

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Caracterização da interacção da galectina-3 e
Notch na progressão tumoral**

Sofia Nascimento dos Santos

Mestrado em Biologia Molecular Humana

Lisboa, 2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Caracterização da interacção da
galectina-3 e Notch na progressão
tumoral**

Sofia Nascimento dos Santos

Mestrado em Biologia Molecular Humana

Lisboa, 2009

Dissertação orientada por:

Orientador externo: Doutor Emerson Bernardes, IPATIMUP

Orientadora interna: Professora Doutora Luisa Cyrne, FCUL, DQB

Agradecimentos

A todos os que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, este é o momento de agradecer.

Mais do que a qualquer outra pessoa, o meu orientador, Doutor Emerson Bernardes, merece o meu primeiro agradecimento, por sempre ter demonstrado acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação, pela coragem de ousar trabalhar com novas ideias e conceitos, por ouvir com interesse todas as minhas questões, dúvidas e problemas, pela confiança, e, sem esquecer também, por todo o apoio e amizade fora do âmbito desta dissertação.

Ao Doutor Celso Reis pela oportunidade que me deu em realizar este trabalho, à Doutora Leonor David por me ter acolhido no seu laboratório e por todo o apoio, simpatia e boa disposição que sempre demonstraram.

À Professora Luísa Cyrne, por ter aceitado ser minha orientadora interna, pela disponibilidade e prontidão.

Às “mucinhas” e “mucinhos”, pela alegre convivência durante este ano de trabalho e pelas excelentes horas de boa disposição que possibilitaram que o trabalho fluísse com mais alegria. Um agradecimento especial ao trio Vânia, Diana e Dina pela energia positiva.

Quero também agradecer aos amigos que ao longo dos anos na universidade me ajudaram no meu processo de crescimento: Tânia, Pequito, Margarida, Melissa, Raquel, Inês, Susanita e também aos meninos mais “Ruins” e ao Francisco, pela amizade e carinho.

Um agradecimento enorme às meninas do 3º Dto, Martinha, Kiki e Cau, por fazerem parte da minha vida, por sempre estarem lá quando eu preciso e por serem o meu porto de abrigo.

Ao Marco que sempre me acompanhou e me ajudou em diversas etapas da minha vida. Pela amizade e confiança.

Aos amigos de fornos, Susana, Graça, Marco, Paulito e Fábio, essenciais no meu processo de crescimento e que eu nunca esqueço mesmo longe.

Do outro lado do atlântico, um agradecimento muito especial à Nerry, pelos “horrores” de divertimento e simpatia com que me brindou e pela enorme colaboração na realização desta dissertação.

À Professora Fernanda Cunha, pelo apoio e amizade, por ter despertado o meu interesse pela Biologia e por me lembrar que “hoje é o primeiro dia do resto da tua vida”.

À minha família, por todo o apoio, carinho e amizade. Aos meus pais por suportarem uma filha tão distante da vida familiar durante estes últimos 5 anos. Um grande obrigada por me guiarem, pela paciência, força e coragem. À minha irmã por sempre acreditar em mim e pela amizade que conquistámos.

A todos aqueles que cruzaram a minha vida e que directa ou indirectamente contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Resumo

A galectina-3 é uma proteína de ligação a β -galactosídeos presentes em glicoproteínas na superfície celular, regulando o estado de activação da célula. No cancro, galectina-3 participa na promoção do crescimento e desenvolvimento tumoral, na adesão celular, migração, angiogenese, resistência à apoptose e na modulação do ciclo celular. Uma sobreexpressão desta proteína tem sido associada com a transformação maligna, no entanto, também uma redução na expressão de galectina-3 tem sido documentada com a progressão tumoral em diversos tipos de cancro.

Os receptores Notch são glicoproteínas de superfície celular que possuem estruturas de carboidratos passíveis de serem reconhecidas pela galectina-3 e cuja activação, modula diversos processos celulares como a diferenciação, proliferação, apoptose, adesão, migração e angiogenese. Na literatura pode encontrar-se que tumores que apresentam uma sobreactivação da via Notch, apresentam níveis de expressão reduzidos de galectina-3. Neste trabalho, e sobre a hipótese de que galectina-3 interage com o receptor Notch, propôs-se investigar de que forma galectina-3 poderia modular a via Notch. Os resultados obtidos demonstram que galectina-3 se liga ao receptor Notch em linhas de carcinoma gástrico. Os resultados dessa interação podem estar na origem de, após inibição de galectina-3, se verificar: 1) uma maior expressão do receptor Notch-1 e; 2) maior clivagem do receptor e consequente sobreexpressão de genes dependentes da activação da via Notch. A análise da expressão destas moléculas em tecido tumoral gástrico sugere existir uma correlação inversa entre a expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1. Demonstra-se portanto que galectina-3 exerce um papel de regulador negativo sobre a via de activação Notch e, a expressão coordenada das duas moléculas, pode exercer papel fundamental na progressão tumoral.

Palavras-chave: Lectina, Galectina-3, Receptor Notch, Via de sinalização Notch, Progressão tumoral

Abstract

Galectin-3 is one of the 15 known members of the galectin family of β -galactoside-binding proteins that binds a wide array of N-glycans-containing glycoproteins on the cell surface, thus regulating activation status of the cell. There is an increasing body of evidence showing that galectin-3 has important functions in several aspects of cancer biology, such as promotion of tumour development and growth, including the promotion of tumour cell adhesion, migration, angiogenesis, apoptosis-resistance and cell-cycle progression. Although galectin-3 overexpression is related to malignant transformation, its expression has been reported to be downregulated with progressive stages in many cancer types.

Notch receptors are cell surface glycoproteins whose activation by Notch ligands regulates a variety of cellular processes, such as differentiation, proliferation, apoptosis, adhesion, migration, and angiogenesis. The extracellular domain of Notch receptors possesses several glycans bearing a terminal β -galactose, which are potential ligands for galectin-3. Based on the literature data, tumours that exhibit strong activation of the Notch pathways, in general, display reduced levels of galectin-3 expression. Therefore, the main goal of this study is to determine whether the status of Notch signaling pathway activation is altered by galectin-3 expression. The results show that galectin-3 binds to the Notch extracellular domain from gastric carcinoma cell lines and, the consequences of such interaction may account for the enhanced Notch receptors expression/activation and for the upregulation of downstream Notch target genes found in galectin-3 knockdown cells. The expression levels of these two molecules in gastric cancer tissues suggest that there is an inverse correlation between the expression of galectin-3 and Notch-1 receptor. In conclusion, galectin-3 exerts down modulatory effects on Notch signaling pathway and, the coordinated expression of galectin-3 and Notch receptors may play an important role in the development of cancer.

Key-words: Lectin, Galectin-3, Notch receptor, Notch signaling pathway, Tumoral progression

Índice	
Agradecimentos	II
Resumo	IV
Abstract.....	V
Introdução.....	1
Lectinas – galectinas – galectina-3	1
Galectina-3 na tumorigénese	2
Sinalização Notch	3
Notch na tumorigénese	5
Galectina-3 e Notch no cancro gástrico.....	6
Possível inter-relação entre Galectina-3 e Notch.....	7
Objectivo Geral.....	8
Material e métodos	9
Linhas celulares	9
Inibição de galectina-3 nas células AGS	9
Extracção de RNA	9
Extracção proteica.....	10
Transcrição reversa	10
PCR em tempo real.....	10
Western Blot	11
Imunoprecipitação	11
Citometria de fluxo	12
Imunofluorescência.....	12
Imunohistoquímica	12
Resultados.....	14
A activação de Notch-1 é inversamente correlacionada com a expressão de galectina-3	14
Galectina-3 localiza-se preferencialmente na membrana plasmática das linhas celulares gástricas AGS e MKN45	15
Galectina-3 modula negativamente a via de sinalização Notch.....	16
Inibição de galectina-3.....	16
A inibição de galectina-3 leva a um aumento da transcrição do receptor Notch-1	18
A inibição de galectina-3 leva a um aumento da activação da via Notch	19
Galectina-3 interage com o receptor Notch-1	20

Galectina-3 e a expressão do receptor Notch-1 encontram-se inversamente correlacionada em tecido tumoral gástrico	21
Discussão	24
Conclusão	29
Bibliografia.....	30
Anexos.....	A1

Introdução

1) Lectinas – galectinas – galectina-3

Lectinas, ou proteínas de ligação a carboidratos, reconhecem estruturas de oligossacáridos específicos presentes tanto em glicoproteínas como em glicolípidos. A interacção entre lectinas e carboidratos regula diversos processos biológicos como o reconhecimento de patógenos por células do sistema imune, interacções célula-célula e célula-matriz extracelular, assim como processos de migração e proliferação celular¹. As lectinas podem ser classificadas em dois grupos consoante o local onde reconhecem os seus ligandos: lectinas que reconhecem ligandos endógenos e que actuam no tráfego intracelular de glicoproteínas (calnexinas, lectinas de tipo M, L e P); e lectinas que possuem papéis intra e extra-celulares, como a adesão celular e imunidade inata (lectinas de tipo C, R, I, *siglecs* e galectinas)².

Os membros da família das galectinas são caracterizados por possuírem um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e afinidade por β -galactosídeos encontrados tanto em glicanos O- como em N-ligados². Até à data, 15 galectinas animais foram identificadas, e encontram-se subdivididas em 3 grupos, de acordo com a sua arquitectura: proto-galectinas, que contém um CRD por subunidade e dimerizam através de interacções não covalentes, (inclui as galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -13, -14 e -15); galectinas do tipo tandem, que possuem 2 CRD distintos (capazes de reconhecer ligandos diferentes) ligados por um péptido *linker* de tamanho variável (galectinas-4, -6, -8, -9 e -12); e a galectina-3, única de tipo quimera, que contém um único CRD na extremidade C-terminal, unido a sequências distintas de aminoácidos repetidos em *tandem* na extremidade N-terminal¹

A galectina-3 (gal-3) é possivelmente o membro mais estudado da família das galectinas. Esta lectina, de 31 kDa é encontrada em solução como um monómero com dois domínios funcionais. A extremidade C-terminal possui um CRD com cerca de 135 aminoácidos sendo responsável pela actividade de lectina de gal-3³. Vários estudos sobre a especificidade e actividade de ligação a carboidratos da gal-3, descreveram N-acetilactosamina (LacNAc, Gal β 1-4GlcNAc) como o seu ligando preferencial⁴. No entanto, verificou-se também que dissacáridos com unidades NeuNA α 2 -3 ou GalNAc α 1-3 e FUC α 1-2 terminal aumentavam significativamente a afinidade para galectina-3⁵.

Além dos ligandos que possuem carboidratos, a gal-3 interage com diversas moléculas não glicosiladas através de interacções proteína-proteína. O domínio N-terminal é longo e flexível, com cerca de 100-150 resíduos de aminoácidos, (consoante a espécie de

origem) e constituído por sequências repetidas de 9 aminoácidos ricos em prolina, glicina e glutamina. Apesar de este domínio não possuir actividade de ligação a carboidratos, é essencial para a actividade biológica de gal-3. Este domínio N-terminal é responsável pela formação de pentâmeros após ligar de forma multivalente vários carboidratos. Esta função aparenta ser biologicamente regulada pois verificou-se que este domínio é susceptível de ser clivado por certas metaloproteinases como MMP-2 e MMP-9, reduzindo a auto-associação de gal-3 e suprimindo as propriedades biológicas dependentes de multimerização⁴.

A gal-3 encontra-se maioritariamente em células epiteliais, endoteliais e em células do sistema imune⁶. Possui uma expressão ubíqua com múltiplas funções biológicas, dependendo da sua localização sub-celular⁶. A localização citoplasmática e nuclear de gal-3 dependem de diversos factores como o tipo celular, o estado de proliferação, condições de cultura, progressão neoplásica e transformação⁷. No núcleo, gal-3 encontra-se envolvida em processos de *splicing* de pré-RNA, regulação do crescimento celular e progressão do ciclo celular, enquanto no citoplasma, esta molécula parece actuar como molécula anti-apoptótica⁸. Gal-3, tal como as outras galectinas, apesar de não possuir sequência sinal de secreção⁹, pode ser encontrada no meio extracelular. Extracelularmente, esta lectina pode ligar-se a glicoconjugados de superfície celular assim como a glicoproteínas presentes na matriz extracelular como a laminina, fibronectina e elastina, modulando positivamente a adesão celular⁵. Gal-3 pode ligar-se de forma multivalente sendo capaz de formar estruturas supramoleculares realizando o “cross-link” de glicoproteínas na superfície celular. Através deste mecanismo é possível a activação de vias de sinalização transmembranares responsáveis pela modulação de inúmeros processos como a progressão do ciclo celular, mitose ou apoptose¹.

