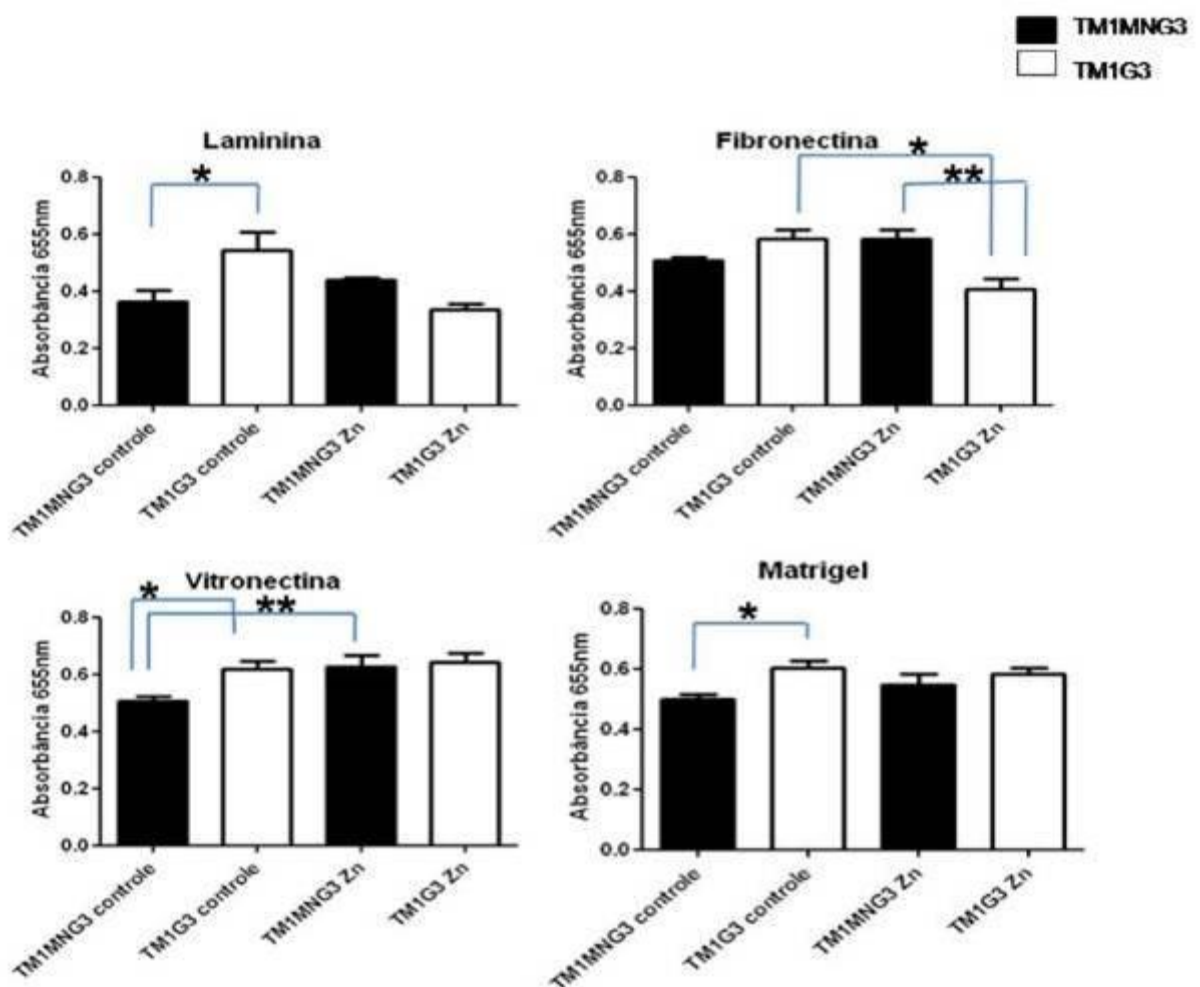


Figura 12: Análise de adesão celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com 50 μ M do composto de zinco ([Zn(isaepy)Cl₂]) por 24 horas, frente a proteínas de matriz. As células das linhagens de melanoma foram previamente tratadas com composto de Zinco por 24 horas e plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (Laminina, Vitronectina, Marigel e Fibronectina). Em seguida foi realizada fixação e a coloração para observação colorimétrica. * indica $p < 0,01$.

O composto de cobre $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ alterou a adesão celular das linhagens de melanoma, particularmente da linhagem TM1G3 (figura 13). Este composto inibiu a adesão destas células sobre todas as proteínas de matriz usadas. A inibição foi mais acentuada sobre matrigel. No caso da TM1MNG3, $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ inibiu apenas a adesão sobre matrigel. Estes dados mostram que o composto de Cu induz um comportamento anti-adesivo sobre as linhagens de melanoma, principalmente sobre as células que expressam galectina-3, indicando que a galectina-3 interfere, direta ou indiretamente na adesão após tal tratamento. De um modo geral, a inibição da adesão celular parece refletir a citotoxicidade induzida pelo composto. As células que expressam galectina-3 são mais susceptíveis a morte pelo composto de cobre (Figura 10), concordando com a maior inibição de adesão dessas células sobre as proteínas de matriz extracelular. Portanto a presença da galectina-3 pode estar potencializando os efeitos celulares induzidos pelo $\text{Cu}(\text{isaepy})$ ou estar contribuindo diretamente para a perda de adesão estimulada pelo composto.

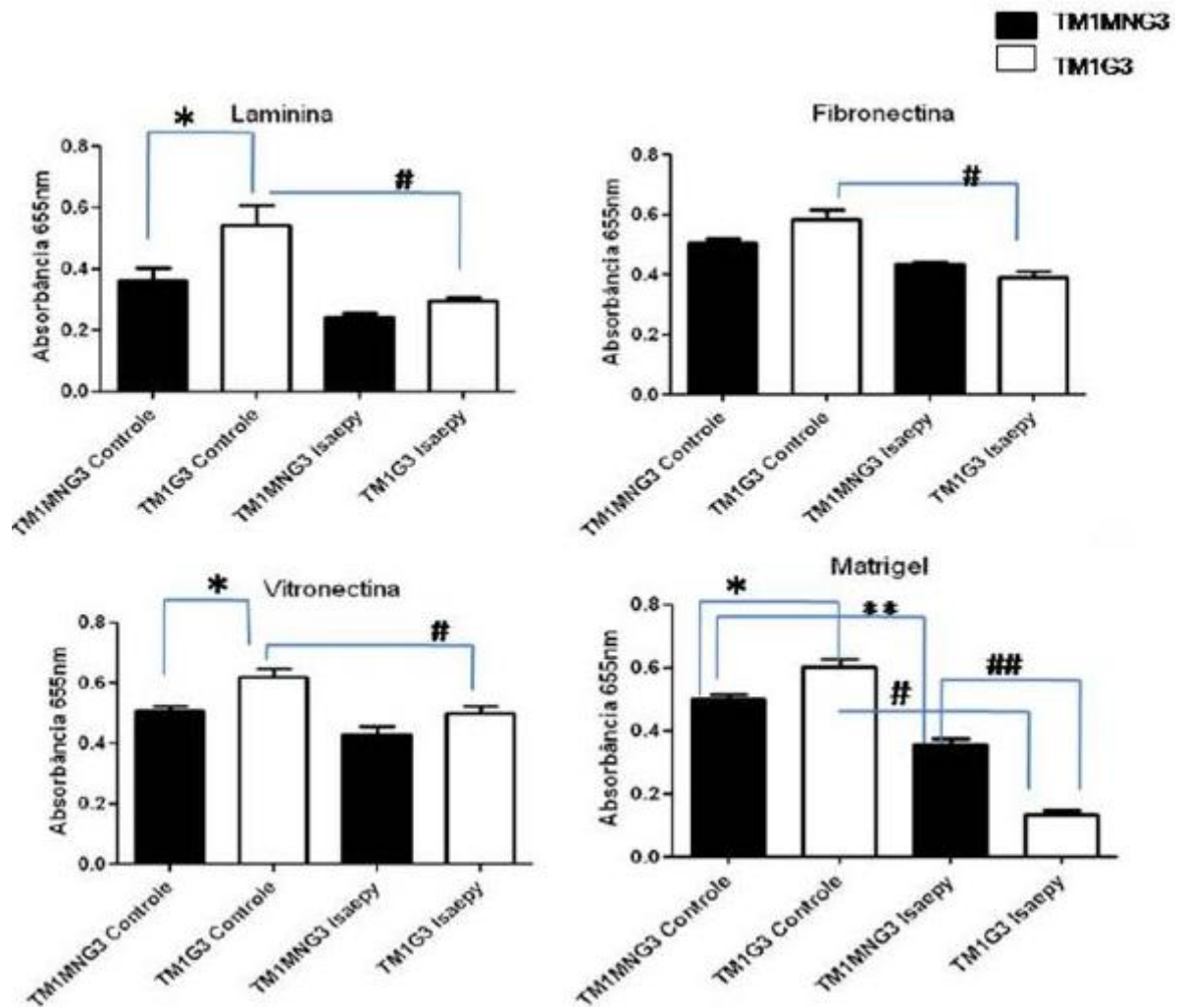


Figura 13: Análise de adesão celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com 50 μM do composto de cobre ($[\text{Cu}(\text{isaepy})_2(\text{ClO}_4)_2$) por 24 horas, frente a proteínas de matriz. As células das linhagens de melanoma foram previamente tratadas com composto de cobre $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2(\text{ClO}_4)_2$ e plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (Laminina, Vitronectina, Marigel e Fibronectina). Em seguida foi realizada a fixação e a coloração para observação colorimétrica. * e # indicam $p < 0,01$.

O composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$, entretanto, não induziu alterações no processo de adesão das 2 linhagens (figura 14). As alterações observadas com esse composto são exatamente iguais às alterações observadas com o composto de zinco (figura 12). Portanto, nestas condições experimentais, $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ não está alterando a adesão, pois o resultado é exatamente igual ao composto que é redox inativo. Além disso, o resultado não demonstra diferenças entre as células TM1G3 e TM1MNG3.

