



**Universidade do Algarve**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Estudo do papel desempenhado pelo  
heterotetrâmero de anexina A2 em  
células de cancro da mama hipóxicas**

Maria Rita Dias Castanheira

Tese de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Faro, Portugal

2014



**Universidade do Algarve**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Estudo do papel desempenhado pelo  
heterotetrâmero de anexina A2 em  
células de cancro da mama hipóxicas**

Maria Rita Dias Castanheira

Tese de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Dissertação orientada pela Doutora Patrícia Madureira

Faro, Portugal  
2014

Título do trabalho: “Estudo do papel desempenhado pelo heterotetrâmero de anexina A2 em células de cancro da mama hipóxicas”

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

*Copyright* Maria Rita Castanheira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Queria antes de mais agradecer à Doutora Patrícia Madureira pela forma calorosa que me acolheu no seu laboratório, pela oportunidade ao me integrar no seu projeto e acima de tudo pela transmissão de conhecimentos. Pela sua amizade, disponibilidade, interesse e paciência que demonstrou desde o início.

A todas as pessoas integrantes no grupo do Doutor Wolfgang Link pois todas elas, desde a Marisa, a Laura, o Ricardo, o próprio Wolfgang e em particular o Dr. Richard Hill contribuíram não só ao nível de aconselhamento mas também prestaram uma preciosa ajuda na execução técnica de todo este trabalho. A todos eles o meu muito obrigada!

Ao Doutor David M. Waisman e Victoria Miller da Universidade de Dalhousie em Halifax, no Canadá pois também eles mesmo à distância prestaram uma ajuda essencial ao longo de todo este trabalho.

A todo o pessoal do CBME e DCBM que de alguma forma ao longo deste trabalho me foram ajudando com a sua simpatia e disponibilidade, como a Ana Luisa, a Susana, a Marita, a Ana Catarina, a Claudia, o André e o Dino.

A todos os meus professores do Mestrado de Biologia Molecular e Microbiana pela transmissão de conhecimentos e em particular à professora Margarida Reis pois foi uma pessoa determinante no percurso na Universidade do Algarve.

À minha colega de mestrado Joana que tive a oportunidade de conhecer queria agradecer toda a amizade e carinho que sempre demonstrou.

Aos meus pais e irmã, por todo o amor, apoio, amizade e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje. Adoro-vos do fundo do coração!

A ti claro António, pois sem ti todo este percurso não seria possível. Obrigada por todo amor, carinho, dedicação, compressão e paciência que foram essenciais para ultrapassar esta etapa. Estarás sempre no meu coração!

A todos os meus amigos pelo apoio e amizade que demonstraram nos momentos mais difíceis em particular ao Pedro e a Barbara pois foram eles os meus conselheiros em muitos desses momentos.

## Resumo

A principal característica que define uma célula cancerígena é a sua capacidade de escapar às barreiras impostas pelas células vizinhas invadindo os tecidos circundantes e estabelecendo metástases em locais distantes/ distintos do tumor primário. Após o crescimento inicial do tumor, este passa por uma fase em que ocorre um stress hipóxico o que conduz a alterações no seu metabolismo e a aquisição de características mais invasivas e metastáticas. A plasmina é uma das principais proteases de serina envolvida na fibrinólise, degradação da matriz extracelular, invasão e angiogénese. O heterotetrâmero de anexina A2 (AIIIt) é um conhecido recetor de plasminogénio, responsável pela ativação de plasmina na superfície de diversos tipos de células. O papel desempenhado pelo AIIIt em células cancerígenas durante a hipóxia ainda não foi investigado. Com este trabalho pretendeu-se contribuir para o esclarecimento do papel desempenhado pelo AIIIt na promoção da ativação de plasmina à superfície de células de cancro da mama hipóxicas.

Neste estudo foram comparados os níveis totais e extracelulares do AIIIt em condições de normóxia *versus* hipóxia em duas linhas celulares distintas (MCF7 e MDA MB 231). De seguida, foram analisados a transcrição dos genes da *anexina A2* e *S100A10* por qRT-PCR de forma a esclarecer o tipo de regulação que levou ao aumento de expressão de *S100A10* durante a hipóxia. Depois disso, investigou-se a capacidade de ativação da plasmina pelas células de cancro da mama hipóxicas na presença ou ausência de *S100A10* (subunidade do AIIIt que interage diretamente com o plasminogénio), utilizando as linhas celulares com o *knockdown* para o *S100A10*.

Os resultados demonstraram que quando expostas a condições de hipóxia ocorre o aumento da transcrição de *S100A10* e translocação de AIIIt para a superfície celular em ambas as linhas celulares. Os ensaios de ativação da plasmina não mostraram um aumento de produção de plasmina em células do cancro da mama hipóxicas. No entanto, estudos futuros poderão vir a esclarecer os resultados obtidos.

Palavra(s)-Chave: heterotetrâmero de anexina A2, cancro da mama, hipóxia, plasmina, anexina A2, *S100A10*.