2) Galectina-3 na tumorigénese

O processo de transformação maligna compreende alterações no genoma das células que conferem vantagens no crescimento (proliferação), na sobrevivência, na metastização e na evasão ao sistema imunitário. A expressão de gal-3 tem sido correlacionada com o processo de transformação em diversas células^{10, 11}. Vários estudos têm fornecido evidências relevantes do papel de gal-3 na migração, activação celular e apoptose, assim como na angiogénese, formação de metástases e regulação do sistema imune. No entanto, o mecanismo pelo qual a gal-3 está envolvida na transformação celular e crescimento ainda não é completamente compreendido.

Galectina-3 tem sido considerada um importante factor de prognóstico em diversos tipos de cancro. A expressão ambígua de gal-3 parece depender do órgão ou tecido, sugerindo-se que factores específicos do tumor ou tecido modulam a sua expressão. Um aumento da expressão de gal-3 tem sido encontrado em vários tipos de carcinomas. No carcinoma de células pavimentosas cutâneas demonstrou-se um aumento da expressão de gal-3 citoplasmática, associada à sua actividade anti-apoptótica¹². Galectina-3 está significativamente ausente em hepatócitos. No entanto a sua expressão aparenta ser induzida com a transformação maligna¹³ e encontra-se associada à formação de metástases¹⁴. Um aumento da expressão de galectina-3 tem sido associado a um pior prognóstico em carcinoma da tiróide^{15, 16}.

Por outro lado, uma redução na expressão de gal-3 foi associada à progressão tumoral da mama. Verificou-se que em células de carcinoma da mama, uma diminuição de gal-3 levou à alteração de morfologia celular, perda de crescimento independente de soro e independente de ancoragem^{17, 19}. Desta mesma forma, em fases mais avançadas, na des-diferenciação tumoral e metástase de adenocarcinoma do pâncreas, encontrou-se uma associação com a diminuição da expressão de galectina-3¹⁹. No cancro colorectal verificou-se também que uma diminuição da expressão de galectina-3 se encontrava relacionada com o aumento da invasão e metástase²⁰. Em cancro da próstata, a redução da expressão de galectina-3 foi claramente associada ao aumento da progressão tumoral^{21, 22}.

3) Sinalização Notch

A designação *Notch* foi dada a um gene descoberto em *Drosophila melanogaster*, cuja perda de função parcial resultava no aparecimento de indentações (notches) nas margens das asas²³. Em 1983, Lehman e colaboradores descreveram que a perda de função de Notch, induzida por mutações, originava um fenótipo neurogénico, em que células destinadas a construir a epiderme mudavam de destino originando tecido neuronal. Desde então, diversos trabalhos culminaram no desvendar de uma via de sinalização evolutivamente conservada. Esta sinalização foi implicada em vários processos celulares: especificação celular, diferenciação, proliferação, apoptose, adesão, transições epitélio-mesenquimais, migração e angiogénese. O papel de Notch na mediação de neoplasias actuando como oncogene ou como supressor de tumor também tem sido descrito²⁴.

O termo “sinalização Notch” refere-se a um mecanismo molecular específico conservado em diversos organismos (figura 1). Este mecanismo é também referido como

sinalização Notch “canónica”, de forma a distingui-la de vias de sinalização atípicas que têm sido descritas^{25, 26, 27}. A via canónica de sinalização Notch envolve a activação do receptor Notch, na superfície das células, pela interacção directa com ligandos presentes numa célula adjacente. Em mamíferos são conhecidos quatro genes Notch (*NI – N4*) que codificam para um receptor transmembranar de 300 kDa

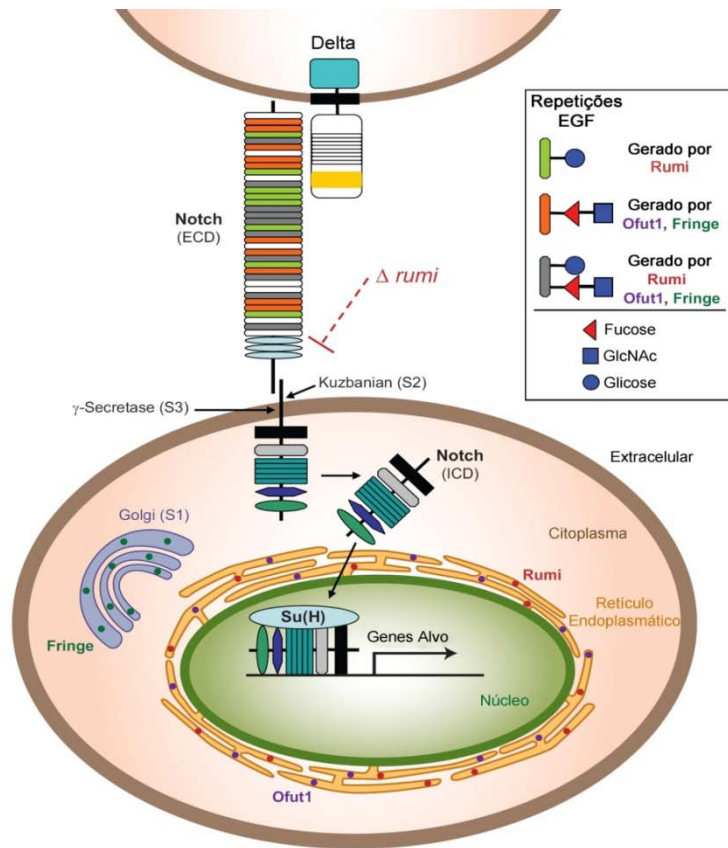


Figura 1. Biossíntese do receptor Notch²⁸

e cinco ligandos (Delta-like 1, 3 e 4 e Jagged 1 e 2) que juntos, são responsáveis pela maioria dos efeitos na sinalização Notch. A ligação dos ligandos activa o receptor Notch através de um processo altamente regulado que resulta na proteólise do receptor e consequente libertação de um fragmento solúvel, NICD (*Notch intracelular domain*), que migra para o núcleo onde participa directamente na regulação transcripcional dos genes alvo²⁹. Este mecanismo encontra-se ilustrado na figura 1.

A resposta nuclear, resultado da activação Notch, tem como principais efectores os factores de transcrição da família CSL. Após activação de Notch induzida pelo ligando, o fragmento libertado, NICD, liga-se fisicamente a CSL e, juntamente com o co-activador *Mastermind* e acetiltransferases de histonas forma um complexo transcripcionalmente activo³⁰. Este complexo activa a expressão de genes da família *Hes* (homólogos de *Hairy/Enhancer of Split*) e *Hey* (Hairy-related transcription factor). Além dos membros da família *Hes* e *Hey*, existem vários genes, implicados directamente em várias neoplasias, que são sobreexpressos como consequência directa da sinalização Notch dependente de CSL. Alguns desses genes, são *erbB2*, *cyclin D1* e *NFκB2*, *c-myc*, *bcl-2*, *E2A* e os próprios genes *Notch1* e *Notch3*³¹.

A via de sinalização canónica Notch é regulada de diversas formas. O receptor Notch e, em alguns casos os ligandos DSL, são alvos de proteólise, glicosilação, ubiquitinação e outras modificações como fosforilação. Estes fenómenos alteram a sensibilidade da interacção dos ligandos com o receptor Notch, permitem o tráfego do receptor e seus ligandos por compartimentos endocíticos e estão implicados na degradação e reciclagem de Notch.

Na superfície da célula, tanto os ligandos como o receptor Notch são constantemente internalizados. Este tipo de endocitose parece ser mediado pela ubiquitinação de proteínas transmembranares na membrana plasmática, por uma ligase de ubiquitina E3. Após endocitose, os ligandos podem ser novamente reciclados para a membrana, tornando a activação Notch mais eficiente. No entanto, um evento posterior de ubiquitinação destas proteínas nos endossomas, pode marcar tanto os ligandos como o receptor Notch para degradação em lisossomas³².

A activação da via Notch pelos ligandos também é modulada por diversas enzimas que glicosilam tanto o receptor Notch como os seus ligandos nas repetições EGF, modificando a afinidade dos ligandos pelo receptor. Os efeitos da glicosilação na sinalização Notch são complexos, sendo que a maioria dos estudos foca-se no papel dos glicanos O-ligados no receptor Notch como a O-fucosilação e a O-glucosilação. No entanto também glicanos N-ligados podem ser encontrados no domínio extracelular de Notch.

4) Notch na tumorigénese

Diversas evidências suportam a ideia de que vias de sinalização essenciais no desenvolvimento embrionário também possuem um papel importante na auto-renovação de tecidos^{33, 34}. Mutações nestas vias (tais como *ΔE-cadherin* e ErbB) por vezes levam a tumorigénese, o mesmo acontecendo com Notch³⁴. Tendo em conta o papel biológico desta via de sinalização, não é de surpreender que uma desregulação desta via esteja subjacente ao aparecimento de diversas patologias humanas. A sinalização Notch pode estar envolvida na regulação do comportamento tumoral em diversos aspectos. O resultado da alteração desta via depende da sua função num dado tecido. Notch pode actuar como um oncogene, se a sua função normal for a de manter um estado indiferenciado, induzindo as células a reterem características de células estaminais. Por outro lado, Notch pode actuar como supressor tumoral em tecidos no qual a sua sinalização inicia eventos de diferenciação terminal³⁵.

A evidência de que Notch poderia estar envolvido no desenvolvimento de tumores epiteliais resultou de um estudo onde se verificou uma activação anormal de Notch-4

associada à integração por MMTV no gene *N4*³⁶. Mais recentemente, observou-se que níveis elevados de expressão de Notch-1 e do seu ligando Jagged-1 se encontram associados com mau prognóstico tanto em cancro da mama^{37, 38} como da próstata^{39, 40}. Na tumorigénese intestinal, verificou-se uma associação entre a sobreexpressão de Jagged-1 mediada pela via Wnt com uma activação da via Notch^{41, 42}. Notch-1, Notch-2 e alguns ligandos Notch encontram-se altamente expressos em cancro do pâncreas, resultando numa sobreexpressão de *Hes-1*⁴³.

Evidências de que o papel de Notch não é exclusivamente oncogénico mas também supressor de tumor, resultaram de estudos em pele. Na epiderme humana normal diferenciada, a sinalização Notch encontra-se activa e funciona de modo a promover a diferenciação. Neste sistema, o papel supressor de tumor de Notch-1 pode ser mediado por diversas vias que induzem diferenciação e paragem do ciclo celular. Consistente com isto, carcinomas de células basais e pavimentosas cutâneas mostram uma redução da expressão de Notch-1, Notch-2 e Jagged-1⁴⁴. Um papel supressor de tumor para o receptor Notch-1 foi encontrado em linhas celulares de carcinoma do fígado⁴⁵ assim como em cancro da tiróide⁴⁶.

5) Galectina-3 e Notch no cancro gástrico

Embora vários estudos demonstrem a importância de galectina-3 e de Notch em diversos tipos de cancro, a função destas duas proteínas no cancro gástrico não se encontra totalmente esclarecida. Uma redução na expressão de galectina-3 assim como mudanças na sua distribuição celular têm sido associadas com a progressão tumoral gástrica⁴⁷. Em relação ao receptor Notch-1, este possui um papel importante na viabilidade celular assim como na diferenciação celular, tendo sido descrita uma função essencial na diferenciação do tracto gastrointestinal⁴⁸. Na mucosa gástrica normal foi descrita a expressão dos receptores Notch-1, -2 e -3, assim como do gene alvo *Hes-1*^{49, 50}.

Na progressão do cancro gástrico o papel da via Notch encontra-se pouco estudado. Muito recentemente observou-se, *in vitro*, que uma sobreexpressão do receptor Notch-1, ligado ao aumento da expressão de Hey-1, se encontra relacionado com a supressão de apoptose mediada por TNF- α ⁵¹ e que, a sobreexpressão de Jagged-1, associada à activação de Notch-1 também foi relacionada à progressão tumoral gástrica através da expressão de COX-2⁵².

6) Possível inter-relação entre Galectina-3 e Notch

Encontramos na literatura manifestações diferentes para as proteínas galectina-3 e o receptor Notch-1 em diversos tipos de cancro. Diversas evidências apontam para uma expressão antagónica entre estas duas proteínas. Notavelmente, em tumores onde Notch actua como oncogene, tumores da mama^{37, 38}, prostata³⁹, colorectal^{41, 42} e pâncreas⁴³, pode-se encontrar-se uma diminuição na expressão de galectina-3, associada à progressão tumoral. Por outro lado, associada à função supressora de tumor de Notch em diversos tumores como da pele⁴⁴, fígado⁴⁵, ou tiróide⁴⁶, é encontrada uma sobreexpressão de galectina-3.

Existe portanto a possibilidade da expressão de uma proteína modular directa ou indirectamente a expressão da outra. Galectina-3 reconhece diversos glicanos presentes em glicoproteínas de membrana. A adição de uma galactose- β 1-4 a uma N-acetilglucosamina a O-glicanos encontrados no domínio extracelular de Notch, torna este receptor alvo de reconhecimento pelo CRD de lectinas que reconhecem β -galactosídeos, como as galectinas. Além disso, embora não tenha sido demonstrado que glicanos N-ligados sejam importantes para a activação da via Notch, não se exclui a hipótese que estes glicanos cooperem em mecanismos regulatórios através da interacção com proteínas que reconhecem carboidratos.