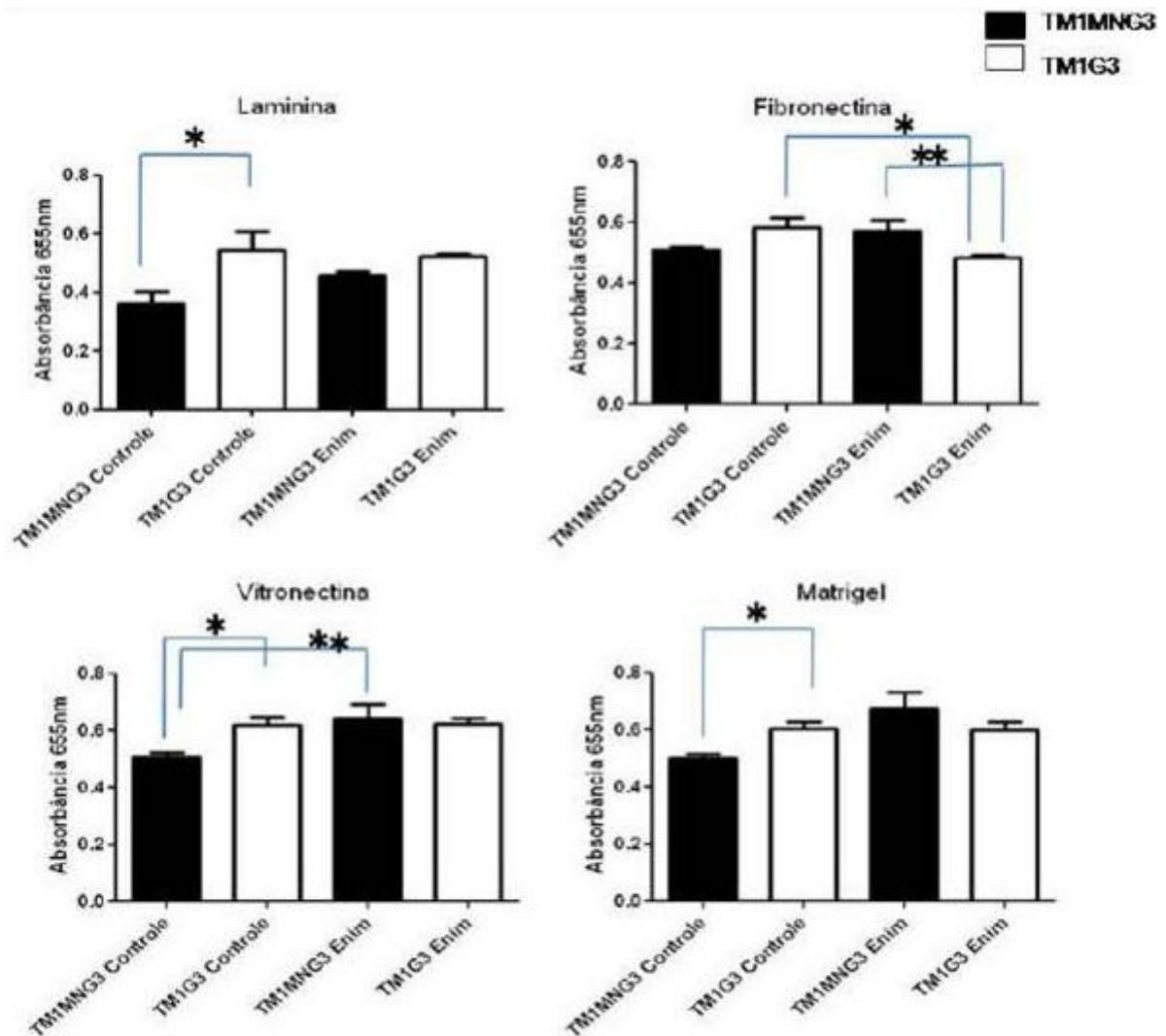


Figura 14: Análise de adesão celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com 50 μM do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 24 horas, frente a proteínas de matriz. As células das linhagens de melanoma foram previamente tratadas com composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 24 horas e plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (Laminina, Vitronectina, Marigel e Fibronectina). Em seguida foi realizada a fixação e a coloração para observação colorimétrica. * indica $p < 0,01$.

O composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ foi recentemente descrito por ter induzido quebras no DNA após 48 horas e com uma concentração de 100 μM (da SILVEIRA *et al.*, 2007). Portanto, resolvemos reavaliar a adesão celular, utilizando as concentrações de 50 e 100 μM $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas. Neste ensaio, a adesão sobre fibronectina apresentou-se muito próxima à adesão sobre BSA, sugerindo que a fibronectina estivesse degradada. Assim, os dados referentes a adesão sobre fibronectina foram excluídos. Os demais resultados obtidos

demonstram que 50 μM $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ estimula uma maior adesão das células TM1MNG3, mas inibe a adesão das células TM1G3 após 48 horas de tratamento (figura 15). Este padrão de adesão se assemelha com o padrão observado para ambas as linhagens expostas a 50 μM por 24 horas.

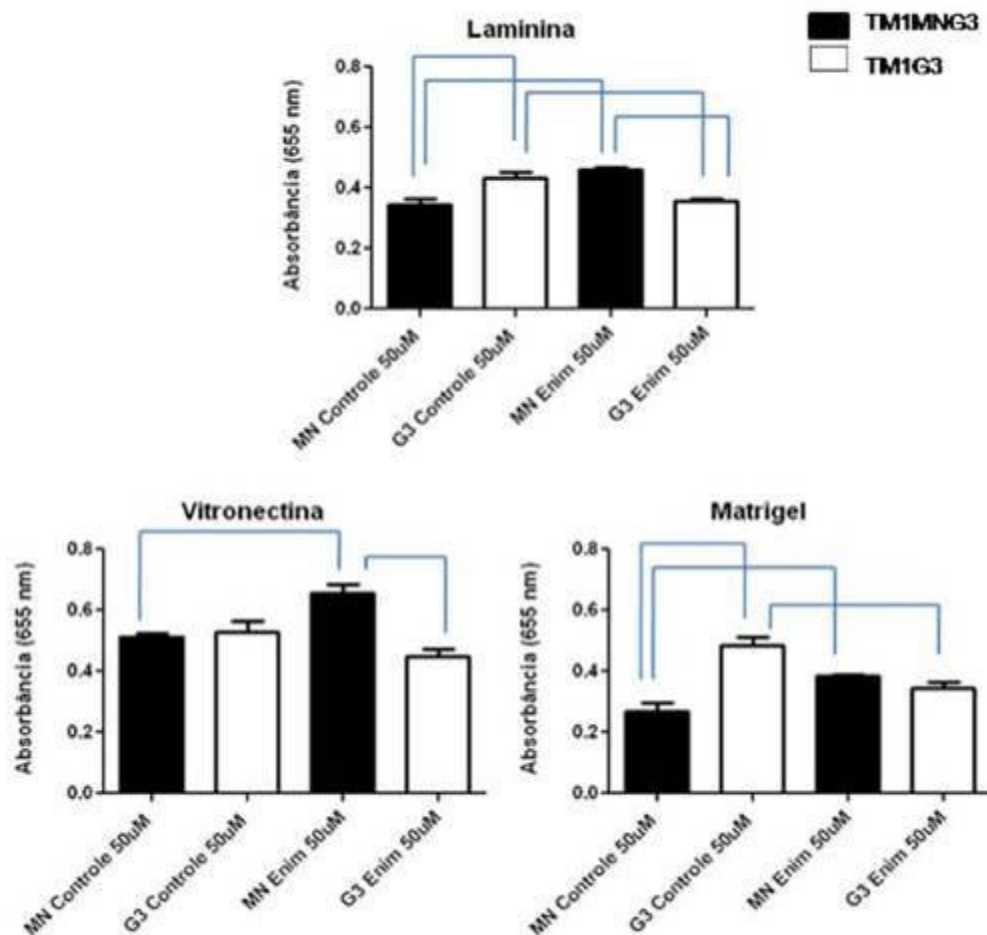


Figura 15: Análise de adesão celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com 50 μM do composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas, frente a proteínas de matriz. As células das linhagens de melanoma foram previamente tratadas com composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas e plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (Laminina, Vitronectina e Marigel). Em seguida foi realizado a fixação e a coloração para observação colorimétrica. As barras indicam $p < 0,01$.

Contudo, 100 μM do composto induz um aumento de adesão em ambas as linhagens sobre todas as proteínas de matriz estudadas (figura 16). Os resultados ainda apontam que as células TM1G3 aderem mais que as TM1MNG3, indicando

neste caso, um papel pró-adesivo da galectina-3, particularmente após o tratamento com $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$.