## Abstract

The defining characteristic of a cancer cell is its ability to escape the constraints imposed by the neighbouring cells, invade the surrounding tissue and metastasize to distant sites. Early in the development of the tumour, cancer cells have to adapt to survive in a hypoxic environment due to the very rapid and uncontrolled cell growth in conjunction with a poor blood supply that leads to lack of both nutrients and oxygen. The hypoxia response leads to the activation of multiple cellular signalling pathways that promote cancer cell invasion and metastasis. The serine protease, plasmin is a key protease that participates in fibrinolysis, extracellular matrix degradation, invasion and angiogenesis. Annexin A2 heterotetramer (AII<sub>t</sub>) is an important plasminogen receptor that contributes significantly to plasmin activation at the surface of a number of different cell types. Nevertheless, its contribution during tumor hypoxia has not been investigated. With this work I have proposed to investigate the role played by AII<sub>t</sub> in the activation of plasmin at the surface of hypoxic breast cancer cells, due to its function as a plasminogen receptor.

For this study I have used MCF7 and MDA MB 231 cell lines and compared the levels of total and cell surface AII<sub>t</sub> in normoxic *versus* hypoxic conditions. I have also analysed *annexin A2* and *S100A10* transcription by qRT-PCR in order to clarify the type of regulation leading to increased expression of S100A10 during hypoxia. After that I have also investigated the capacity of hypoxic breast cancer cells to activate plasmin in the presence or absence of AII<sub>t</sub>, using the S100A10 *knockdown* cell lines.

The results have shown that when exposed to hypoxia there is an increase in transcription of *S100A10* and cell surface translocation of AII<sub>t</sub> in both cell lines. Plasmin assays did not show an increase in plasmin activation in hypoxic breast cancer cells. However, future studies might allow clarifying the results obtained.

Keywords: Annexin A2 heterotetramer, breast cancer, hypoxia, plasmin, annexin A2, S100A10.

# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice .....</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 – Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – Hipóxia e cancro .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 – Metastização .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 – Plasmina.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 – Heterotetrâmero de anexina A2 .....</b>	<b>9</b>
1.4.1- Estrutura.....	9
1.4.2- Regulação .....	11
1.4.3- Funções.....	12
1.4.3.1- Heterotetrâmero de anexina A2 – recetor de plasminogénio .....	13
<b>2 - Objetivos .....</b>	<b>18</b>
<b>3 - Materiais e Métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 – Material .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 - Equipamentos .....	19
3.1.2 - Soluções Tampão.....	20
3.1.3 - Anticorpos .....	20
3.1.4 – Plasmídeos .....	22
3.1.5 – <i>Primers</i> .....	23
3.1.6 - Material Biológico.....	23
3.1.6.1 - Linhas celulares .....	23
3.1.7 – Géis para SDS-PAGE .....	24
<b>3.2 – Métodos.....</b>	<b>25</b>
3.2.1 - Cultura de células .....	25

3.2.2 - Congelação de células.....	26
3.2.3 - Estabelecimento de linhas celulares <i>knockdown</i> para <i>S100A10</i> .....	26
3.2.4 - Lisados celulares proteicos .....	28
3.2.5 - Doseamento de proteínas .....	29
3.2.6 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	30
3.2.7 - <i>Western-Blotting</i> .....	30
3.2.8 - Citometria de fluxo .....	32
3.2.9 - Imunocitoquímica .....	33
3.2.10 - Ensaio de actividade da plasmina .....	34
3.2.11 - PCR quantitativo em Tempo real (qRT-PCR) .....	35
3.2.12 - Análise estatística.....	38
<b>4 – Resultados .....</b>	<b>39</b>
4.1 – Análise da expressão do AIIIt em linhas celulares de cancro da mama submetidas a condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia .....	39
4.2 – Análise da transcrição de <i>anexina A2</i> e <i>S100A10</i> em células de cancro da mama sob condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia.....	41
4.3 – Análise dos níveis extracelulares do AIIIt em células do cancro da mama sob condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia.....	44
4.3.1 – Citometria de fluxo .....	44
4.3.2 Imunocitoquímica .....	47
4.4 – Ensaio funcionais.....	49
4.4.1 - Estabelecimento de linhas celulares <i>knockdown</i> para <i>S100A10</i> .....	49
4.4.2- Ensaio de actividade da plasmina .....	50
<b>5 – Discussão .....</b>	<b>53</b>
5.1 – Análise da expressão do AIIIt em linhas celulares de cancro da mama submetidas a condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia .....	54
5.2 – Análise da transcrição dos genes que codificam para a <i>anexina A2</i> e <i>S100A10</i> em células de cancro da mama sob condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia .....	54
5.3 – Análise dos níveis extracelulares do AIIIt em células do cancro da mama sob condições de hipóxia <i>versus</i> normóxia.....	55
5.4 – Ensaio funcionais.....	56
<b>6 – Conclusões.....</b>	<b>58</b>
<b>7 – Perspetivas Futuras.....</b>	<b>59</b>