Neste trabalho procurou-se caracterizar a relação entre a expressão destas duas proteínas e possível interacção, em linhas celulares de carcinoma gástrico e, em tecido tumoral gástrico.

Objectivo Geral

Sabe-se que Notch e galectina-3 são expressos antagonicamente em diversos tipos de cancro. Assim, este trabalho teve como principal objectivo investigar uma possível inter-relação das moléculas da via Notch com a galectina-3 e suas consequências sobre a progressão tumoral gástrica.

Objectivos específicos

- 1) Avaliar o papel de galectina-3 na activação da via de sinalização Notch em linhas de carcinoma gástrico AGS e MKN45;
- 2) Avaliar uma possível interacção directa entre o receptor Notch-1 e galectina-3 em linhas de carcinoma gástrico AGS e MKN45;
- 3) Avaliar se existe alguma correlação entre a expressão de galectina-3 e o receptor Notch-1 em tecido tumoral gástrico.

Material e métodos

Linhas celulares

As linhas celulares gástricas AGS MKN45 foram obtidas de *American Type Culture Collection (ATCC)* e *JCRB Cell Bank* respectivamente. Foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640-Gluta-MAX (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), com soro bovino fetal a uma concentração de 10% e gentamicina (50 µg/mL).

Inibição de galectina-3 nas células AGS

Para inibir a expressão de galectina-3, foram usadas sequências dsRNA de 27 nucleótidos, quimicamente sintetizadas e substratos da Dicer, contendo como alvo a galectina-3. Também foi incluído neste ensaio, um controlo universal dsRNA “non-silencing” de 27 nucleótidos (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA).

Numa placa de 100 mm Ø, foram plaqueadas 6×10^6 células AGS e MKN45 e procedeu-se à transfecção das células com 10 nM de um duplex de dsRNA de 27 nucleotidos substrato da Dicer (Integrated DNA Technologies) contendo como alvo a galectina-3, usando lipofectamina-2000 (**Invitrogen** Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Ao fim de 48h pós-transfecção, as células foram tripsinizadas e plaquedas em placas de 6 poços (6×10^5 células/poço) onde previamente foram imobilizados ligandos Delta-4 e Jagged-1 numa concentração de µg/mL (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). As células foram recolhidas ao fim de 6 horas de estímulo. Cada ensaio, para dsRNA contendo como alvo galectina-3 e scramble, foi realizado em duplicado para extracção de RNA e proteína.

Para se proceder à escolha do melhor duplex para inibir galectina-3 assim como para controlar a eficiência de transfecção, procedeu-se à transfecção das células com os 3 duplexes/duplex marcado com Cy3TM, com descrito acima, e análise por pcr em tempo real/citometria de fluxo.

Extracção de RNA

Para cada poço de uma placa de 6 poços, depois de obter um *pellet* de células, este foi ressuspendido em 500 µL TRI Reagent e processado de acordo com o descrito pelo fabricante (Sigma – St Louis, MO, EUA). O RNA obtido foi diluído em água desionizada autoclavada e congelado a -80 °C.

Extracção proteica

Para cada poço de uma placa de 6 poços, depois de obter um *pellet* de células, este foi ressuscitado em 200 µL de tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxicolato de sódio e 0,1% de SDS) e de um cocktail de inibidores de proteases Complete (Roche, Indianapolis, IN, USA) e 2 µL de Na₂VO₄ (100 mM). Mantiveram-se as amostras sob agitação durante 30 min a 4 °C e centrifugaram-se a 12.000 g durante 20 min. Recolheu-se o sobrenadante e quantificou-se através do kit de ensaio de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL, USA).

Transcrição reversa

O cDNA foi obtido partindo de 5 µg de RNA total num volume final de 20 µL. A linearização do RNA ocorreu durante 10 min a 65 °C na presença de “random primers” (100 ng/µL) (Invitrogen) e água desionizada e autoclavada num volume final de 11 µL. Após este passo, colocou-se no mesmo tubo de pcr, 4 µL de buffer 5X, 2 µL de DTT (0,1 M), 2,1 µL de dNTPs (dATP + dCTP + dGTP + dTTP, 10 mM), 0,5 µL de RNase OUT (40 U/µL) (Invitrogen) e 0,5 µL de transcriptase reversa Superscript II (200 U/µL) (Invitrogen), submetendo a mistura a 40 °C (60 min) para a conversão a cDNA. A inactivação da enzima foi realizada a 70 °C (10 min) e o cDNA guardado a -20 °C.

PCR em tempo real

Para a amplificação de cada amostra utilizaram-se, 1 µL de cDNA, 10 µL de SYBR Green (Applied Biosystems), 1 µL de primers forward/reverse específicos (10 µM), e 7 µL de água desionizada e autoclavada, obtendo-se um volume final de 20 µL, sendo realizado num medidor de fluorescência ABI Prism 7000. Os níveis de GAPDH foram usados para a normalização das amostras e a quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi usada para analisar as mudanças de expressão genica. Os resultados apresentados, foram realizados em duplicado e são expressos como a média e o desvio padrão associado.

Sequência de primers usados:

GAPDH:

Primer *reverse*: TCTGCTCCTCCTGTTCGACA

Primer *forward*: CCGTTGACTCCGACCTTCAC

Galectina-3:

Primer *reverse*: CGCATGCTGATAACAATTCTGG

Primer *forward*: CGTGGGTAAAGTGGGAAGGC

Notch-1:

Primer *reverse*: GGCACGTGTATTGACGACGT

Primer *forward*: CAGGAGAAGCTTCATAGTCCTCG

Western Blot

A cada lisado celular (30 µg), adicionou-se *sample buffer* 4x (50% 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 (BioRad), 46% glicerol 87% (Merck), 9,2 % SDS (National Diagnostics), 0,05% de azul de bromofenol 0,25% p/v e 0,05% de β-mercaptoetanol (Sigma)) e água para um volume final de 25 µL. As amostras foram fervidas a 95°C durante 5 min e aplicadas em gel SDS - PAGE (gel *stacking* a 4% e gel *resolving* a 12%). A corrida foi realizada a 125 V, seguindo-se a transferência para uma membrana de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare). A membrana foi bloqueada com uma solução de 5% de leite magro (Molico) em tampão PBS-Tween 0,01% (Sigma) durante 1 hora sob agitação. Após bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico durante 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C, seguindo-se a lavagem com PBS-T 3x durante 5 min, e incubação com anticorpo secundário durante 1 hora à temperatura ambiente. Realizaram-se novas lavagens com PBS-T 3x durante 5 min sucedendo-se a incubação da membrana com ECL (GE Healthcare) durante 5 min e posterior revelação.

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes: anti-galectina-3 (M3/38, sobrenadante de hibridoma), anti-actina (I-19-r, Santa Cruz), anti-NICD (C20-r, Santa Cruz).

Imunoprecipitação

Em gelo, juntaram-se 500 µg de extracto celular com 50 µL anticorpo anti-galectina-3 (M3/38) ou 2 µg de anticorpo anti-NICD (C20-r), num eppendorf, completando, com o tampão de lise RIPA e o cocktail de inibidores de proteases (Roche), para um volume final de 500 µL, e incubaram-se as amostras sob agitação a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, adicionaram-se 100 µL de *beads* conjugadas com proteína G (Sigma) a cada amostra e incubou-se a 4 °C, sob agitação, durante 4 horas. A seguir ao tempo de incubação, lavaram-se as *beads* e adicionou-se 50 µL de *sample buffer* 4x para posteriormente ser aplicado em gel SDS-PAGE.

Citometria de fluxo

Células AGS ou MKN45 (1×10^6) foram recolhidas para um tubo e incubadas com soro de burro (DAKO) diluído 1:10 em BSA 1% PBS durante 15-30 min. Após este passo, as células foram incubadas com anticorpo 1º anti-gal-3 (M3/38) e secundário burro anti-rato conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen), durante 45 min em BSA 1% PBS durante 45 min. Após este passo, as células foram fixadas numa solução de formaldeído 37% (Sigma) diluído em PBS numa proporção de 1:10, e analisadas num citómetro de fluxo. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Flow Jo (Flow Jo- Flow cytometry analysis software - Ashland, OR, EUA).

Imunofluorescência

As células AGS e MKN45 foram tripsinizadas, plaqueadas em lamelas (1×10^4 células por lamela) e mantidas numa estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24h. As células foram lavadas em PBS e incubadas com soro de burro (DAKO) durante 15-30 min. De seguida procedeu-se à incubação das células com o anticorpo monoclonal anti-galectina-3 (M3/38) e, posteriormente, com anticorpo secundário de burro anti-rato conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Após a incubação as células foram lavadas e montadas em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories). As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Eclipse e800 (Nikon). As imagens foram adquiridas num aumento de 40x e com o auxílio da câmara digital Nikon DXM 1200 (Nikon). O mesmo processo foi realizado para as células AGS após 48h de inibição de gal-3.

Imunohistoquímica

No presente estudo foram usadas 14 amostras parafinadas de carcinoma gástrico (CG) e mucosas adjacentes com presença de Metaplasia Intestinal (MI), classificadas de acordo com o descrito na Tabela I. As amostras provêm de indivíduos gastrectomizados, disponibilizadas pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S. João do Porto, tendo a recolha das mesmas sido efectuada entre os anos de 1989 e 1990. Inicialmente, os tecidos foram desparafinados e hidratados com xilol e uma concentração decrescente de álcoois, respectivamente. Após recuperação antigénica, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena (10 min) com uma solução de H₂O₂ a 10% em metanol. As lâminas foram incubadas com soro normal de coelho ou burro (DAKO) e depois com anticorpo anti-galectina-3 (M3/38, sobrenadante de hibridoma) ou anti-NICD de Notch-1 (C20, Santa Cruz)

em BSA 5%/PBS, durante 1 hora à T°C ambiente. De seguida as lâminas foram lavadas e incubadas com o anticorpo 2º burro anti-rato-HRP (Gal-3) (Jackson IR) ou coelho anti-burro-biotina (NICD de Notch-1) (DAKO), durante 30 min. As lâminas a serem reveladas para NICD de Notch-1, um passo adicional com incubação com o complexo Avidina-Biotina-HRP (Vector) foi realizado. Após revelação com uma solução de DAB (3,3'-diaminobenzidina), as lâminas foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas e montadas em entellan (Merck).

Para a quantificação da expressão de galectina-3 e o receptor Notch-1, a intensidade da marcação foi: positiva + foi para a imunorreatividade discreta, se imperceptível; ++ foi para a imunorreatividade de discreta a moderada; +++ foi para aqueles com imunorreatividade moderada e; ++++ foi para aqueles com imunorreatividade forte e completa. Em todas as situações, a imunoreatividade estava presente em mais de 90% das células tumorais.

Resultados

1) A activação de Notch-1 é inversamente correlacionada com a expressão de galectina-3

Tendo em conta os diferentes papéis de gal-3 e da via de sinalização Notch na progressão tumoral, procurou-se caracterizar a relação entre a expressão destas duas proteínas em dois modelos de carcinoma gástrico, as linhas celulares AGS e MKN45.

Inicialmente, por PCR em tempo real, procedeu-se à avaliação da expressão génica de gal-3 e do receptor Notch-1 nas linhas AGS e MKN45, figura 2. A linha AGS possui maior quantidade de RNAm para gal-3 comparativamente à linha MKN45, figura 2A, pelo contrário, observa-se uma maior expressão de Notch-1 na linha MKN45 relativamente à linha celular AGS, figura 2B. A expressão destas duas proteínas também foi analisada através da técnica de *western blot*, figura 2C. Pela análise desta figura confirma-se o resultado obtido anteriormente, no qual a linha AGS apresenta uma maior quantidade de gal-3 em relação à linha MKN45. O anticorpo usado para identificar o receptor Notch-1, reconhece o domínio intracelular (NICD), que é clivado após activação e migra para o núcleo. Desta forma, pela análise proteica de NICD pode-se observar, na linha AGS, que esta via de sinalização encontra-se menos activa em relação à linha MKN45.

Estes dados evidenciam que as quantidades de gal-3 e do receptor Notch-1 se encontram inversamente relacionados nestes dois modelos.