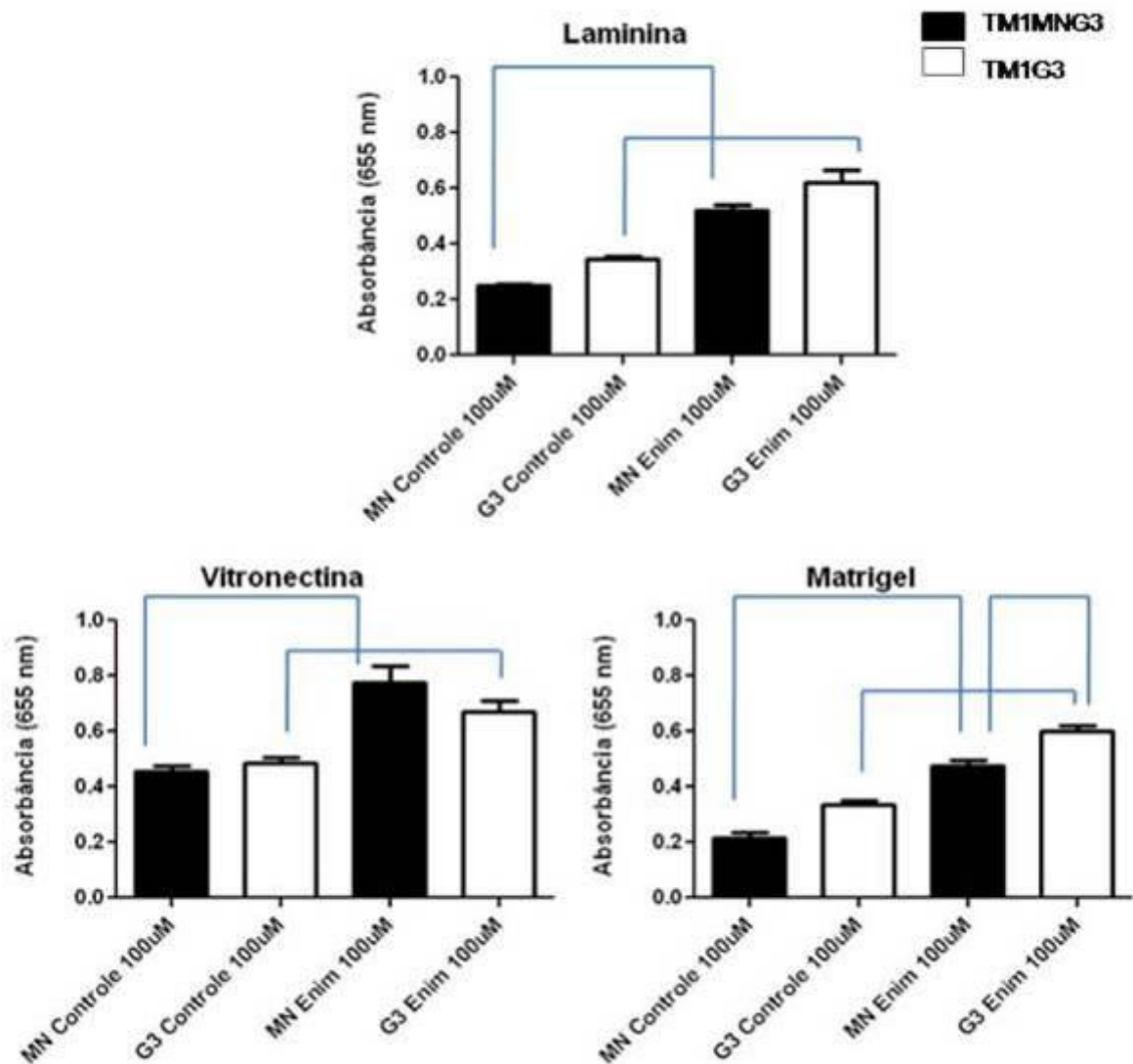


Figura 16: Análise de adesão celular das linhagens TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com 100 μM do composto de cobre ($[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$) por 48 horas, frente a proteínas de matriz. As células das linhagens de melanoma foram previamente tratadas com composto de cobre $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas e plaqueadas em poços pré-tratados com proteínas de matriz (Laminina, Vitronectina e Marigel). Em seguida foi realizada a fixação e a coloração para observação colorimétrica. As barras indicam $p < 0,01$.

Para avaliar se o aumento na adesão estimulado pelo composto metálico estaria relacionado a um aumento de sobrevivência celular, de modo análogo à relação entre inibição de adesão e perda de viabilidade celular observada para $\text{Cu}(\text{isaepy})_2$ (figura 10), analisamos a citotoxicidade do $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ após

48 horas de tratamento (figura 17). Os resultados obtidos mostram que o composto é citotóxico após 48 horas de exposição e de forma dependente da concentração para ambas as linhagens. E também, sugerem que as células com a proteína galectina-3 são mais resistentes a morte induzida pelo composto analisado do que as TM1MNG3, de acordo com os dados de adesão celular dessas linhagens. Portanto, $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ estimula o processo adesivo, principalmente nas células que expressam galectina-3. Estes dados demonstram que o comportamento das células que expressam galectina-3 varia de acordo com o ligante do cobre. Após exposição ao $\text{Cu}(\text{enim})$, a galectina-3 exerce um papel protetor sobre as células.

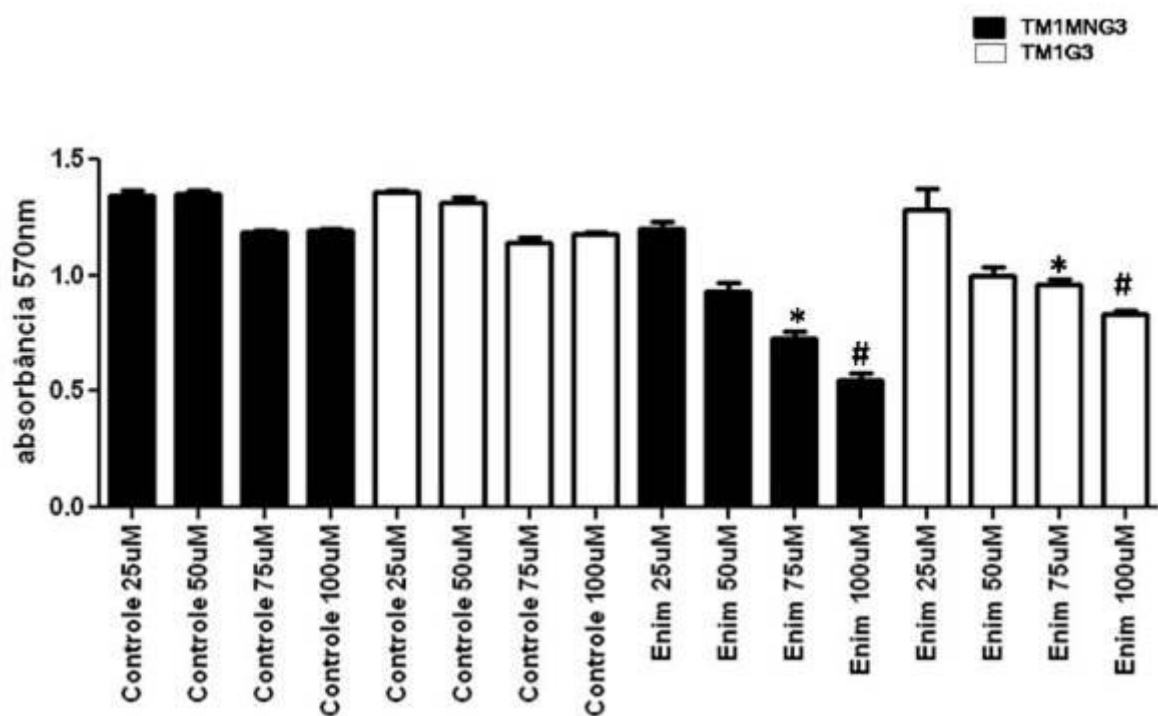


Figura 17: Avaliação por MTT da citotoxicidade induzida pelo composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ em células de melanoma TM1G3 e TM1MNG3 após 48 horas de tratamento. O gráfico demonstra a viabilidade das células tratadas por 48 horas com diferentes concentrações do composto. * e #, indicam $p < 0,01$ em relação a presença ou ausência da galectina-3.

Os dados globais de adesão celular mostram que a presença da galectina-3 modula o comportamento das duas linhagens celulares, tanto na ausência como na presença dos compostos metálicos, e de forma tanto positiva como negativa. Para

avaliar se o tratamento com os compostos poderia estar alterando a expressão da galectina-3, um Western blotting foi realizado com extratos totais de células tratadas com os compostos (figura 18). O resultado mostra que não existe diferença na expressão da galectina-3 conforme os tratamentos com os compostos de cobre e zinco. Portanto, os tratamentos realizados não alteraram a expressão da galectina nas células TM1MNG3 e TM1G3.

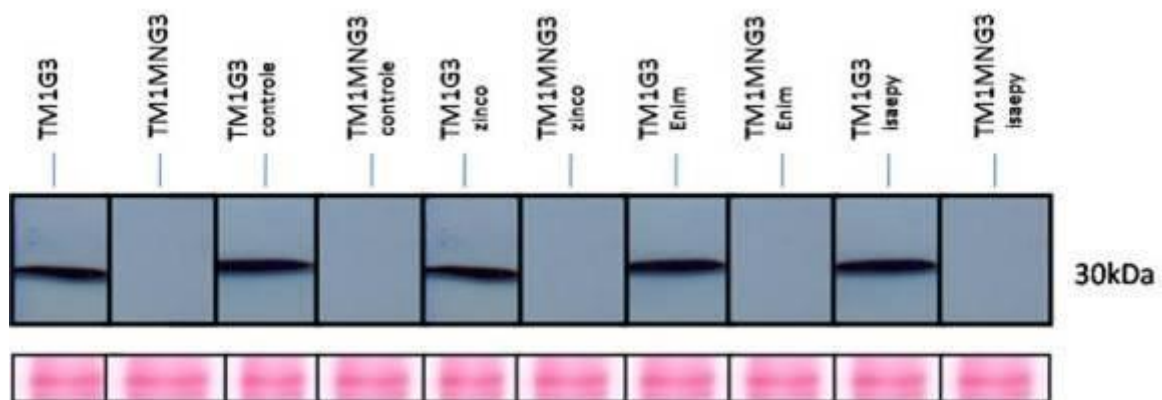


Figura 18: expressão da galectina-3 nas linhagens celulares TM1MNG3 e TM1G3 após tratamento com os compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. Extratos das linhagens celulares TM1MNG3 e TM1G3 tratadas com $50 \mu\text{M}$ dos compostos por 24 horas, foram submetidos à SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Foi utilizado anticorpo anti-galectina-3 na diluição de 1:10. Empregou-se anticorpo secundário anti Ig de rato – HRP na diluição 1:1000 e revelação por quimioluminescência. O painel de baixo mostra a região de 30 kDa na membrana de nitrocelulose corada com vermelho de Ponceau.

4.9 PROTEÍNAS CARBONILADAS

Observando as alterações causadas pelos compostos em relação à citotoxicidade e adesão celular, resolvemos investigar se também estavam causando estresse oxidativo nas linhagens celulares após os tratamentos.