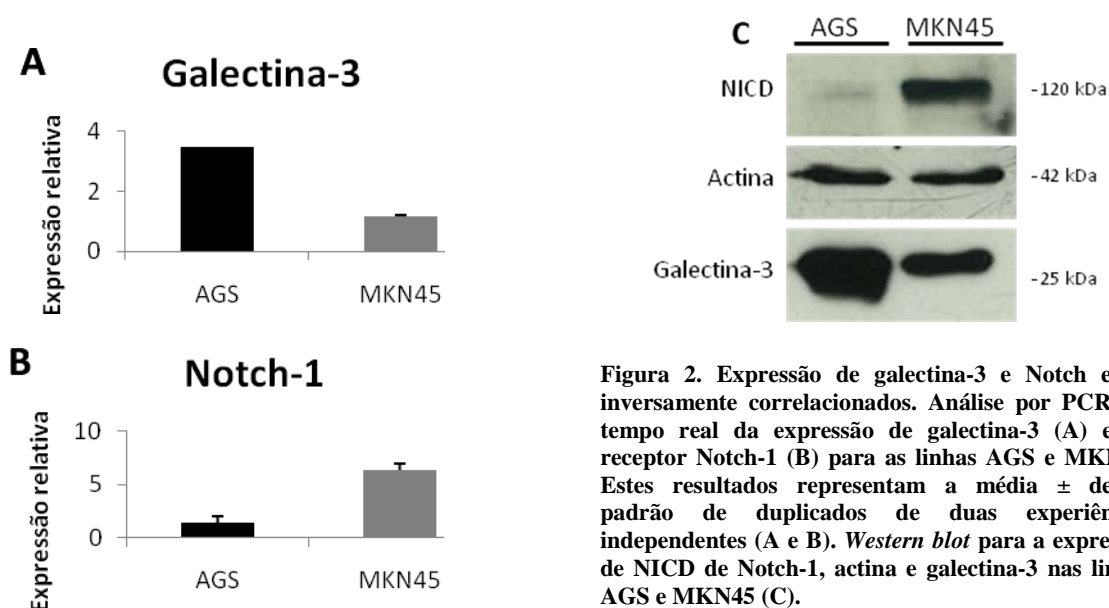


Figura 2. Expressão de galectina-3 e Notch estão inversamente correlacionados. Análise por PCR em tempo real da expressão de galectina-3 (A) e do receptor Notch-1 (B) para as linhas AGS e MKN45. Estes resultados representam a média \pm desvio padrão de duplicados de duas experiências independentes (A e B). *Western blot* para a expressão de NICD de Notch-1, actina e galectina-3 nas linhas AGS e MKN45 (C).

2) Galectina-3 localiza-se preferencialmente na membrana plasmática das linhas celulares gástricas AGS e MKN45

Verificou-se que a galectina-3 é expressa tanto nas células AGS como nas MKN45, contudo, a sua localização sub-celular nestas células não foi ainda investigada. Tendo em conta que o papel de gal-3 depende da sua localização, avaliou-se a distribuição desta lectina nas diferentes linhas por imunofluorescência. Como se pode observar pela análise da figura 3A, alusiva à linha celular AGS, gal-3 encontra-se maioritariamente na superfície celular. Nas células MKN45, figura 3B, a localização celular de gal-3 concentra-se sobretudo no citoplasma, podendo ser no entanto encontrada, em menor quantidade, na superfície da célula.

A expressão de gal-3 na superfície celular para as células AGS e MKN45 também foi analisada por citometria de fluxo figura 4. As células AGS apresentam uma maior quantidade de gal-3 na superfície das células comparativamente às células MKN45, confirmando os resultados observados por imunofluorescência figura 3.

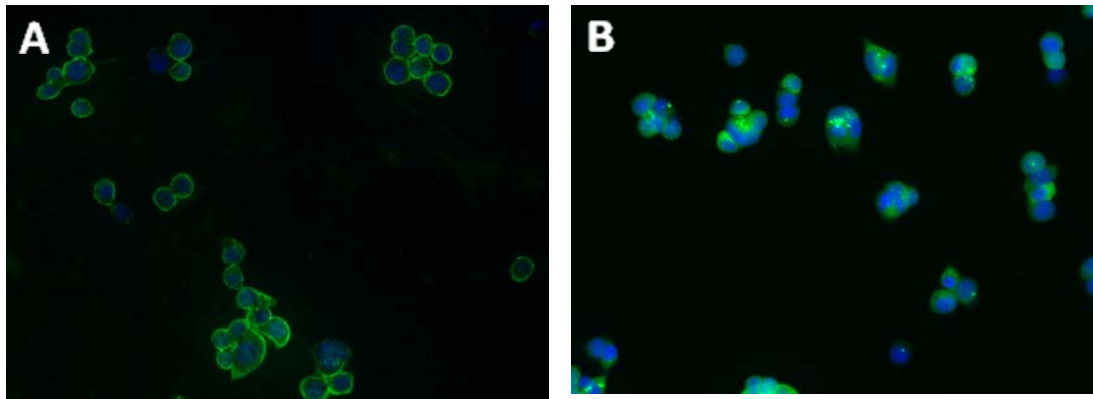


Figura3. Galectina-3 possui a mesma localização do receptor Notch-1. Células AGS e MKN45 (1×10^4) foram cultivadas em lamelas e incubadas com um anticorpo anti-gal-3 (M3/38). Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo secundário de coelho anti-rato conjugado a FITC e os núcleos corados com DAPI. Na imunofluorescência, podemos observar a verde galectina-3 e a azul os núcleos.

Estes resultados sugerem que a localização de galectina-3 na superfície da célula, a mesma do receptor Notch, pode favorecer a interação entre estas duas proteínas e, seja responsável pela menor expressão deste receptor.

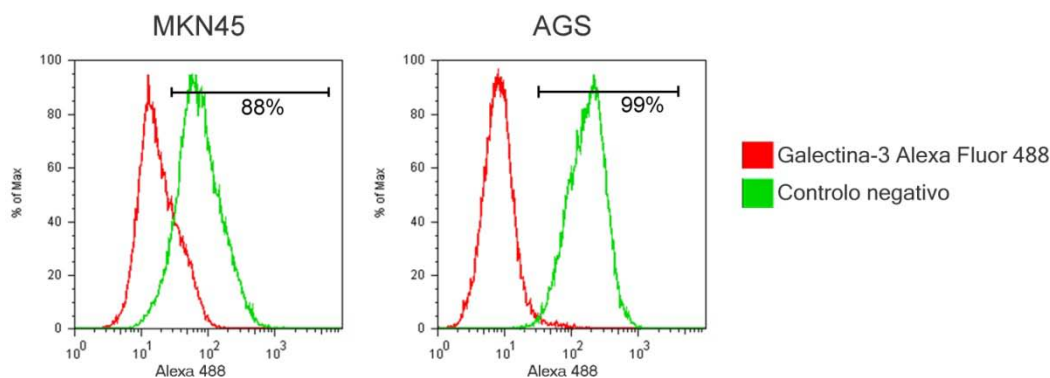


Figura 4. A linha celular AGS possui mais galectina-3 na superfície celular que MKN45. As células AGS e MKN45 (1×10^6) foram recolhidas e incubadas com o anticorpo anti-gal-3 (M3/38) e, posteriormente com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488. Após este passo, as células foram fixadas numa solução de formaldeído e analisadas por citometria de fluxo. A verde observa-se a expressão de galectina-3 e, a vermelho, o controlo negativo.

3) Galectina-3 modula negativamente a via de sinalização Notch

3.1) Inibição de galectina-3

Com o objectivo de esclarecer a influência da gal-3 na via de sinalização Notch, procedeu-se à inibição de gal-3, por dsRNA, nas linhas celulares AGS e MKN45. Desta forma, utilizou-se sequências dsRNA de 27 nucleótidos, quimicamente sintetizadas e substratos da Dicer, contendo como alvo gal-3. Também foi incluído neste ensaio, um controlo universal *scrambled, non-silencing* de 27 nucleótidos. Para se proceder à escolha do melhor duplex para inibir gal-3 assim como para controlar a eficiência de transfecção, procedeu-se à transfecção das células AGS com 3 duplexes que possuíam como alvo gal-3 e um duplex marcado com Cy3TM, respectivamente. Relativamente à eficiência de transfecção, esta foi avaliada através de citometria de fluxo onde se pode observar que cerca de 99% de células foram transfectadas com sucesso com o duplex marcado com Cy3TM, relativamente às células que apenas foram tratadas com lipofectamina, figura 5A. A inibição de gal-3 foi avaliada por PCR em tempo real, figura 5B, onde se observou uma inibição de mais de 90% para os duplexes 1 e 2 e de cerca de 50% para o duplex 3, relativamente às células controlo (sc). Os duplexes 1 e 2 foram desta forma os escolhidos para se proceder a posteriores estudos de inibição de gal-3.

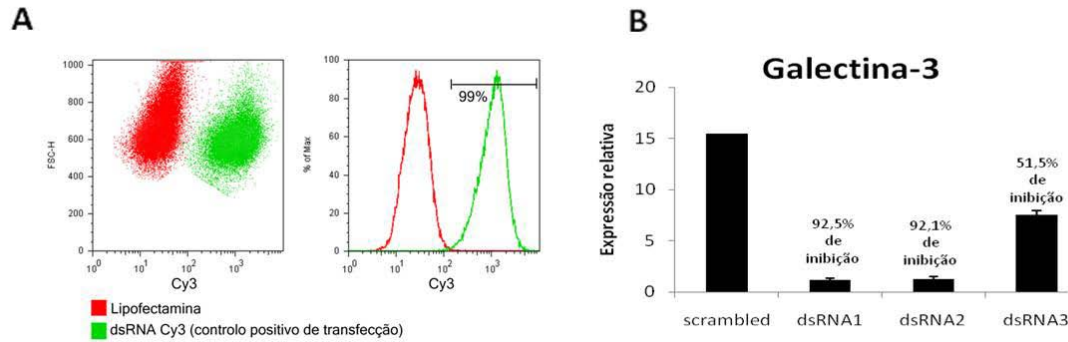


Figura 1. A inibição de galectina-3 ocorreu de forma eficiente na linha AGS. Células AGS (1×10^6) transfectadas com o duplex de dsRNA Cy3TM foram recolhidas após 48h de transfecção e fixadas numa solução de formaldeído. Após este passo, as células transfectadas ou não (controlo) foram analisadas por citometria de fluxo (A). A verde observamos células transfectadas com dsRNA Cy3TM e a vermelho, células onde apenas lhes foi adicionado lipofectamina. (B) As células AGS foram transfectadas com 3 diferentes duplexes de dsRNA (que possuem como alvo a galectina-3) e scramble. Na figura observa-se a expressão génica de galectina-3 após 48 h de transfecção.

No prosseguimento deste estudo, avaliou-se se a distribuição de gal-3 permaneceria inalterada após o processo de transfecção nas células AGS. Desta forma, estas células foram transfectadas com o duplex 1 ou *scramble* e a expressão de gal-3 foi analisada por imunofluorescência. Na figura 6A, pode-se observar que nas células transfectadas com *scramble*, gal-3 apresenta a mesma distribuição celular observada nas células AGS nativas, figura 3A, sendo encontrada maioritariamente na superfície celular. Também se pode verificar que as células transfectadas com dsRNA para gal-3, figura 6B, apresentaram uma drástica redução de marcação para esta lectina.

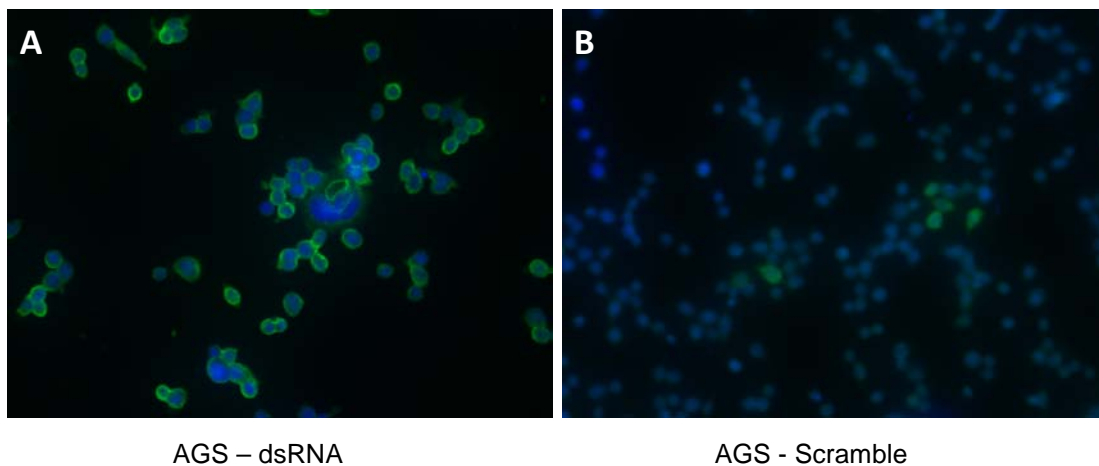


Figura 6. Transfecção com *scramble* não afecta localização celular de galectina-3. Células AGS (1×10^4) nas quais galectina-3 foi previamente inibida (A) ou não (B), foram plaqueadas em lamelas e incubadas com anticorpo anti-gal-3 (M3/38). De seguida incubaram-se as células com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488. Por microscopia de fluorescência visualizamos a verde galectina-3 e a azul, núcleos corados com DAPI.

Desta forma prosseguiram-se os estudos de inibição de gal-3 sabendo que a distribuição celular de gal-3 permanece inalterada após o processo de transfecção.

3.2) A inibição de galectina-3 leva a um aumento da transcrição do receptor Notch-1

Após se proceder à inibição de gal-3 na linha celular AGS, a via Notch foi submetida a um estímulo por parte do ligando Jagged-1 imobilizado. Este ligando é encontrado sobreexpresso em diversos tipos de cancro estando associado ao aumento da progressão tumoral gástrica. Após estímulo, a expressão génica do receptor Notch-1, assim como de gal-3, foram analisadas por PCR em tempo real. Pela análise da figura 7A, observa-se que o estímulo pelo ligando Jagged-1 levou a um aumento da expressão do receptor Notch-1 nas células controlo. Já as células nas quais a gal-3 foi inibida, mesmo na ausência de estímulo, apresentam por si só uma maior expressão do receptor Notch-1, comparativamente às células controlo. E, após o estímulo, as células que tiveram a gal-3 inibida apresentaram um aumento mais substancial da expressão do receptor Notch-1, comparativamente às células controlo. Além do mais, pela análise da figura 7B podemos observar que a inibição de gal-3 ocorreu de forma eficiente e, quando submetidas a estímulo por Jagged-1, a expressão de gal-3 é induzida nas células controlo.

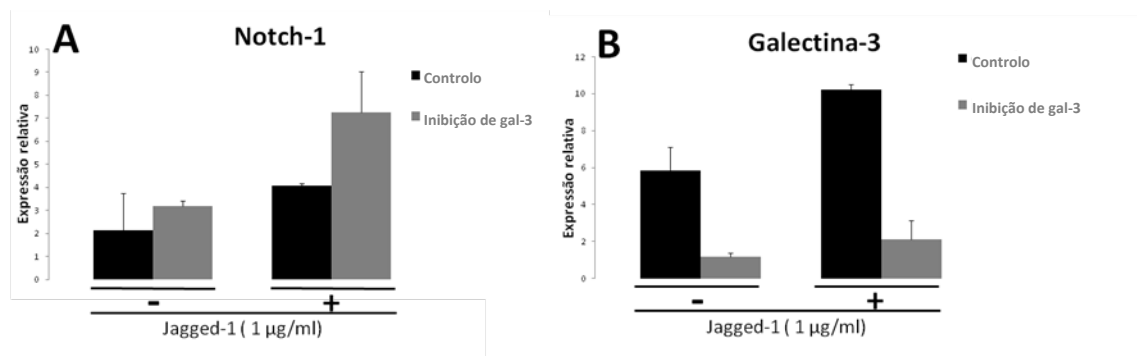


Figura 7. Inibição de galectina-3 traduz-se num aumento de receptor Notch-1. Após 48 h de inibição de galectina-3 ou não (controlo) nas células AGS, estas foram tripsinizadas e plaqueadas numa placa de 6 poços contendo Jagged-1 imobilizado. Após 6 h de estímulo, extraiu-se RNA e analisou-se a expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1 por PCR em tempo real. (A) Expressão do receptor Notch-1 e galectina-3 (B) na linha celular AGS das células controlo (preto) e, onde se inibiu Gal-3 (cinzento), que foram ou não estimuladas por Jagged-1. Estes resultados representam a média \pm desvio padrão de duplicados de duas experiências independentes.

Estes resultados sugerem que existe uma correlação inversa entre a expressão de gal-3 e a expressão do receptor Notch-1 e, a presença de gal-3 aparenta influenciar negativamente a expressão do receptor Notch-1

3.3) A inibição de galectina-3 leva a um aumento da activação da via Notch

Observou-se que a inibição de gal-3 está associado a um aumento do receptor Notch-1. Deste modo, pretendeu-se averiguar se o aumento do receptor Notch-1 estaria associado a um aumento de NICD (resultado da clivagem do receptor Notch) e consequentemente, a um aumento da activação da via Notch.

Pela análise da figura 8A, na linha AGS, observa-se um aumento de NICD (120 kDa), resultado da clivagem do receptor Notch, quando as células são sujeitas à inibição de galectina-3.

Alguns genes da família *Hes* e *Hey* são expressos como resultado directo da sinalização Notch dependente de ligandos. Desta forma, a expressão dos genes *Hes-1*, *Hes-5* e *Hey-1*, foram analisados por PCR em tempo real nas células AGS com/sem inibição de gal-3 e, na presença/ausência de estímulo pelo ligando Jagged-1.

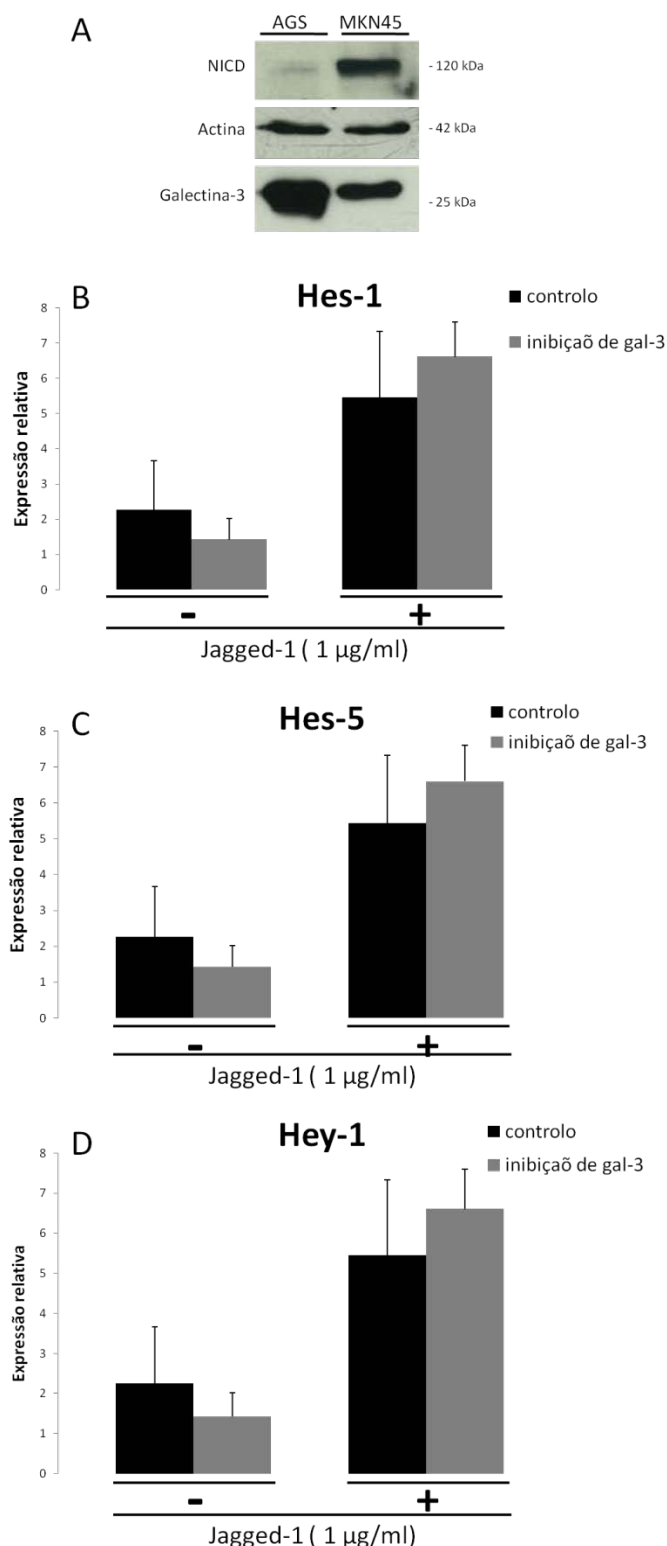


Figura 8. Inibição de galectina-3 leva ao aumento da activação da via Notch. (A), Após 48 h de inibição ou não de galectina-3, os extractos das células AGS foram resolvidos por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (I-19-r) e anti-NICD de Notch-1 (C-20-r). (B-D) Depois de 48 h de inibição ou não de gal-3, as células AGS foram sujeitas a estímulo com o ligando Jagged-1 imobilizado. Ao fim de 6 h de estímulo, procedeu-se à análise da expressão génica de *Hes-1*, *Hes-5* e *Hey-1* por PCR em tempo real (B, C e D respectivamente). Os resultados B, C e D representam a média \pm desvio padrão de duplicados de duas experiências independentes.

Pela observação da figura 8, verifica-se que, na ausência de gal-3, as células tornam-se mais susceptíveis ao estímulo por Jagged-1, o que resultou num aumento da expressão dos genes *Hes-1* (8B), *Hes-5* (8C), e *Hey-1* (8D), estudados em comparação às células que não sofreram inibição de gal-3. Os dados relativamente à análise expressão génica dos genes *Hey* e *Hes*, corroboram a hipótese de que galectina-3 regula negativamente a via de sinalização Notch.

Alem disso, procedeu-se à inibição de gal-3 nas células MKN45 seguida pelo estímulo com os ligandos Delta-4 e Jagged-1 imobilizados e, observou-se a expressão de NICD por *western blot*. Nesta linha celular, tal como observado anteriormente para AGS, a inibição de gal-3 por si só traduz-se num aumento de activação da via, e consequente aumento de NICD, figura 9. Após estímulo com os ligandos Jagged-1 e Delta-4, a activação da via Notch nas células MKN45 torna-se mais evidente nas células onde a expressão génica de gal-3 foi previamente inibida sendo o estímulo pelo ligando Jagged-1 que mais activa esta via, nestas células figura 9.

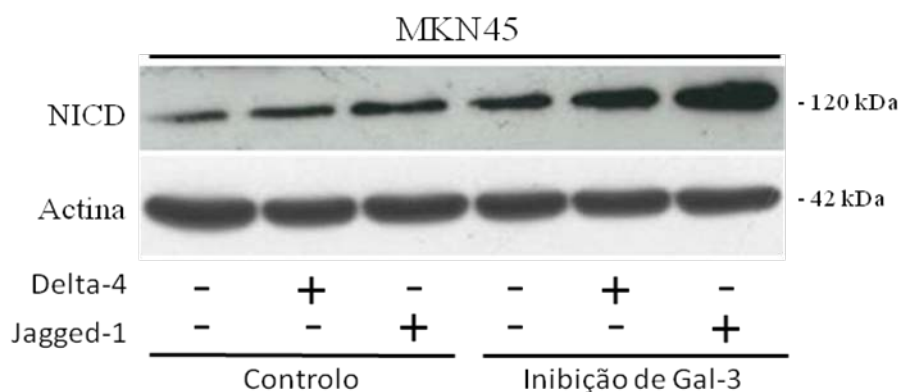


Figura 9. Galectina-3 modula negativamente clivagem de NICD. Após 48 h de inibição ou não de galectina-3, as células MKN45 foram submetidas a 6h de estímulo pelos ligandos Jagged-1 e Delta-4. Decorrido esse período, os extractos das células foram resolvidos por *SDS-PAGE* e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo anti-gal-3 (M3/38), anti-actina (I-19-r) e anti-NICD de Notch-1 (C-20-r).

4) Galectina-3 interage com o receptor Notch-1

Com a finalidade de averiguar se a influência de gal-3 sobre a via de sinalização Notch poderia dever-se à interacção directa desta lectina com o receptor Notch, procedeu-se à imunoprecipitação dos extractos celulares das linhas AGS e MKN45 com o anticorpo anti-galectina-3 (M3/38). O material resultante da imunoprecipitação foi revelado com o anticorpo anti-Notch-1 e anti-gal-3 por *western blot*.

Pela análise da figura 10, podemos observar que o receptor Notch-1, receptor inteiro incluindo a porção extracelular glicosilada, com cerca de 300 kDa, co-imunoprecipita com

gal-3. Existe portanto, a possibilidade da modulação da activação da via Notch pela gal-3 ser dependente da interacção física entre estas duas proteínas.

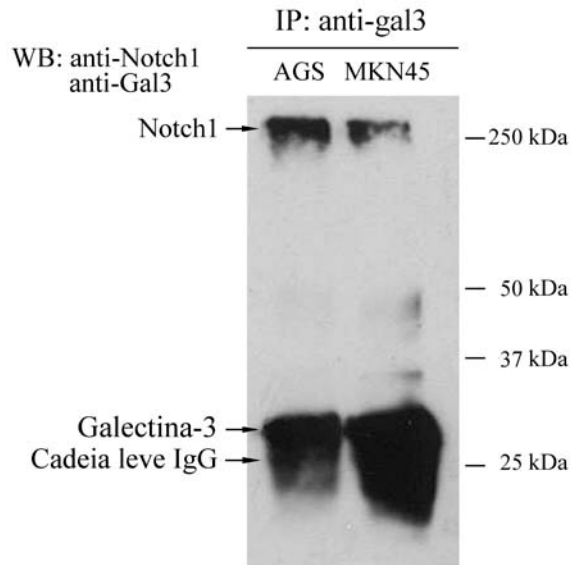


Figura 10. O receptor Notch-1 interage com galectina-3. Extracto celular das linhas AGS e MKN45 foram incubados com anticorpo anti-gal-3 (M3/38). O imunoprecipitado resultante foi resolvido por *SDS-PAGE*, transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi revelada com os anticorpos anti-gal-3 (M3/38) e anti-NICD de Notch-1 (C-20-r).