Uma grande variedade de métodos para medida de estado de estresse oxidativo tem sido proposta na literatura. A determinação da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou radicais livres é bastante problemática, devido às baixas meia-vidas destas espécies e a suas baixas concentrações, dificultando medidas diretas. Em função disto, a maior parte das metodologias depende da quantificação

dos produtos das reações de oxidação como, por exemplo, as proteínas carboniladas. Aqui, usamos os danos oxidativos a proteínas como um índice de estresse oxidativo. O conteúdo de grupos carbonila foi determinado fotometricamente em 360 nm, após reação com DNPH. O resultado demonstra que células tratadas com os dois compostos de cobre apresentam mais oxidação protéica do que as células tratadas com o composto de zinco ou o controle (figura 19). Além disso, o resultado mostra que apenas as células com galectina-3 sofrem estresse carbonílico.

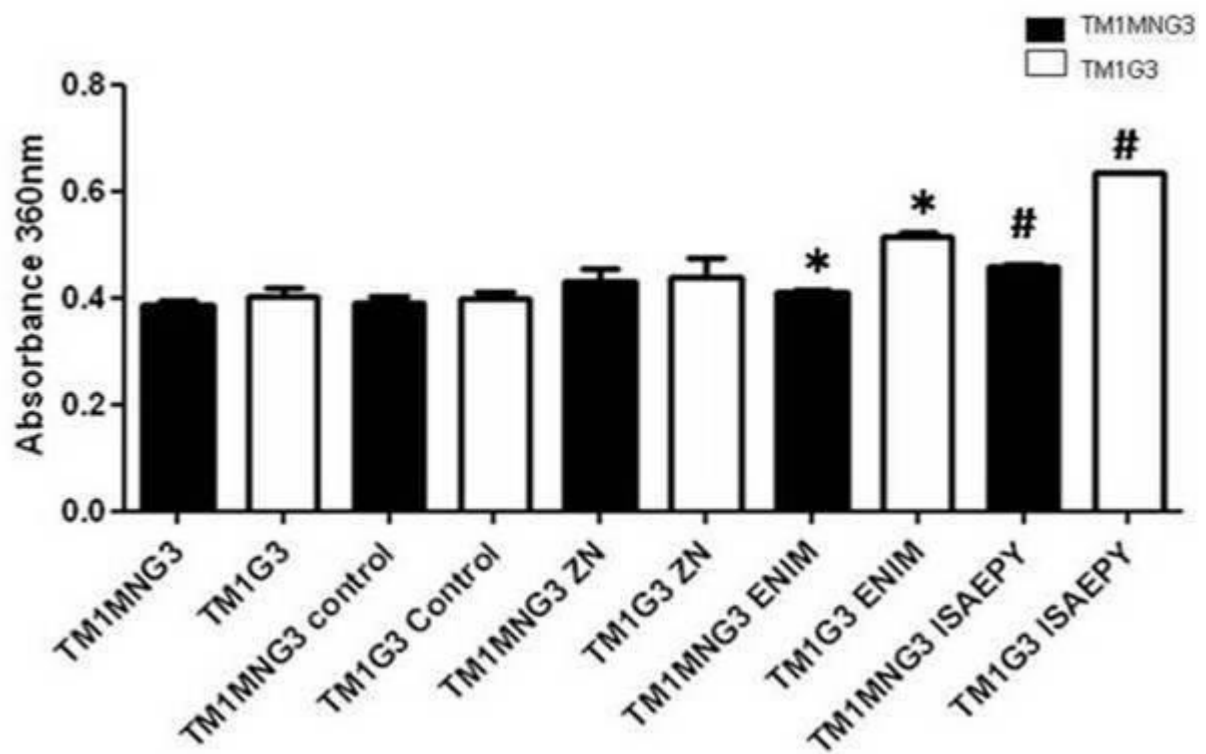


Figura 19: Níveis relativos de proteínas carboniladas em células tratadas por 24 horas com 50 μM dos compostos $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. As células foram tratadas previamente com os compostos de cobre e zinco e depois reagidas com dinitrofenilhidrazina para observação do grupamento carbonil. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente em 360 nm. # e * indicam $p < 0,01$.

Além disso, resolvemos testar as linhagens celulares com 100 μM do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas de tratamento, já que nos ensaios de adesão houve uma mudança de perfil quanto aumentamos o tempo de tratamento e

a concentração desse composto (figura 16). No caso das proteínas carboniladas as células tratadas com o Cu(enim) não apresentou alteração em relação ao controle (figura 20). Isso sugere que esse tempo é longo demais para observarmos estresse oxidativo. Possivelmente esse tempo longo faz com que ocorra degradação dos produtos de oxidação e dessa maneira não é possível detectar pelo ensaio de proteínas carboniladas.

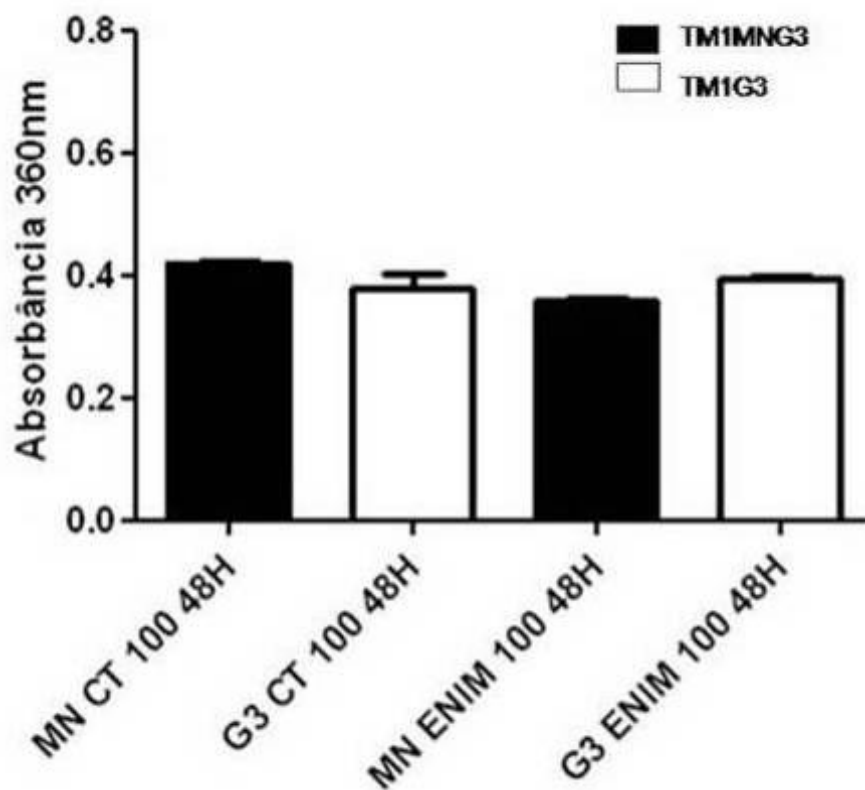


Figura 20: Níveis relativos de proteínas carboniladas em células tratadas por 48 horas com 100 μM do composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$. As células foram tratadas previamente com o composto de cobre e depois reagidas com dinitrofenilhidrazina para observação do grupamento carbonil. O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 360 nm.

5 DISCUSSÃO

Galectina-3 é uma proteína que cada vez mais está relacionada com eventos da progressão tumoral. Entre os eventos está o envolvimento na proliferação, angiogênese, migração celular e metástase (DANGUY *et al.*, 2002). É difícil estabelecer uma correlação entre padrão de expressão e função de galectina-3 e o processo de transformação e/ou progressão tumoral. De um modo geral, a presença aumentada de galectina-3 tem sido associada a tumores sólidos (XU *et al.*, 1995; ENDO *et al.*, 2005).

No caso de melanomas, tem sido evidenciada uma associação entre expressão aumentada desta proteína com a evolução da doença (PRIETO *et al.*, 2006). Em nossas células modelo, entretanto, a expressão da galectina-3 foi perdida ao longo da transformação tumoral (OBA-SHINJO *et al.*, 2006). Para a investigação do papel exclusivo desta proteína nestas células de melanoma, o grupo do Prof. Roger Chammas produziu clones que expressam constitutivamente a galectina-3 e clones controles (transfectados com vetor vazio), os quais foram nosso modelo celular de melanoma. Este é um tipo de câncer bastante refratário a tratamento (MOUAWAD *et al.*, 2009) e apresenta um prognóstico ainda muito ruim, em que apenas 5% dos pacientes apresentam sobrevida maior que 5 anos (JEMAL *et al.*, 2008). Assim, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas ou drogas. Entre os quimioterápicos, os complexos metálicos têm recebido especial atenção como agentes antitumorais (da SILVEIRA *et al.*, 2008). De fato, drogas clássicas usadas em tratamentos contra câncer são metalodrogas, como a cisplatina, carboplatina (LOTZE *et al.*, 2001). Mais recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que compostos de cobre complexados com diferentes ligantes têm produzido efeitos antitumorais promissores

em células em cultura (FILOMENI *et al*, 2007). Nesse contexto, exploramos o papel da galectina-3 em células de melanoma tratadas com os compostos Cu(isaepy)₂, Zn(isaepy) e Cu(enim).

Inicialmente, caracterizamos as linhagens celulares empregadas neste estudo, TM1MNG3 e TM1G3. Nossos resultados mostraram que a presença da galectina-3 afeta os processos celulares analisados. A taxa de proliferação celular, determinada pela densidade de células viáveis após 24 horas do plaqueamento, foi significativamente menor nas células com galectina-3 (Figura 8). O envolvimento da galectina-3 em proliferação já foi extensivamente estudado em diversos modelos celulares. Em 1998, Inohara e colaboradores mostraram pela primeira vez que galectina-3 estimula a proliferação de fibroblastos humanos através do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (INOHARA *et.al.*, 1998). Em linfócitos T estimulados com fatores de crescimento específicos ocorre um aumento na expressão de galectina-3, e a inibição da expressão dessa lectina por oligonucleotídeos *antisense* torna essas células menos responsivas aos estímulos mitogênicos (JOO *et al.*, 2001), indicando que galectina-3 atue como um modulador positivo do processo de proliferação celular. Essa ação proliferativa de galectina-3 também foi observada em células epiteliais humanas de mama (LIN *et al.*, 2002) e em células hepáticas esteladas de ratos (MAEDA *et al.*, 2003). Em células transformadas, galectina-3 pode atuar como indutora ou inibidora do processo de proliferação. Células de tumor de mama humano MDA-MB435 transfectadas com cDNA *antisense* para o RNAm de galectina-3 proliferam menos, corroborando o efeito positivo da galectina-3 endógena no crescimento dessas células (VAN DEN BRULE *et al.*, 1997). Em células tumorais pituitárias, o silenciamento do gene da galectina-3 foi responsável pela inibição na taxa proliferativa dessas células (RISS *et*

al., 2003). O efeito proliferativo da galectina-3 também foi descrito em outras células tumorais como em linhagens de próstata (ELLERHORST *et al.*, 2002), de mama (WARFIELD *et al.*, 1997; MATARESE *et al.*, 2000; HONJO *et al.*, 2001; LAHM *et al.*, 2001) e tiróide (YOSHII *et al.*, 2001; PARON *et al.*, 2003; TAKENAKA *et al.*, 2003). Nossos dados, em contraste com os acima apresentados, demonstram que a expressão da galectina-3 inibe a proliferação celular em células de melanoma murino. Este efeito pode ser tanto devido a um aumento no tempo de duplicação celular (possivelmente porque células transfectadas com o vetor que codifica o gene GAL3 cresce mais lentamente devido à síntese protéica aumentada) ou devido a um aumento na taxa de morte celular. Os nossos experimentos não permitiram distinguir estas hipóteses.