5) Galectina-3 e a expressão do receptor Notch-1 encontram-se inversamente correlacionadas em tecido tumoral gástrico

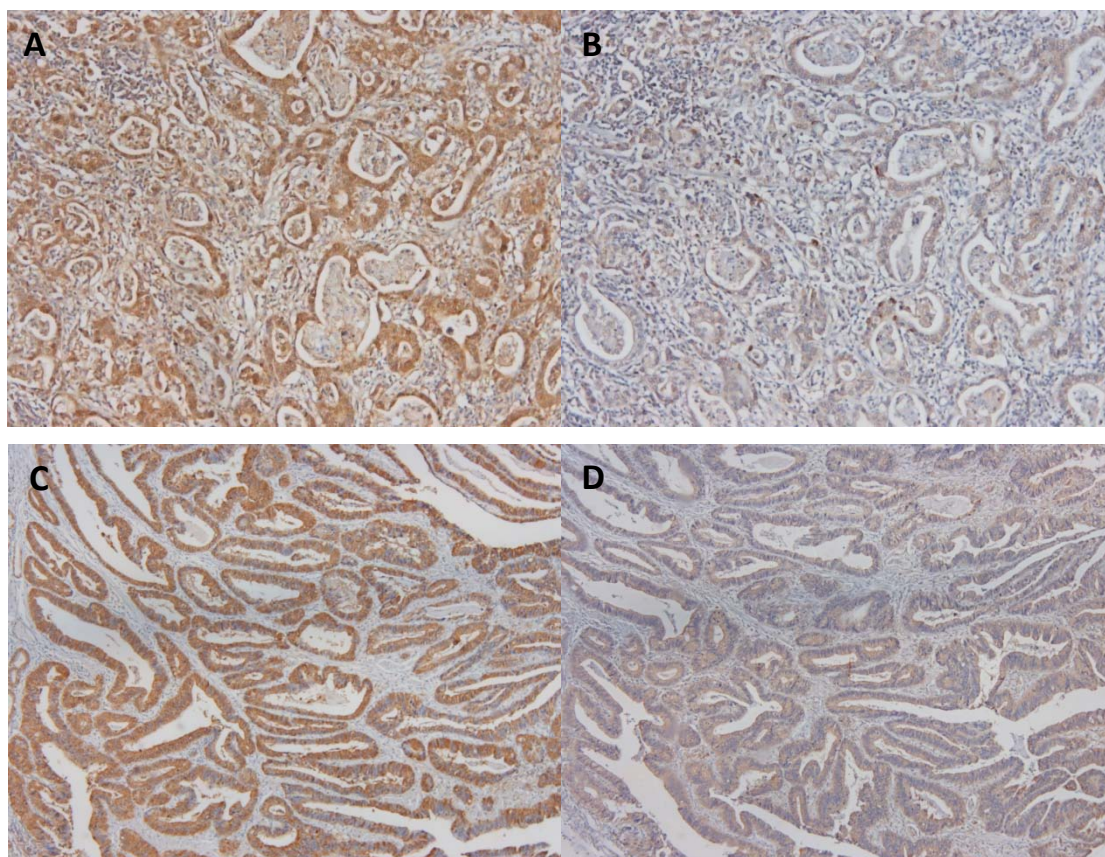
Ao longo deste trabalho foram demonstradas evidências de que galectina-3 modula negativamente a via de sinalização Notch, em linhas celulares gástricas. Pretendeu-se também averiguar se, em tecido tumoral gástrico, a correlação inversa entre a expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1 se manteria. Desta forma, e recorrendo à técnica de imunohistoquímica, analisou-se a expressão de gal-3 e do receptor Notch-1 em tecido tumoral gástrico.

14 casos de carcinoma gástrico foram analisados e classificados como indicado na tabela 1 segundo o grau de intensidade de marcação. Dos 12 casos de carcinoma do tipo intestinal estudados, encontramos uma elevada intensidade de marcação para a expressão de galectina-3 em nove, classificada na sua maioria como (++++). Neste mesmo tipo de tumor, e para os mesmos casos, a marcação para o receptor Notch-1 apresenta-se com menor intensidade (Tabela 1). As figuras 11A, B, C, D, E e F ilustram este exemplos no qual encontramos este tipo de correlação inversa entre a expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1. Em 3 casos estudados de carcinoma de tipo intestinal, observamos que a intensidade de marcação da expressão de galectina-3 é mais fraca (+ e ++, Tabela 1 e figura 11G), sendo que um destes casos está associado a uma maior intensidade de marcação para o receptor

Notch-1 (++++), (Tabela 1 e figura 11H). Em alguns casos estudados foi encontrada mucosa normal adjacente ao tumor. Como podemos observar pela figura 11I, a expressão de gal-3 no tumor é maior que na mucosa normal. Pelo contrário, a expressão do receptor Notch-1 no tumor parece diminuir em relação à mucosa normal, figura 11J, encontrando-se desta mesma forma, uma relação inversa entre gal-3 e o receptor Notch-1.

Tabela 1. Casos de carcinoma gástrico classificados segundo a intensidade de marcação pra os anticorpos anti-gal-3 e anti-Notch-1.

	nº total de casos	Intensidade de marcação Galectina-3				Intensidade de marcação Notch-1			
		+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
Intestinal	3				3	3			
	2				2	2			
	1				1			1	
	3			3		3			
	1		1			1			
	1		1						1
	1	1				1			
Difuso	1	1				1			
	1		1					1	



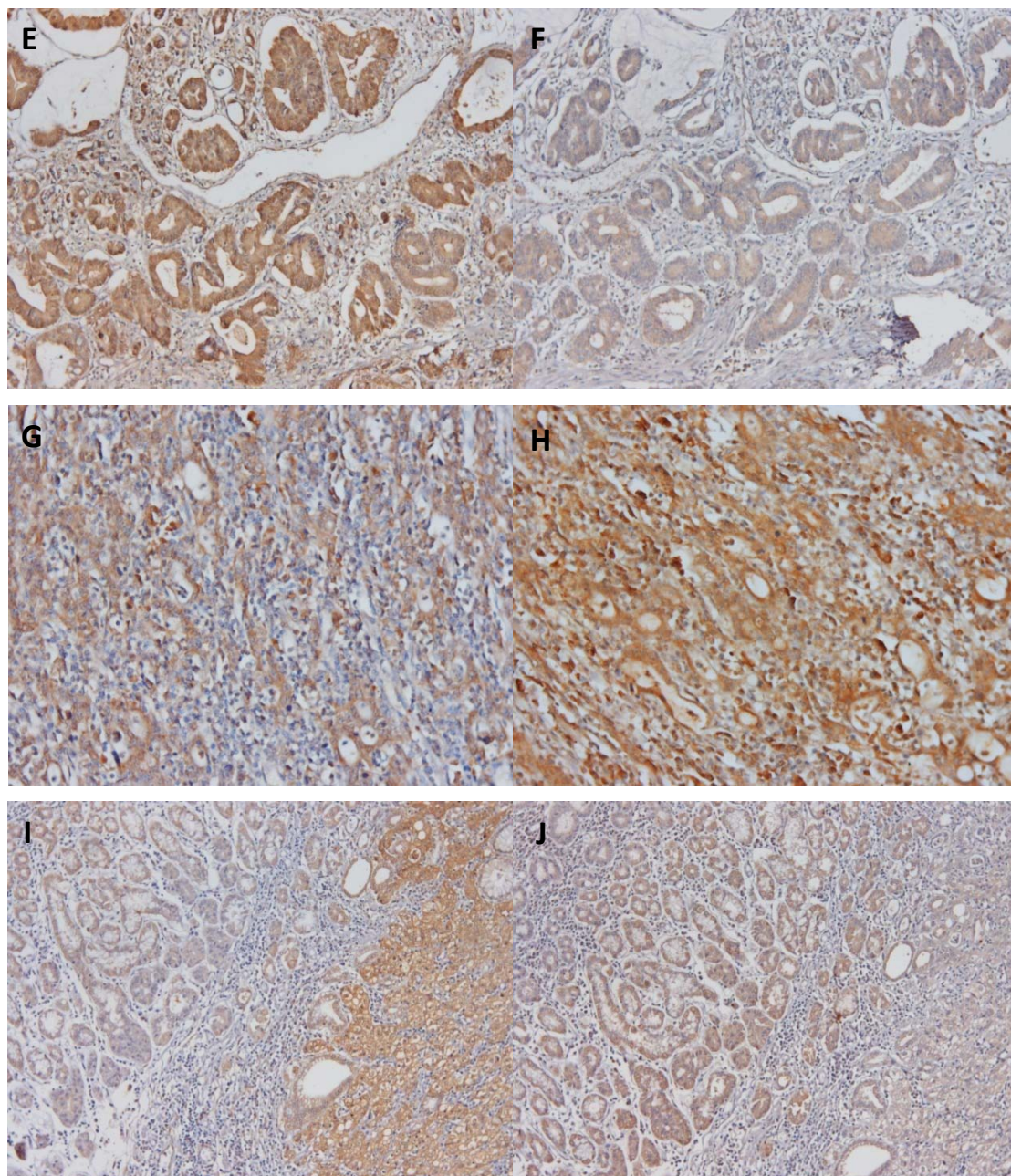


Figura 11. Galectina-3 e o receptor Notch-1 encontram-se inversamente correlacionados em tecidos tumorais gástricos. (A, C, E e I) representam uma maior marcação para galectina-3, e (B, D, F, J, G) representam uma menor marcação para o receptor Notch-1, no tumor. (I) apresenta uma menor marcação para galectina-3 e, (J) uma maior intensidade de marcação para o receptor Notch-1, no tumor.

Discussão

Neste trabalho demonstrou-se uma inter-relação entre galectina-3 e componentes da via de sinalização Notch, uma vez que: 1) células que expressam mais galectina-3 apresentam uma menor expressão e clivagem do receptor; 2) a inibição do gene da galectina-3 leva à maior expressão/activação do receptor; 3) galectina-3 co-immunoprecipita com o receptor Notch-1 e; 4) galectina-3 e a expressão do receptor Notch-1 encontram-se inversamente correlacionadas em tecido tumoral gástrico.

A activação da via de sinalização Notch é modulada por diversas enzimas que glicosilam o receptor Notch nas repetições EGF, modificando a afinidade dos ligandos para o receptor. A O-fucosilação dos receptores, é indispensável para a activação da via de sinalização Notch. A adição de O-fucose serve como base para posteriores eventos de glicosilação que modulam esta sinalização⁵³. Este resíduo pode ser posteriormente alongado pela adição de uma N-acetilglucosamina (GlcNAc), por enzimas denominadas Fringe⁵⁴. A estrutura obtida pela adição de GlcNAc pode ser modificada pela adição de uma galactose (Gal), por uma β -1-4-galactosiltransferase, que origina uma estrutura N-acetilactosamina (LacNAc). A estrutura LacNAc resultante é um ligando de alta afinidade de galectina-3. Esta estrutura ainda pode ser modificada pela adição de ácido siálico ligado via α 2-3 ou α 2-6 por enzimas denominadas sialiltransferases⁵⁵. Desta forma, é provável que a interacção entre gal-3 e o receptor Notch-1 possa ser realizado via ligação a carboidratos presentes no receptor.

O papel de galectina-3 na tumorigenese, depende da sua localização celular. Extracelularmente, galectina-3 exerce a sua função principalmente através da sua interacção com carboidratos específicos na superfície celular. Verificou-se que a galectina-3 pode afectar a mobilidade celular e invasão da matriz extracelular, interagindo com proteínas de matriz como a fibronectina, colagénio, laminina, e integrina portanto, facilitando a metástase^{56, 57}. A interacção galectina-3-carboidrato, também aparenta ser importante na indução da proliferação celular e angiogénese⁵⁸, assim como na indução de apoptose⁵⁹. Além da sua função na activação de diversas vias de sinalização, extracelularmente, galectina-3 pode influenciar a progressão tumoral ao modular a endocitose de receptores transmembranares. Verificou-se que a endocitose de β 1-integrina induzida por gal-3 em células de carcinoma da mama, foi acompanhada por um rápido “cell spreading” ao facilitar a mobilidade celular⁶⁰.

Uma vez observado que galectina-3, nas células AGS, se localiza preferencialmente na superfície celular figura 3A, não seria improvável que a menor quantidade de receptor Notch-

1 encontrado nesta linha figura 2A e B fosse consequência directa da interacção entre galectina-3 e o receptor Notch-1, pela possibilidade de gal-3 poder influenciar a endocitose deste receptor. Pelo contrário, na linha MKN45, a localização de galectina-3 é preferencialmente citoplasmática, sugerindo desta forma que uma menor quantidade de galectina-3 na superfície celular possa ser a provável causa de se encontrar uma maior quantidade de receptor Notch-1 nestas células. Estes resultados são confirmados pelos ensaios de inibição de inibição de gal-3, no qual verificamos um aumento do receptor Notch-1 na ausência de galectina-3. Verifica-se portanto uma relação inversa entre a quantidade de galectina-3 presente na superfície das células AGS e MKN45 figura 4 com a quantidade de receptor Notch-1 observado nestas linhas figura 2.