A adesão celular às proteínas de matriz extracelular também foi afetada pela galectina-3. Neste caso, galectina-3 parece estar inibindo a adesão sobre matrigel, laminina e vitronectina, na ordem de 15-30% em relação às células TM1MNG3. O papel da galectina-3 no processo adesivo é bem diversificado e depende da localização da galectina-3 e da célula usada. Galectina-3 exógena inibe a adesão de células tumorais a proteínas de matriz extracelular (HUGHES, 2001).

Há trabalhos que relatam a participação de galectina-3 nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Por exemplo, essa proteína promove a adesão de neutrófilos a laminina (KUWABARA & LIU, 1996). Em nosso modelo de estudo, a galectina-3 é expressa em todos os compartimentos celulares (Figura 7). Entretanto, a presença da galectina-3 no meio extracelular não foi confirmada, pois não conseguimos detectar nos meios condicionados de nossas culturas a presença da proteína por *immunoblotting*.

A galectina-3 tem sido considerada pró-apoptótica principalmente quando presente no meio extracelular (FUKUMORI *et al.*, 2003). Por exemplo, galectina-3 extracelular induz apoptose em timócitos e linfócitos (FUKUMORI *et al.*, 2003; SILVA-MONTEIRO *et al.*, 2007). Essa ação pró-apoptótica de galectina-3 pode promover a progressão tumoral através da indução da morte de linfócitos T citotóxicos existentes no microambiente (NAKAHARA *et al.*, 2005). De fato, pacientes com tumores de mama, gastrointestinal, pulmão, linfoma não Hodgkin, ovário e melanoma apresentam níveis séricos de galectina-3 elevados (IURISCI *et al.*, 2000), sugerindo uma ação sistêmica de galectina-3 na progressão de tumores. Zubieta e colaboradores (2006) demonstraram a existência de uma correlação positiva entre os níveis de expressão de galectina-3 (em células tumorais) e o número de linfócitos T intratumorais em apoptose em biópsias de melanoma (ZUBIETA *et al.*, 2006).

Sabe-se que galectina-3 é secretada para o meio extracelular, tanto por células não transformadas, como por células neoplásicas (HUGHES, 1999; ZHU *et al.*, 2001). A galectina-3 extracelular é capaz de ligar-se tanto a integrinas da superfície celular, como as proteínas de MEC. Ao ligar-se a estas integrinas ou às proteínas de MEC, a galectina-3 inibe a interação integrina-proteínas da MEC. A restauração da adesão celular pela incubação de células com lactose e galectina-3 corrobora tal hipótese (ZHUO *et al.*, 2008). Contudo, como já mencionado, não conseguimos determinar se de fato a galectina-3 estava sendo secretada para o meio extracelular em nosso trabalho.

Alguns trabalhos demonstram o efeito anti-apoptótico de galectina. Galectina-3 é capaz de proteger diferentes células da apoptose induzida por ciclohexamida, FasL (ligante de Fas), cisplatina (dentre outros quimioterápicos), TNF α (fator de

necrose tumoral- α) e radiação ultravioleta (LIU *et al.*, 2002; OKA *et al.*, 2005; FUKUMORI *et al.*, 2006). Células Jurkat (linhagem celular de linfócitos T), por exemplo, transfectadas com o gene da galectina-3 são mais resistentes ao tratamento com estaurosporina (indutor inespecífico de apoptose) e com o anticorpo anti-Fas comparados ao controle não transfectado (YANG *et al.*, 1996).

Ainda, na linhagem de células epiteliais de mama, a superexpressão de galectina-3 aumenta a resistência das células epiteliais a apoptose induzida por cisplatina, óxido nítrico, radiação e *anoikis* (AKAHANI *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1999; MOON *et al.*, 2001). Apesar da galectina-3 não ser membro da superfamília de Bcl-2, essa lectina exibe semelhanças estruturais com a proteína anti-apoptótica Bcl-2. Ambas as proteínas são ricas em glicina, alanina e prolina na extremidade amino-terminal e contém o domínio NWGR (aspartato-triptofano-glicina-arginina) na região C terminal. Essa sequência é altamente conservada na estrutura de galectina-3 de diferentes espécies animais e é essencial para ligação a carboidratos dessa lectina (NAKAHARA *et al.*, 2005). Akahani e colaboradores (1997) demonstraram que a substituição de glicina por alanina no domínio NWGR de galectina-3 abole a resistência a apoptose induzida por cisplatina, indicando que esse domínio também é essencial para atividade anti-apoptótica de galectina-3 (AKAHANI *et al.*, 1997). A resistência de células tumorais a morte é uma das alterações adquiridas ao longo do processo de tumorigênese responsáveis pela quimioresistência de tumores. Esses achados sugerem, então, que o acúmulo de galectina-3 no citoplasma de células malignas possa ser interpretado como mau prognóstico (HONJO *et al.*, 2000). Embora o mecanismo de ação anti-apoptótico de galectina-3 ainda não tenha sido totalmente elucidado, pode-se especular que células de melanoma com galectina-3 não expressem as moléculas com as quais essa lectina se associa para

desempenhar sua ação anti-apoptótica e o efeito protetor de galectina-3 seria, então, célula-específico. Ainda, é possível que essa função de galectina-3 seja restrita a certos estímulos de morte que evocam vias de sinalização específicas e que não foram abordadas nesse trabalho.

Após esta investigação inicial das células usadas, foram feitos tratamentos com os compostos $\text{Cu}(\text{isaepy})_2$, $\text{Cu}(\text{enim})$ e o composto redox inativo $\text{Zn}(\text{isaepy})$, além do tratamento com volumes equivalentes da solução veículo (10% DMSO).

Os resultados obtidos demonstram que o tratamento com $\text{Cu}(\text{isaepy})_2$ por 24 horas leva a morte, por apoptose, de forma dependente da concentração na faixa usada (25-75 μM) em ambas as linhagens, sendo que a presença da galectina-3 promoveu maior susceptibilidade a morte nas células TM1G3 (Figura 10c). A citotoxicidade não foi evidente antes de 24 horas, como 8 ou 16h de exposição. Após 48 horas, todas as células tratadas apresentaram-se mortas (dados não mostrados). A desadesão, particularmente sobre matrigel, foi observada apenas nas células que expressam galectina-3, indicando uma associação entre sua presença, inibição da adesão e morte induzida pelo $\text{Cu}(\text{isaepy})_2$. Além disso, a diminuição na proliferação celular após tratamento das células com $\text{Cu}(\text{isaepy})_2$ também é indicativo da perda de viabilidade celular, principalmente nas TM1G3. Embora não tenhamos comprovado experimentalmente, a morte induzida por este composto parece ser a anoikis, morte ocasionada pela desadesão a proteínas de MEC, e mediada por integrinas (CHIARUGI & GIANNONI, 2008).

No caso do $\text{Cu}(\text{enim})$, esta associação ocorreu de forma análoga. A morte induzida por este composto ocorreu apenas após 48 horas, também de forma dependente da concentração do composto, mas preferencialmente nas células que não expressavam galectina-3. Após este tempo de exposição, a adesão celular a

matrigel foi maior nas TM1G3, indicando que a presença de galectina-3 se associa a maior adesão sobre matrigel e maior resistência a toxicidade induzida pelo Cu(enim). Este composto apresentou-se menos tóxico do que o Cu(isaepy)₂ nos ensaios de citotoxicidade, como já descrito (da SILVEIRA *et al.*, 2008). No caso de ambos os compostos, a desadesão, ou a menor capacidade de aderir sobre as proteínas de MEC parece estar relacionada à perda de viabilidade celular promovidas pelos compostos. Embora as células plaqueadas para o ensaio de adesão fossem células que não tenham sido coradas por azul de Tripán, certamente algum mecanismo de sinalização de perda de viabilidade celular já havia sido disparado naquele momento. Este cenário complexo indica que os compostos de cobre estudados têm ações bem distintas, corroborando a idéia de que os ligantes modulam suas reatividades de forma bastante evidente (da SILVEIRA *et al.*, 2008). Em nosso modelo, tais efeitos tornam-se mais distintos na presença da galectina-3, indicando que esta proteína pode tanto atuar como molécula que estimula (no caso do estímulo pelo Cu(isaepy)₂) ou que inibe (no caso do estímulo pelo Cu(enim)) a desadesão e morte celular.

Para analisarmos se os mecanismos disparados pelos compostos de cobre nas células eram mecanismos envolvendo estresse oxidativo, um marcador de danos oxidativos em proteínas foi determinado. Os dados de estresse carbonílico mostraram que ambos os compostos de cobre, mas não o de Zn, induziram um aumento de carbonilas após 24 horas de exposição apenas às células que expressam galectina-3. No caso do estímulo pelo Cu(isaepy)₂, este resultado é consistente com a hipótese da presença de galectina-3 estar associada a um fenótipo susceptível a danos oxidativos, inibição de adesão e apoptose, após 24 horas. Cu(isaepy)₂ tem sido descrito como um composto capaz de promover a

geração de ROS em diversas células, como neuroblastoma (FILOMENI, *et al.*, 2007). A produção destas espécies leva a danos oxidativos em proteínas, lipídeos e altera o estado redox intracelular, mensurado pela razão GSH/GSSG (FILOMENI, *et al.*, 2007) induzindo apoptose de neuroblastoma.