Um papel estruturalmente importante por parte de galectina-3 extracelular foi verificado em células T. Observou-se que galectina-3 dificulta o receptor TCR de iniciar a transdução de sinal, ao formar complexos multivalentes, *lattices*, com os carboidratos presentes nos TCR⁶¹. Este efeito, restringe a mobilidade lateral do complexo TCR, crucial para a activação das células T, modulando negativamente a resposta destas células. Por paralelismo, em células onde galectina-3 foi previamente inibida, encontramos uma maior activação da via de sinalização Notch figura 8 e 9. Uma possível influência negativa na via Notch a nível extracelular poderia provir do facto de galectina-3 ser capaz de formar oligómeros, interligando diferentes glicoproteínas presentes na superfície da célula. A formação desta rede “supramolecular” poderia dificultar a interacção entre receptores e ligandos e posterior activação da via Notch.

Notch é activado pela ligação dos ligandos DSL. Esta interacção é extremamente forte e pensa-se que permita criar a força física necessária à dissociação do receptor e respectiva activação⁶². Além de que, as clivagens sequenciais de Notch que permitem a libertação de NICD, são facilitadas pela força dinâmica exercida pela endocitose do ligando e do ectodomínio de Notch, que leva à exposição do local de clivagem pela enzima ADAM⁶³. Desta forma, a interacção entre galectina-3 e carboidratos presentes no receptor Notch-1 poderia explicar em parte, a modulação negativa exercida por gal-3 na activação da via.

Encontram-se portanto evidências de que galectina-3 regula negativamente a quantidade de receptor Notch-1 disponível na superfície celular e por consequência a activação da via (analisado tanto a nível de expressão de genes como da quantidade do próprio NICD). De notar que na imunoprecipitação realizada com anticorpo anti-galectina-3, não foi encontrado NICD, o que sugere que a regulação da via Notch pela galectina-3 aparenta ser realizada a outro nível e não por interacção directa com este domínio clivado. No

entanto tendo em conta o papel intracelular de galectina-3, não é improvável que a regulação desta via também possa ser realizada intracelularmente.

Intracelularmente foi demonstrado que galectina-3 pode interagir com diversas proteínas, independentemente do seu reconhecimento a carboidratos. Gal-3 pode interagir com o oncogénico K-RAS e facilitar a transdução de sinal desde K-RAS a RAF e fosfoinositol-3-cinase, estando esta associação relacionada com a transformação celular⁶⁴ A galectina-3 também pode influenciar a tumorigenese através da regulação do ciclo celular pela ligação a β -catenina⁶⁵ um componente da via de sinalização Wnt, e parece estar envolvida na estimulação da expressão da ciclina-D e c-myc. A interacção com factores de transcrição pode estar envolvida nestes processos. Entretanto, a função mais estudada da galectina-3 é a inibição da apoptose em diversos tipos celulares tumorais expostos a diversos estímulos apoptóticos (incluindo agentes terapêuticos)⁶⁶ Galectina-3 possui similaridade de sequência com a proteína Bcl-2, uma conhecida molécula anti-apoptótica presente no citoplasma. Verificou-se que a interacção entre estas duas proteínas regula a apoptose ao bloquear a libertação do citocromo c da mitocôndria⁶⁷ Esta galectina protege as células tumorais contra a apoptose induzida pela perda de ancoragem⁶⁸ sugerindo que funcione como determinante crítico para a sobrevivência e disseminação das células cancerígenas em circulação durante a metástase. Esta função resulta da capacidade de galectina-3 induzir a paragem do ciclo celular através da modulação de diversas ciclinas e seus inibidores. Recentemente, Chen e colaboradores, 2009⁶¹, demonstraram que galectina-3 é capaz de regular negativamente a activação de células T (via TCR) ao estar envolvida no processo de endocitose deste receptor, independentemente do seu reconhecimento a carboidratos. A endocitose é um componente importante da via de sinalização Notch, possuindo um papel importante na manutenção de uma forma activa do receptor Notch, na produção de ligandos activos, assim como na transdução de sinal após activação da via Notch⁶⁹. Na ausência de ligando, o receptor Notch é constantemente internalizado e marcado por “ubiquitina ligase E3”, para degradação em lisossomas assim como para reciclagem^{70, 71} demonstraram que após endocitose do receptor Notch-1, outros passos de ubiquitinação são necessários para marcar o receptor Notch, na superfície celular, para degradação, e que um complexo formado pela ubiquitinase cbl aparenta ser importante para os primeiros eventos de endocitose. Tem sido demonstrado que o complexo formado pela ubiquitinase cbl, que leva à endocitose dos receptores de superfície celular, pode ser inibido pela proteína Alix. Esta proteína aparenta portanto regular negativamente o tráfego endocítico ao promover a desubiquitinação de receptores na superfície membranar⁷². Ainda segundo Chen *et al*, 2009 e colaboradores⁶¹, galectina-3

parece actuar de forma a atenuar a proteína Alix. Estes dados permitem levantar a hipótese de que galectina-3, através de atenuação da proteína Alix, facilite a formação do complexo mediado por cbl, que por sua vez leva à ubiquitinação de receptores de superfície celular e consequente internalização. Neste caso, e tendo em conta que o receptor Notch é alvo de ubiquitinação pelo complexo cbl, a presença de galectina-3 afectaria a presença deste receptor na superfície da célula, levando a uma maior internalização. Por outro lado, na ausência de galectina-3, o papel da proteína Alix não seria atenuado, o receptor Notch, não seria tão ubiquitinado por cbl, permanecendo mais estável na membrana. Isto, resultaria numa maior activação da via Notch, devido à maior disponibilidade de receptores.

O papel de galectina-3 no cancro gástrico ainda não se encontra totalmente esclarecido. A falta de concordância nos diversos estudos realizados reflecte a versatilidade do papel desta lectina. Inicialmente, observou-se que um aumento da expressão de gal-3 se encontrava associado a tumores primários, comparativamente ao tecido gástrico adjacente, assim como a focos metastáticos em nódulos linfáticos^{73, 74, 75}. Mais recentemente, uma redução da expressão de galectina-3 foi associada a metástase em nódulos linfáticos assim como a estados de maior diferenciação em cancro gástrico⁴¹. A expressão de galectina-3 neste tipo de cancro parece depender do tipo histológico estudado assim como do grau de diferenciação do tumor.

Por seu lado, a sinalização Notch parece ter uma função oncogénica no cancro gástrico ao promover a manutenção de células num estado indiferenciado. Esta via encontra-se portanto associada a tumores mais indiferenciados em cancro gástrico^{76, 77}. Encontra-se descrito que tumores gástricos podem ser classificados em intestinais ou bem diferenciados e difusos ou pouco diferenciados, estando associado a cada um deles vias carcinogénicas diferentes⁷⁸. Dada a pouca amostragem de tecido tumoral gástrico, nenhuma correlação acerca do perfil de expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1 com o tipo histológico e grau de diferenciação foi exequível. No entanto, no estudo realizado observou-se uma correlação inversa entre o padrão de expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1 nos casos de tecido tumoral gástrico de tipo intestinal estudados. Neste tipo de tumor, e na maioria dos casos analisados, encontra-se um aumento da expressão de galectina-3 e uma diminuição na expressão do receptor Notch-1. No entanto, também foram observados casos no qual uma diminuição da expressão de gal-3 se encontrava associado a um aumento do receptor Notch-1. No caso de tecido de tumor gástrico de tipo difuso, menos diferenciado, encontramos uma redução de galectina-3, associado a este tipo de tumor. De notar que independentemente do tipo histológico tumoral, encontra-se sempre uma correlação inversa entre a expressão destas

duas proteínas, que se encontra em concordância com os resultados obtidos nas linhas celulares gástricas.

Dados os resultados obtidos, foi proposto um modelo sobre de que forma galectina-3 influenciaria a via de sinalização Notch anexo 1. Acredita-se que esta interacção seja dependente dos carboidratos presentes nas repetições EGF do receptor. Além disso, embora não tenha sido demonstrado neste trabalho, também foi proposto que galectina-3 possa interagir com os ligandos de Notch, uma vez que estes possuem o mesmo tipo de glicosilação dos receptores na sua porção extracelular. Através da sua capacidade de oligomerização, galectina-3 interage com vários receptores de superfície celular, formando estruturas em *lattice*, que dificultaria a mobilidade dos ligandos. Desta forma, a presença de galectina-3 e sua interacção com Notch estaria por um lado a favorecer a endocitose do receptor, e, por outro lado, a dificultar a activação deste e consequente transdução de sinal, verificando-se desta forma uma menor quantidade de receptor Notch na superfície da célula. Intracelularmente, a presença de galectina-3 facilita a ubiquitinação do receptors, marcando-o para degradação contribuindo no processo de regulação negativa da via de sinalização Notch anexo 1A. Na ausência de galectina-3, o receptor encontra-se mais estável na superfície membranar, e, além do mais, a interacção entre o ligando e o receptor Notch encontra-se favorecida. Por outro lado, a ubiquitinação do receptor é desfavorecida. Desta forma, encontra-se uma maior quantidade de receptor Notch na superfície celular, associada a uma maior activação da via anexo 1B. Os resultados obtidos evidenciam que o estímulo das células pelo ligando Jagged-1, além de aumentar a activação da via Notch, aumenta a produção de galectina-3 figura 6B. Desta forma, o modelo proposto tem em causa que o aumento da produção de gal-3 observado possa funcionar como um mecanismo de *feedback* negativo da via Notch.

Conclusão

A presença de galectina-3 no microambiente tumoral aparenta mediar diversas funções que favorecem o processo tumorigénico. Tem sido descrito como esta lectina interage em diversas vias de transdução de sinal. Neste trabalho, foi proposto que galectina-3 poderia interagir com a via de sinalização Notch e desta forma modular a sua função. Os resultados obtidos sugerem que gal-3 possui um papel importante na activação da via Notch:

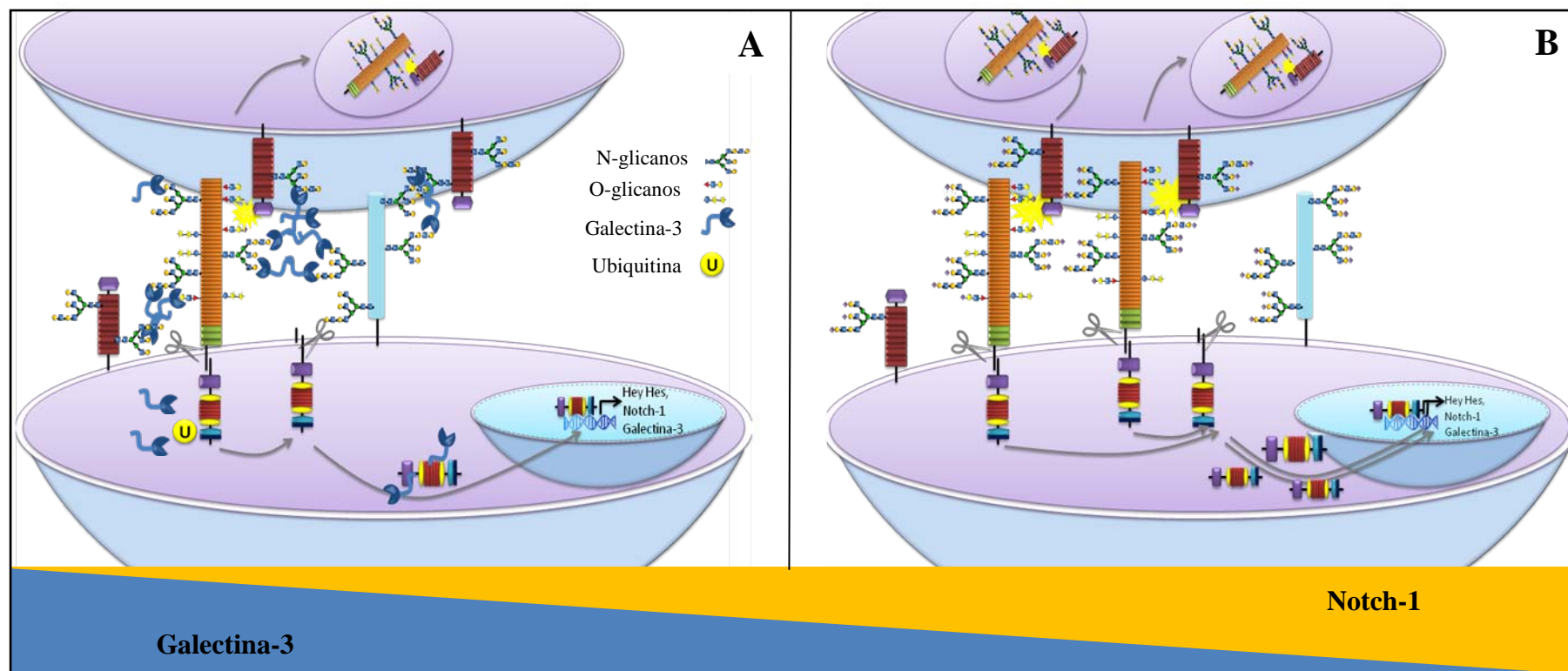
1. Galectina-3 modula negativamente a expressão do receptor Notch-1 tanto na presença como na ausência de estímulo da via Notch pelo ligando Jagged-1
2. Após inibição de galectina-3, as células tornam-se mais sensíveis ao estímulo pelos ligandos Delta-4 e Jagged-1, verificando-se um aumento da clivagem do receptor Notch-1, associado a um aumento da activação da via Notch. Além disso, estes resultados são confirmados pela sobreexpressão de genes directamente dependentes da clivagem do receptor Notch.
3. Demonstrou-se que galectina-3 interage directamente com o receptor Notch-1. Pensa-se que essa interacção seja dependente de carboidratos e seja a forma pela qual gal-3 modula negativamente a via de sinalização Notch.
4. A correlação inversa entre a expressão de galectina-3 e do receptor Notch-1 também é encontrada em tecido tumoral gástrico.

Bibliografia

1. Liu FT, Rabinovich GA; Galectins as modulators of tumour progression.; *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):29-41. Review;
2. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K; Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins; *Cell*. 1994 Feb 25;76(4):597-8;
3. Ochieng J, Platt D, Tait L, Hogan V, Raz T, Carmi P, Raz A; Structure-function relationship of a recombinant human galactoside-binding protein; *Biochemistry*. 1993 Apr 27;32(16):4455-60;
4. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P; Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3; *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 29;246(3):788-91;
5. Hughes RC; Galectins as modulators of cell adhesion; *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):667-76. Review;
6. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR; Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices; *Curr Opin Struct Biol*. 2007 Oct;17(5):513-20. Epub 2007 Oct 22. Review;
7. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB; Galectin genes: regulation of expression; *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):441-9. Review;
8. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL; Intracellular functions of galectins; *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2-3):263-73. Review;
9. Hughes RC; Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins; *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):172-85. Review;
10. Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A; Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest; *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):6852-7. Epub 2001 Nov 27;
11. Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A; Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells; *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):661-8;
12. Kapucuoglu N, Basak PY, Bircan S, Sert S, Akkaya VB; Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers; *Pathol Res Pract*. 2009;205(2):97-103. Epub 2008 Oct 31;
13. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT; Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma; *Int J Cancer*. 1999 May 17;81(4):519-26;
14. Inufusa H, Nakamura M, Adachi T, Aga M, Kurimoto M, Nakatani Y, Wakano T, Miyake M, Okuno K, Shiozaki H, Yasutomi M; Role of galectin-3 in adenocarcinoma liver metastasis; *Int J Oncol*. 2001 Nov;19(5):913-9;
15. Faggiano A, Talbot M, Lacroix L, Bidart JM, Baudin E, Schlumberger M, Caillou B; Differential expression of galectin-3 in medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia; *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Dec;57(6):813-9;
16. Hoofst L, van der Veldt AA, Hoekstra OS, Boers M, Molthoff CF, van Diest PJ; Hexokinase III, cyclin A and galectin-3 are overexpressed in malignant follicular thyroid nodules; *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Feb;68(2):252-7;
17. Castronovo V, Van Den Brûle FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, Sobel ME.; Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer; *J Pathol*. 1996 May;179(1):43-8;
18. Idikio H; Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade; *Int J Oncol*. 1998 Jun;12(6):1287-90;
19. Shimamura T, Sakamoto M, Ino Y, Shimada K, Kosuge T, Sato Y, Tanaka K, Sekihara H, Hirohashi S; Clinicopathological significance of galectin-3 expression in ductal adenocarcinoma of the pâncreas; *Clin Cancer Res*. 2002 Aug;8(8):2570-5;
20. Tsuboi K, Shimura T, Masuda N, Ide M, Tsutsumi S, Yamaguchi S, Asao T, Kuwano H; Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis;
21. Merseburger AS, Kramer MW, Hennenlotter J, Simon P, Knapp J, Hartmann JT, Stenzl A, Serth J, Kuczyk MA; Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer; *Prostate*. 2008 Jan 1;68(1):72-7;
22. Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, Balan V, Hogan V, Pienta KJ, Raz A; Regulation of prostate cancer progression by galectin-3; *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1515-23. Epub 2009 Mar 12;
23. Mohr OL; Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*; *Genetics*. 1919 May;4(3):275-82;
24. Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL; Notch signaling in development and câncer; *Endocr Rev*. 2007 May;28(3):339-63. Epub 2007 Apr 4;
25. Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC; F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation; *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):163-75;
26. Miyamoto A, Lau R, Hein PW, Shipley JM, Weinmaster G; Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation; *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):10089-97;
27. Rauen T, Raffetseder U, Frye BC, Djudjaj S, Mühlenberg PJ, Eitner F, Lendahl U, Bernhagen J, Dooley S, Mertens PR; YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation; *J Biol Chem*. 2009 Sep 25;284(39):26928-40
28. ““Glucose: A Novel Regulator of Notch Signaling”. *ACS CHEMICAL BIOLOGY* 2008• VOL.3 NO.4
29. Struhl G, Adachi A; Nuclear access and action of notch in vivo; *Cell*. 1998 May 15;93(4):649-60

30. Kovall RA; More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes; *Oncogene*. 2008 Sep 1;27(38):5099-109;
31. Fischer A, Gessler M; Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors; *Nucleic Acids Res*. 2007;35(14):4583-96;
32. Wu J, Bresnick EH; Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated; *Trends Biochem Sci*. 2007 Oct;32(10):477-85;
33. Gregorieff A, Clevers H; Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to câncer; *Genes Dev*. 2005 Apr 15;19(8):877-90;
34. Wilson A, Radtke F; Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and câncer; *FEBS Lett*. 2006 May 22;580(12):2860-8. Epub 2006 Mar 20;
35. Radtke F, Raj K; The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?; *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct;3(10):756-67;
36. Gallahan D, Callahan R; The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4); *Oncogene*. 1997 Apr 24;14(16):1883-90;
37. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCreedy DR, Lockwood G, Egan SE; High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival; *Cancer Res*. 2005 Sep 15;65(18):8530-7;
38. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K; Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer; *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1517-25;
39. Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, Kim R, Tang J, Montie JE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Aster JC; JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence; *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):6854-7;
40. Bin Hafeez B, Adhami VM, Asim M, Siddiqui IA, Bhat KM, Zhong W, Saleem M, Din M, Setaluri V, Mukhtar H; Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator; *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 15;15(2):452-9;
41. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernández-Majada V, Grilli A, López-Bigas N, Bellora N, Albà MM, Torres F, Duñach M, Sanjuan X, Gonzalez S, Gridley T, Capella G, Bigas A, Espinosa L; Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6315-20;
42. Fre S, Pallavi SK, Huyghe M, Laé M, Janssen KP, Robine S, Artavanis-Tsakonas S, Louvard D; Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6309-14;
43. Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, Offerhaus GJ, Fan X, Henderson CM, Matsui W, Eberhart CG, Maitra A, Feldmann G; Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer; *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2291-301;
44. Okuyama R, Tagami H, Aiba S; Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases; *J Dermatol Sci*. 2008 Mar;49(3):187-94;
45. Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X; Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis; *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8323-9;
46. Ning L, Greenblatt DY, Kunnimalaiyaan M, Chen H; Suberoyl bis-hydroxamic acid activates Notch-1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid carcinoma cells; *Oncologist*. 2008 Feb;13(2):98-104;
47. Okada K, Shimura T, Suehiro T, Mochiki E, Kuwano H; Reduced galectin-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer; *Anticancer Res*. 2006 Mar-Apr;26(2B):1369-76;
48. Katoh M, Katoh M; Notch signaling in gastrointestinal tract; *Int J Oncol*. 2007 Jan;30(1):247-51;
49. Sander GR, Powell BC; Expression of notch receptors and ligands in the adult gut; *J Histochem Cytochem*. 2004 Apr;52(4):509-16;
50. Sekine A, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y; Hath1 up-regulates gastric mucin gene expression in gastric cells; *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 16;344(4):1166-71;
51. Yao J, Qian C; Over-activated Notch-1 protects gastric carcinoma BGC-823 cells from TNFalpha-induced apoptosis; *Dig Liver Dis*. 2009 Apr 27;
52. Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, Liao WJ, Yang MC, Li AF, Wang AM, Kuo ML, Chi CW; The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2; *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):5039-48;
53. Lu L, Stanley P; Roles of O-fucose glycans in notch signaling revealed by mutant mice; *Methods Enzymol*. 2006;417:127-36;
54. Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF; Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch; *Nature*. 2000 Jul 27;406(6794):369-75;
55. Moloney DJ, Shair LH, Lu FM, Xia J, Locke R, Matta KL, Haltiwanger RS; Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules; *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9604-11;
56. Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P; Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3; *Biochemical and biophysical research communications*, vol.246,788-791, 1998;

57. Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM; Galectin-3 interaction with thomsen-friedenreich disaccharide on cancer-associated Muc1 causes increased cancer endothelial adhesion; *The journal of biological chemistry*, vol. 282, 773-781, 2007;
58. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A; Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis; *American journal of pathology*, vol. 156, 2000;
59. Fukumori, T. et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res.* 63,8302–8311 (2003);
60. Furtak V, Hatcher F, Ochieng J; Galectin-3 mediates the endocytosis of beta-1 integrins by breast carcinoma cells; *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Dec 14;289(4):845-50;
61. Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, Maverakis E, Yang RY, Hsu DK, Dustin ML, Liu FT; Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 25;106(34):14496-501;
62. Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G; DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur; *J Cell Biol.* 2007 Feb 12;176(4):445-58;
63. Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histén G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC, Blacklow SC; Structural basis for autoinhibition of Notch; *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Apr;14(4):295-300;
64. Galit Elad-Sfadia, Roni Haklai, Eyal Balan, and Yoel Kloog; Galectin-3 Augments K-Ras Activation and Triggers a Ras Signal That Attenuates ERK but Not Phosphoinositide 3-Kinase Activity; *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 279, No. 33, Issue of August 13, pp. 34922–34930, 2004;
65. Song S, Mazurek N, Liu C, Sun Y, Ding QQ, Liu K, Hung MC, Bresalier RS; Galectin-3 mediates nuclear β -catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3 β activity; *Cancer research*, Vol.69, 2009;
66. Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HRC; Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation; *J Biol. Chem.*, vol.277, 15819-15827, 2002;
67. Song YK, Billiar TR, Lee YJ; Role of galectin-3 in breast cancer metastasis; *American journal of pathology*, vol.160, 2002;
68. Brou C; Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands; *experimental cell research*, Vol. 315, 1549-1555, 2009;
69. Nichols JT, Miyamoto A, Weinmaster G; Notch signaling-constantly on the move; *Traffic*, vol.8, 959-969, 2007;
70. Jehn BM, Dittert I, Beyer S, von der Mark K, Bielke W; c-Cbl binding and ubiquitin dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1; *J. Biol.Chem.*, vol.277, 8033-8040, 2002;
71. Schmidt MH, Hoeller D, Yu J, Furnari FB, Cavenee WK, Dikic I, Böglér O; Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex; *Mol Cell Biol.* 2004 Oct;24(20):8981-93;
72. Lotan R, Ito H, Yasui W, Yokozaki H, Lotan D, Tahara E; Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas; *Int J Cancer.* 1994 Feb 15;56(4):474-80;
73. Baldus SE, Zirbes TK, Weingarten M, Fromm S, Glossmann J, Hanisch FG, Mönig SP, Schröder W, Flucke U, Thiele J, Hölscher AH, Dienes HP; Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation; *Tumour Biol.* 2000 Sep-Oct;21(5):258-66;
74. Miyazaki J, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Miura S; Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes; *Oncol Rep.* 2002 Nov-Dec;9(6):1307-12;
75. Sekine A, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y; Hath1 up-regulates gastric mucin gene expression in gastric cells; *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 16;344(4):1166-71;
76. Katoh M, Katoh M; Notch signaling in gastrointestinal tract (review); *Int J Oncol.* 2007 Jan;30(1):247-51;
77. Tahara E; Genetic pathways of two types of gastric cancer; *IARC Sci Publ.* 2004;(157):327-49;



Anexo 1. Influência de galectina-3 sobre a via de sinalização Notch. No painel A encontra-se uma situação em que as células possuem galectina-3. Nesta situação, ao interagir com os receptores na superfície celular, galectina-3 realiza o “cross-link” de carboidratos, modulando negativamente a activação da via Notch, tanto ao dificultar mobilidade do receptor Notch e ligandos, dificultando a activação do receptor como, ao facilitar a endocitose do receptor. Intracelularmente, galectina-3 pode facilitar a ubiquitinação do receptor marcando-o para degradação. Na ausência de galectina-3 (B), a activação da via Notch é favorecida, tanto pela maior interacção entre receptores e ligandos, como pela menor degradação do receptor. Desta forma, encontramos maior quantidade de receptor na superfície da célula.