Em nosso trabalho, os danos protéicos correlacionaram-se aos processos de desadesão e morte celular. Dados recentes mostraram que a mitocôndria é um alvo importante de Cu(isaepy)₂, e dispara a via intrínseca da apoptose (FILOMENI *et al.*, 2007, 2009). Como a galectina-3 parece estar envolvida na homeostasia mitocondrial, possivelmente a resposta diferenciada das células TM1G3 em relação às células TM1MNG3 deva estar relacionada a interferência da galectina-3 na mitocôndria. Desta forma, os resultados apontam para um papel pró-apoptótico da galectina-3 no insulto oxidativo promovido pela exposição ao isaepy. Interessantemente, o composto análogo, contendo o metal Zn, não alterou o comportamento próprio de cada linhagem, o que demonstra que os efeitos observados para o isaepy foram resultado de alterações redox celulares. Já a exposição de células com galectina-3 ao Cu(enim) leva a aumento de estresse carbonílico após 24 horas de exposição, quando comparado tanto as células sem galectina-3 como as células TM1G3 não tratadas com o composto. Após 48 horas, entretanto, quando a citotoxicidade deste composto torna-se evidente, os níveis de carbonilação voltam ao normal, sugerindo que a presença de galectina-3, neste caso, propicia uma degradação rápida de proteínas oxidadas, levando possivelmente a uma maior resistência a morte e maior adesão celular.

Os nossos dados mostram que de fato, o grupo oxindol do Cu(enim) interfere na reatividade do cobre, produzindo efeitos redox distintos do grupo isatina do Cu(Isaepy)₂. A partir destes estudos, é claro que alguns complexos de cobre podem

interferir no ciclo celular em diferentes níveis, causando a apoptose (o que é muito interessante quando se trata de células tumorais), mas o mecanismo de ação ainda permanece sem elucidação. A morte celular é quase sempre associada a um ambiente oxidante, ao contrário do crescimento, que é associado a um ambiente redutor (HEWLETT *et al.*, 1977). Numerosas espécies pró-oxidantes, de fato, induzem a morte celular programada aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras espécies oxidantes, que iniciam uma cascata de sinalizadores de morte bastante complicada, envolvendo proteínas como caspases (proteases de cisteína), p38 e proteínas kinases (JNK), p53 e p21, entre outras proteínas capazes de regular o ciclo celular, fatores nucleares de resposta imunitária e fatores de junção e ativação de membrana. De fato, aproximadamente 50% dos tumores resultam de anomalias no gene necessário para expressar a proteína de supressão tumoral, a p53, envolvida em uma das cascatas da apoptose. Foi observado que a atividade da p53 pode ser modulada através da complexação com cobre, pelo mecanismo do par redox Cul/Cull (HAINAUT *et al.*, 1995). O ambiente redox é então capaz de determinar o destino de uma célula: proliferação, diferenciação ou morte (FINKEL, 2000).

Nossos dados demonstram que a presença da galectina-3 também modula a resposta celular a estímulos redox, induzindo conseqüências biológicas diferentes, como morte e adesão celular. Apesar dos resultados mostrarem que os compostos atuam diferentemente nas células, é interessante observar que ambos os compostos induzem estresse carbonílico, o que certamente reflete um estado pró-oxidativo. A literatura não tem relatado que a galectina-3 possa ter um papel redox ou controlado pelo estado redox celular. O único trabalho encontrado mostra que a superexpressão de galectina-3 em células BT549 aumenta susceptibilidade a

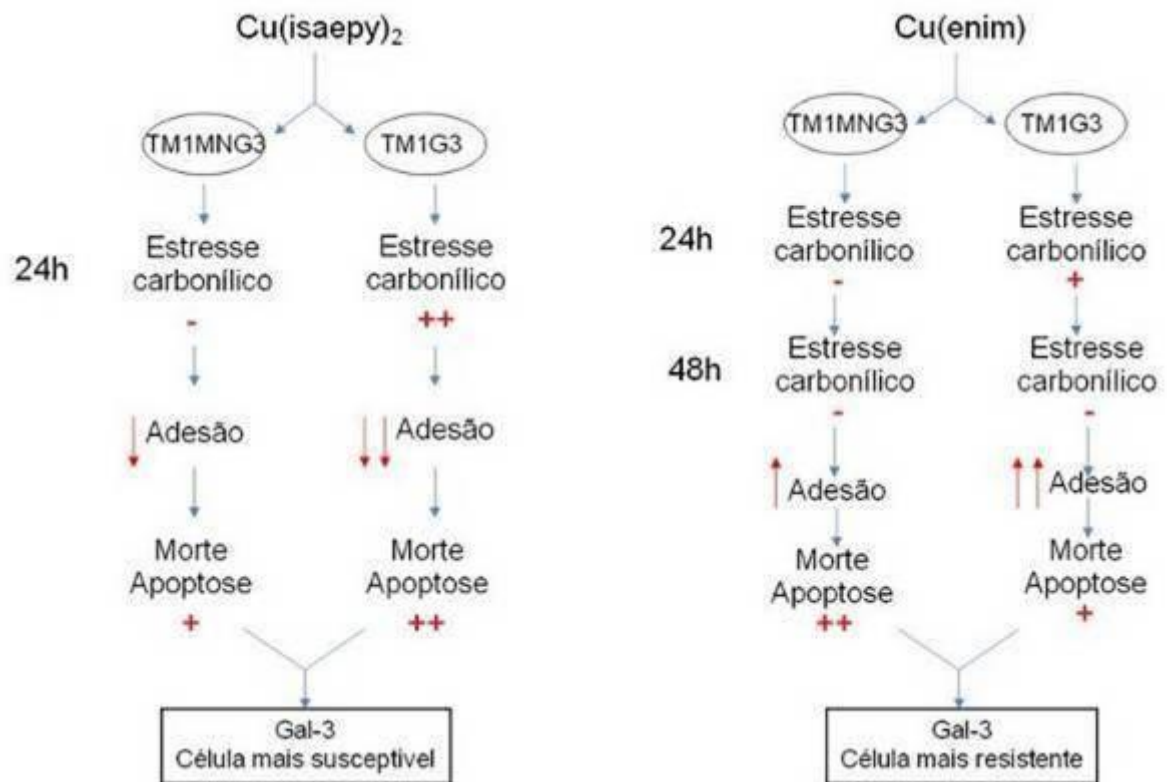
apoptose induzida por TRAIL e aumenta os níveis de GSH e de GSSG, o que indica que a reconstituição da galectina-3 é capaz de alterar o estado redox intracelular (Lee *et al.* 2003). Um dado importante que contribuirá para o entendimento molecular mais profundo em nosso sistema é a determinação dos níveis de GSH e GSSG, além da produção de espécies oxidantes. Estes são os próximos passos de nosso trabalho.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que:

- ✓ Galectina-3 é expressa apenas nas células transfectadas com o vetor contendo o gene dessa proteína, em todos os compartimentos celulares como núcleo, mitocôndria, microsossomos, membrana e citoplasma;
- ✓ Em células não expostas aos compostos metálicos, a galectina-3 inibe tanto a proliferação como a adesão celular;
- ✓ O tratamento com o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ por 24 horas leva a morte, por apoptose, de forma dependente da concentração em ambas as linhagens, sendo que a presença de galectina-3 promoveu maior susceptibilidade a morte nas células TM1G3. Neste tempo, os demais compostos não tiveram efeitos citotóxicos nas células de melanoma, independentemente da presença da galectina-3;
- ✓ O tratamento com o composto $[\text{Cu}(\text{isaepy})_2](\text{ClO}_4)_2$ por 24 horas induz estresse carbonílico e inibição de adesão a proteínas de matriz extracelular, efeitos mais bem evidenciados nas células TM1G3;
- ✓ O composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ só induz morte celular após tratamento de 48 horas e de forma dependente da concentração. As células que expressam galectina-3 são mais resistentes a citotoxicidade induzida por este composto;
- ✓ O tratamento com o composto $[\text{Cu}(\text{enim})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ por 48 horas estimula a adesão celular, principalmente das células TM1G3;
- ✓ Dependendo do ligante, a reatividade dos complexos de cobre pode variar, modulando a intensidade de suas propriedades pró-oxidantes.

- ✓ A expressão da galectina-3 determina as respostas celulares aos estímulos pró-oxidantes dos complexos metálicos.



REFERÊNCIAS

American Cancer Society. ACS Key statistics 2006. <http://www.cancer.org>. Acessado em 28 de outubro de 2009 às 22 horas.

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

BALDI, A.; SANTINI, D.; DE LUCCA, A.; PAGGI, M.G. cDNA array technology in melanoma: an overview. **J. Cell. Physiol.**, v. 196, p. 219-223, 2003.

BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.W.; CUMMINGS, R.D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, R.C.; KASAI, K.; LEFFLER, H.; LIU, F.T.; LOTAN, R.; MERCURIO, A.M.; MONSIGNY, M.; PILLAI, S.; POIRIER, F.; RAZ, A.; RIGBY, P.W.J.; RINI, J.M.; WANG, J.L. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell.** v. 76, p. 598, 1994. (a)

BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.W.; GITT, M.A. LEFFLER, H. Galectins – structure and function of a large family of animal lectins. **The journal of Biological Chemistry.** v. 269, p. 20807-2010, 1994. (b)

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** V. 72, p. 248-54, 1976.

BREWER, G.J. Causes and diagnosis of copper deficiency. **Am J Hematol.** v. 27, 2007

CERCHIARO, G.; MICKE, G.A.; TAVARES, M.F.M.; FERREIRA, A.M.D.C. Kinetic studies of carbohydrate oxidation catalyzed by novel isatin-Schiff base copper (II) complexes. **J. Mol Catalysis A: Chem.** v. 221, p. 29-39, 2004.

CERCHIARO, G.; AQUILANO, K.; FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R.; FERREIRA, A.M. Isatin-Schiff base copper(II) complexes and their influence on cellular viability. **J Inorg Biochem.** v. 99, p. 1433-1440, 2005.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; FRUNZIO, R.; BRUNI, C.B. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconj J.** v.19, p. 441-449, 2004.

CHIARUG, P.; GIANNONI, E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. **Biochem Pharmacol.** v. 76, p. 1352-64, 2008.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature Reviews|Cancer.** v. 3, p. 559-570, 2003.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P.A.; ADAMS, A.E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 115, p. 813, 2005.

COLI, A.; BIGOTTI, G.; ZUCCHETTI, F.; NEGRO, F.; MASSI, G. Galectin-3 a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. **Histopathology**. v. 40, p. 80-87, 2002.

COLVIN, O.M. Pharmacology of cancer chemotherapy: Antitumor alkylating agents. **Cancer: Practice of Oncology**. v. 6, 2001.

COOPER, D.N. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochim Biophys Acta**. v. 1572, p. 209-231, 2002.

COYLE, B.; KINSELLA, P.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; O'CONNOR, R.; CLYNES, M.; KAVANAGH, K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. **Toxicol In Vitro**. v. 18, p.63-70, 2004.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochem Biophys Acta**. v. 1572, p. 285, 2002.

DANIEL, K.G.; GUPTA, P.; HARBACH, R.H.; GUIDA, W.C.; DOU, Q.P. Organic cooper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. **Biochem Pharmacol**. v. 67, p. 1139-51, 2004.

da SILVEIRA, V.C.; LUZ, J.S.; OLIVEIRA, C.C.; GRAZIANI, I.; CIRIOLO, M.R.; FERREIRA, A.M.D.C. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base cooper(II) complexes with potential antitumor activity. **J Inorg Biochem**. v. 102, p. 1090-1103, 2008.

DAVIDSON, J.P.; DAVIS, M.J.; PATTERSON, R.J.; RIPOCHE, M.A.; POIRIER, F.; WANG, J.L. Shuttling of galectina-3 between the nucleus and cytoplasm. **Glycobiology**. v. 12, p. 329-337, 2002.

De SOUZA, G.A.; GODOY, L.M.; TEIXEIRA, V.R.; OTAKE, A.H.; SABINO, A.; ROSA, J.C.; DINARTE, A.R.; PINHEIRO, D.G.; SILVA, W.A. Jr.; EBERLIN, M.N.; CHAMMAS, R.; GREENE, L.J. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **Proteomics**. v. 6, p. 1460-1470, 2006.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim Biophys Acta**. v. 1760, p. 616-635, 2006.

DUTRA, F.; CIRIOLO, M.R.; CALABRESE, L.; BECHARA, E.J. Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. **Chem Res Toxicol**. v. 4, p. 755-60, 2005.

ELLERHORST, J.A.; STEPHENS, L.C.; NGUYEN, T.; XU, X.C. Effects of galectina-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. **Prostate**. v. 50, p. 60-70, 2002.

ENDO, K.; KOHNOE, S.; TSUJITA, E.; WATANABE, A.; NAKASHIMA, H.; BABA, H.; MAEHARA, Y. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. **Anticancer Res**. v. 25, p. 3117-21, 2005.

FERREIRA, A.M.; dos SANTOS, M.L.P.; PEREIRA, E.M.; DAMASCENO, M.O.; ALVES, W.A. Mimics of copper proteins: structural and functional aspects. **An Acad Bras Cienc.** v. 72, p. 51-57, 2000.

FILOMENI, G.; PICCIRILLO, S.; GRAZIANI, I.; CARDACI, S.; DA COSTA FERREIRA, A.M.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R. The isatin-Schiff base copper (II) complex Cu(isaepy)₂ acts as delocalized lipophilic cation, yields widespread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis. **Carcinogenesis.** v. 30, p. 1115-24, 2009.

FILOMENI, G.; CERCHIARO, G.; Da COSTA FERREIRA, A.M.; De MARTINO, A.; PEDERSEN, J.Z.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M.R. Pro-apoptotic activity of novel Isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. **J Biol Chem.** v. 282, p. 12010-21, 2007.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Lett.** v. 476, p. 52-4, 2000.

FUKUMORI, T.; OKA, N.; TAKENAKA, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; KASAI, T.; SHONO, M.; KANAYAMA, H.O.; ELLERHORST, J.; LOTAN, P.; RAZ, A. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. **Cancer Res.** v. 66, p. 3114-9, 2006.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; OKA, N.; YOSHII, T.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KANAYAMA, H.O.; KIM, H.R.; RAZ, A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Res.** v. 64, p. 3376-3379, 2004.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T.; KIM, H.R.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; KAGAWA, S.; RAZ, A. CD29 and CD27 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res.** v. 63, p. 8302-8311, 2003.

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicol.** v. 189, p. 147-63, 2003.

GARBE, C. Cutaneous melanoma: baseline and ongoing laboratory evaluation. **Dermatol. Ther.**, v. 18, p. 413-421, 2005.

GHIORZO, P.; SCARRÀ, G.B. Genetics of melanoma susceptibility. **Forum (Genova)**, v. 13, p. 114-122, 2003.

GILCHREST, B.A.; ELLER, M.S.; GELLER, A.C.; YAAR, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med.** v. 340, p. 1341-8, 1999.

GONG, H.C.; HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; HOGAN, V.; MAZUREK, N.; BRESALIER, R.S.; RAZ, A. The NH₂ terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Res.** v. 59, p. 6239-6245, 1999.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigm. Cell. Res.**, v. 18, p. 150-159, 2005.

- HAINAUT, P.; ROLLEY, N.; DAVIES, M.; MILNER, J. Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. **Oncogene**. v. 10, p. 27-32, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford**. 2007.
- HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K. CE in anticancer metallodrug research - an update. **Electrophoresis**. v. 11, 2007.
- HEWLETT, G. **Eur J Immunol**, 1977.
- HERLYN, M.; SATYAMOORTHY, K. Melanoma: Molecular biology of cutaneous melanoma. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**. v. 6, 2001.
- HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; INIHARA, H.; RAZ, A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. **Clin Cancer Res**. v. 7, p. 661-668, 2001.
- HOUGHTON, A.N.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**. v. 2, p. 275-278, 2002.
- HOYER, K.K.; PANG, M.; GUI, D.; SHINTAKU, I.P.; KUWABARA, I.; LIU, F.T.; SAID, J.W.; BAUM, L.G.; TEITELL, M.A. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. **Am J Pathol**. v. 164, p. 893-902, 2004.
- HSU, D.K.; YANG, R.Y.; PAN, Z.; SALOMON, D.R.; FUNG-LEUNG, W.P.; LIU, F.T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **AM J Pathol**. v.156, p. 1073-1083, 2000.
- HUFLEJT, M.E.; TURCK, C.W.; LINDSTEDT, R.; BARONDES, S.H.; LEFFLER, H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. **J Biol Chem**. v.268, p. 26712-8, 1993.
- HUGHES, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1473, p. 172-85, 1999.
- HUGHES, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. **Biochimie**. v. 83, p. 667-676, 2001.
- HUNCHAREK, M.; CAUBET, J.F.; MCGARRY, R. Single agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. **Melanoma Res**. v. 11, p. 75-81, 2001.
- INOHARA, H.; AKAHANI, S.; KOTHS, K.; RAZ, A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. **Cancer Res**. v. 56, p. 4530-4534, 1996.
- INOHARA, H.; AKAHANI, S.; RAZ, A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. **Exp Cell Res**. v. 245, p. 294-302, 1998.

Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 28 de outubro de 2009 às 22 horas.

IURSCI, I.; TINARI, N.; NATOLI, C.; ANGELUCCI, D.; CIANCHETTI, E.; IACOBELLI, S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. **Clin Cancer Res.** v. 6, p. 1389-93, 2000.

JEFFREY, P.D.; RUSSO, A.A.; POLYAK, K.; GIBBS, E.; HURWITZ, J.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N.P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. **Nature.** v. 376, p. 313-320, 1995.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M.J. Cancer statistics. **Ca Cancer J Clin.** v. 58, p. 71-96, 2008.

JOO, H.G.; GOEDEGEBUURE, P.S.; SADANAGA, N.; NAGOSHI, M.; VON BERNSTORFF, M.; EBERLEIN, T.J. Expression and function of galectina-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. **J Leukoc Biol.** v.69 p. 555-64, 2001.

KADROFSKE, M.M.; OPENO, K.P.; WANG, J.L. The human LGALS3 (galectina-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. **Arch Biochem Biophys.** v. 349, p. 7-20, 1998.

KIM, H.R.; LIN, H.M.; BILIRAN, H. RAZ, A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectina-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res.** v. 59, p. 4148-4154, 1999.

KUBAWARA, I.; LIU, F.T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J Immunol.** v. 156, p. 3939-44, 1996.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. **Journal of Pathology.** 2009

LAHM, H.; ANDRE, S.; HOEFLICH, A.; FISCHER, J.R.; SORDAT, B.; KALTNER, H.; WOLF, E.; GABIUS, H.J. Comprehensive galectina fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. **J Cancer Res Clin Oncol.** v. 127, p. 375-86, 2001.

LANE, M.E.; YU, B.; RICE, A.; LIPSON, K.E.; LIANG, C.; SUN, L.; TANG, C.; MACMAHON, G.; PESTELL, R.G.; WADLER, S. A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. **Cancer Res.** v. 61, p. 6170, 2001.

LEE, Y.J.; SONG, Y.K.; SONG, J.J.; SIERVO-SASSI, R.R.; KIM, H.R.; LI, L.; SPITZ, D.R.; LOKSHIN, A.; KIM, J.H. Reconstitution of galectina-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. **Exp Cell Res.** v. 288, p. 21-34, 2003.

Le MARER, N. Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells. **Cell Biol Int.** v. 24, p. 245-251, 2000.

LI, J.M.; SHAH, A.M. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. **J Biol Chem.** v. 277, p. 19952-19960, 2002.

LIN, H.M.; PESTELL, R.G.; RAZ, A.; KIM, H.R. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SPI and cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene.** v. 21, p. 8001-10, 2002.

LI, L.Z.; ZHAO, C.; XU, T.; JI, H.W.; YU, Y.H.; GUO, G.Q. Synthesis, crystal structure and nuclease activity of a Schiff base copper(II) complex. **J Inorg Biochem.** v. 99, p. 1076-1082, 2005.

LINDER, M.C. Copper and genomic stability in mammals. **Mutation Res.** v. 475, p.141-152, 2001.

LIPPARD, L.J. Metals in Medicine. In: BERTINI, I.; GRAY, H.B.; LIPPARD, L.J.; VALENTINE, J.S. **Bioinorganic Chemistry**, Univ. Science Books, cap. 9, p. 505-583, 1994.

LIU, F.; PATTERSON, R.; WANG, J. Intracellular functions of galectin. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, p. 263, 2002.

LIU, Y.Y.; IMAI, T.; UKITA, M.; SEKINE, M.; HIGUCHI, T. Distributions of iron, manganese, copper and zinc in various composts and amended soils. **Environ Technol.** v. 12, p.1517, 2003.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumor progression. **Nature Reviews.** v. 5, p. 29-41, 2005.

LOTZE, M.T.; DALLAL, R.M.; KIRKWOOD, J.M.; FLICKINGER, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. **Cancer: Principles and Practice of Oncology.** v. 6, 2001.

LUQUE, A.; SANCHES-MDRID, F.; CABANAS, C. Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD49) by divalent cations and stimulatory \hat{a} 1 antibodies. **FEBS Letters.** V. 346, p. 278-284, 1994.

MAEDA, N.; KAWADA, N.; SEKI, S.; ARAKAWA, T.; IKEDA, K.; IWAO, H.; OKUYAMA, H.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; YOSHIZATO, K. Stimulation of proliferation of a rat hepatic stellate cells by galectina-1 and galectina-3 through different intracellular signaling pathways. **J Biol Chem.** v. 278, p. 18938-44, 2003.

MATARRESE, P.; FUSCO, O.; TINARI, N.; NATOLI, C.; LIU, F.T.; SEMERARO, M.L.; MALORNI, W.; IACOBELLI, S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **Int J Cancer.** v. 85, p. 545-554, 2000 (a).

MATARRESE, P.; TINARI, N.; SEMERARO, M.L.; NATOLI, C.; IACOBELLI, S.; MALORNI, W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Lett.** v. 437, p. 311-315, 2000 (b).

MAZUREK, N.; SUN, Y.J.; PRICE, J.E.; RAMDAS, L.; SCHOBBER, W.; NANGIA-MAKKER, P.; BYRD, J.C.; RAZ, A.; BRESALIER, R.S. Phosphorylation of galectina-

3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of gene. **Cancer Res.** v. 65, p. 10767-75, 2005.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1005-1010, 1998.

MING, L.J.; Structure and function of "metalloantibiotics". **Med Res Rev.** v. 23, p. 697-762, 2003.

MOON, B.K.; LEE, Y.J.; BATTLE, P.; JESSUP, J.M.; RAZ, A.; KIM, H.R. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: Implication of galectin-3 function during metastasis. **Am J Pathol.** v. 159, p. 1055-1060, 2001.

MOUAWAD, R.; SEBERT, M.; MICHELS, J.; BLOCH, J.; SPANO, J.P.; KHAYAT, D. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs new strategies. **Crit Rev Oncol/Hematol.** v. 10, p. 1016-26, 2009.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis.** v. 10, p. 267-75, 2005.

NTZIACHRISTOS, L.; FROINES, J.R.; CHO, A.K.; SIOUTA, C. Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. **Particle e Fibre Toxicology.** v.7, p. 4-5, 2007.

OBA-SHINJO, S.M.; CORREA, M.; RICCA, T.I.; MOLOGNONI, F.; PINHAL, M.A.; MARIE, S.K.; SAMPAIO, L.O.; NADER, H.B.; CHAMMAS, R.; JASIULIONIS, M.G. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia.** v.8,p. 231-41, 2006.

OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconj J.** v. 19, p. 527-535, 2004.

OCHIENG, J.; LEITE-BROWNING, M.L.; WARFIELD, P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 246, p. 788-791, 1998.

OKA, N.; NAKAHARA, S.; TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; HOGAN, V.; KANAYAMA, H.O.; YANAGAWA, T.; RAZ, A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. **Cancer Res.** v. 65, p. 7546-7553, 2005.

PARON, I.; SCALONI, A.; PINES, A.; BACHI, A.; LIU, F.T.; PUPPIN, C.; PANDOLFI, M.; LEDDA, L. Di LORETO, C.; DAMANTE, G.; TELL, G. Nuclear localization of galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 302, p. 545-553, 2003.

PRIETO, V.G.; MOURAD-ZEIDAN, A.A.; MELNIKOVA, V.; JOHNSON, M.M.; LOPEZ, A.; DIWAN, A.H.; LAZAR, A.J.; SHEN, S.S.; ZHANG, P.S.; REED, J.A.; GERSHENWALD, J.E.; RAZ, A.; BAR-ELI, M. Galectin-3 expression is associated

with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. **Clin Cancer Res.** v. 12, p. 6709-15, 2006.

RISS, D.; QIAN, X.; BAYLESS, J.; SCHEITHAUER, B.W.; YOUNG, W.F.Jr.; VIDAL, S.; KOVACS, K.; RAZ, A.; LLOYD, R.V. Differential expression of galectina-3 in pituitary tumors. **Cancer Res.** v. 62, p. 2251-5, 2003.

RODRIGUEZ-VICENTE, J.; VICENTE-ORTEGA, V.; CANTERAS-JORDANA, M. The effects of different antineoplastic agents and of pretreatment by modulators on three melanoma lines. **Cancer.** V.82, p. 495-502, 1998.

ROTILIO, G.; CARRI, M.T.; ROSSI, L. CIRIOLO, M.R. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. **IUBMB Life.** v. 50, p. 309-314, 2000.

SCHIFF, P.B.; FANT, J.; HORWITZ, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature.** v. 277, p. 665-7, 1979.

SILVA-MONTEIRO, E.; LORENZATO, L.R.; NIHEI, O.K.; JUNQUEIRA, M.; ROBO NOVITCHI, G.A.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; SAVINO, W.; CHAMMAS, R.; VILLA-VERDE, D.M.S. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am Journal of Pathol.** 2007.

SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; TSUTSUMI, S.; OKADA, K.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; KUWANO, H.; RAZ, A. Implication of galectina-3 in Wnt signaling. **Cancer Res.** v. 65, p. 3535-3537, 2005.

TAKENAKA, Y.; INOHARA, H.; YOSHII, T.; OSHIMA, K.; NAKAHARA, S.; AKAHANI, S.; HONJO, Y.; YAMAMOTO, Y.; RAZ, A.; KUBO, T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectina-3. **Cancer Lett.** v. 195, p. 111-9, 2003.

TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; YOSHII, T.; OKA, N.; INOHARA, H.; KIM, H.R.; BRESALIER, R.S.; RAZ, A. Nuclear export of phosphorylated galectina-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Mol Cell Biol.** v. 24, p. 4395-4406, 2004.

THOMPSON, K.H.; ORVIG, O. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science.** v. 300, p. 936-939, 2003.

TUCKER, M.A.; GOLDSTEIN, A.M. Melanoma etiology: where are we?. **Oncogene.** v. 20, p. 3042-52, 2003.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem.** v. 12, p. 1161-208, 2005.

VAN DEN BRULE, F.A.; FERNANDEZ, P.L.; BUICU, C.; LIU, F.T.; JACKERS, P.; LAMBOTTE, R.; CASTRONOVO, V. Differential expression of galectina-1 and galectina-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev Dyn.** v. 209, p. 399-405, 1997.

VEREecken, P.; ZOUAOUI BOUDJELTIA, K.; DEBRAY, C.; AWADA, A.; LEGSSYER, I.; SALES, F.; PETEIN, M.; VANHAEVERBEEK, M.; GHANEM, G.;

HEENEN, M. High serum galectina-3 in advanced melanoma: preliminary results. **Clin Exp Dermatol.** v. 31, p. 105-109, 2006.

VILLA-VERDE, D.M.; SILVA-MONTEIRO, E.; JASIULIONIS, M.G.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A.; BRENTANI, R.R.; SAVINO, W.; CHAMMAS, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **Eur J Immunol.** v. 32, p. 1434-1444, 2002.

XU, X.C.; NAGGAR, A.K.; LOTAN, R. Differential expression of galectina-1 and galectina-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **Am J Pathol.** v. 147, p. 815-822, 1995.

WARFIELD, P.R.; MAKKER, P.N.; RAZ, A.; OCHIENG, J. Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectina-3. **Invasion Metastasis.** v. 17, p. 101-12, 1997.

WEST, D.X.; PADHYE, S.B.; SONAWANE, P.B. Novel broad-spectrum metal-based antifungal agents. **Struc Bond.** v. 76, 1991.

YANG, R.Y.; LIU, F.T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cell Mol Life Sci.** v. 60, p. 267-276, 2003.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. Expression of galectina-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 93, p. 6737-42, 1996.

YOSHII, T.; FUKUMORI, T.; HONJO, Y.; INIHARA, H.; KIM, H.R.; RAZ, A. galectina-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **J Biol Chem.** 2001.

YU, F.; FINLEY, R.L.; RAZ, A.; KIM, H.R. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectina-3 translocation. **J Biol Chem.** v. 277, p. 15819-15827, 2002.

ZHU, W.Q.; OCHIENG, J. Rapid release of intracellular galectina-3 from breast carcinoma cells by fetuin. **Cancer Res.** v. 61, p. 1869-73, 2001.

ZUBIETA, M.R.; FURMAN, D.; BARRIO, M.; BRAVO, A.L.; DOMENICHINI, E.; MORDOH, J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. **Am J Pathol.** v.168, p. 1666-75, 2006.

ZHUO, Y.; CHAMMAS, R.; BELLIS, S.L. Sialylation of β 1 integrins blocks cell adhesion to galectina-3 and protects cells against galectina-3-induced apoptosis. **Journal Biol Chem.** 2008.