<b>8 - Bibliografía .....</b>	<b>60</b>
<b>9 – Anexos .....</b>	<b>67</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Regulação do HIF.....	3
Figura 1.2 - Cascata Invasão- Metastização.....	5
Figura 1.3 - Transição epitelial-mesenquimal.....	6
Figura 1.4 - Ativação da plasmina pelo sistema uPA/uPAR – funções biológicas e intervenientes .....	9
Figura 1.5 - Funções do AIIIt.....	13
Figura 1.6 - Modelo esquemático da organização dos componentes presentes no complexo AIIIt e da ativação do plasminogénio pelo S100A10.....	14
Figura 3.1 - Mecanismo de estabelecimento de <i>knockdown</i> através de shRNA... ..	27
Figura 3.2 - Sistema retroviral células Phoenix .....	27
Figura 3.3 - Ilustração do esquema de montagem de transferência de proteínas..	31
Figura 3.4 - Esquema representativo método de deteção do SYBR®Green .....	36
Figura 4.1 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MDA MB 231 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia química .....	40
Figura 4.2 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MDA MB 231 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia real .....	40
Figura 4.3 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MCF7 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia química .....	41
Figura 4.4 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MCF7 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia real .....	41

Figura 4.5 - Análise da transcrição dos genes <i>anexina a2</i> , <i>S100A10</i> , <i>uPAR</i> e <i>uPA</i> por qRT-PCR nas células MDA MB 231 (a) e MCF7 (b) em condições de normóxia (NT) e hipóxia química (200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> ) nos tempos indicados.....	43
Figura 4.6 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por FACS nas células MDA MB 231 em normóxia (NT) ou submetidas a 48 horas com 200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> .....	45
Figura 4.7 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por FACS nas células MCF7 em normóxia (NT) ou incubadas durante 48 horas com 200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> .....	46
Figura 4.8 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por Imunocitoquímica das células MDA MB 231 em normóxia (NT) e quando incubadas com 200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> durante 48 horas.....	48
Figura 4.9 - <i>Western blotting</i> das células MDA MB 231 com <i>knockdown</i> para <i>S100A10</i> .....	49
Figura 4.10 - Ensaio de actividade da plasmina nas células MDA MB 231 com o <i>knockdown</i> para o <i>S100A10</i> em normóxia (NT) ou incubadas com 200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> durante 48 horas.....	50
Figura 4.11 - Ensaio de actividade da plasmina nas células MDA MB 231 com o shRNA <i>scramble</i> em normóxia (NT) e quando submetidas a 48 horas de 200 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> adicionando apenas Plasminogénio (Plg) ou o Plasminogénio e uPA em simultâneo.....	51

## Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Descrição dos anticorpos utilizados.....	20
Tabela 3.2 - Descrição dos plasmídeos utilizados .....	22
Tabela 3.3 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em tempo real. 23	
Tabela 3.4 - Descrição das linhas celulares utilizadas .....	23
Tabela 3.5 – Descrição da composição dos géis para SDS-PAGE .....	24
Tabela 3.6 - Componentes da reação para síntese de cDNA. ....	37
Tabela 3.7 - Componentes e respectivas quantidades para a reação de PCR em Tempo Real. ....	37

## Lista de Abreviaturas

Água DEPC – água livre de nucleases (tratada com dietilpirocarbonato);

AIIIt – Heterotetrâmero de anexina A<sub>2</sub>;

APS – *Amonium persulfate*; persulfato de amônia;

ATCC - *American Type Culture Collection*;

BCA – *Bicinconinic acid*; ácido bicinconínico;

BSA – *Bovine serum albumin*; albumina de soro bovino;

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

ECL - *Enhanced chemiluminescence*; quimioluminescência melhorada;

EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*; ácido etilenodiaminotetracético

EGF – *Epidermal growth factor*; fator de crescimento epidermal;

EGTA – *Ethylene glycol tetraacetic acid*; ácido etilenoglicoltetracético;

FACS - *Fluorescent Activated Cell Sorter*; Citometria de fluxo;

FBS – *Fetal bovine serum*; soro bovino fetal;

FGF-2 /bFGF – *Fibroblast growth fator 2/ basic fibroblast growth factor*; fator de crescimento de fibroblastos 2/ fator de crescimento de fibroblastos básico;

FIH- Fator de inibição de HIF;

HGF – *Hepatocyte growth factor*; fator de crescimento de hepatócitos;

HIF- *Hypoxia inducible factor*; fator de indução de hipóxia;

HRE – *Hypoxia response element*; elemento de resposta hipóxica;

HRP –*Horseradish peroxidase*; peroxidase de rábano;

IFN- $\gamma$  – *interferon gama*;

MMPs- *Matrix metalloproteases*; metaloproteinasas da matriz;

NaVO<sub>4</sub> – Ortovanadato de sódio;

NP40 – *Nonidet P40 substituto*, surfactante não iónico;

p11 – também denominado S100A10;

p36 – também denominado anexina A2;

PAI-1/PAI-2 – *Plasminogen activator inhibitor 1 and 2*; Inibidores dos ativadores de plasminogénio 1 e 2;

PBS – *Phosphate buffer saline*; tampão fosfato salino;

PCR – *Polimerase Chain reaction*; Reação polimerase de cadeia;

PDGF - *Platelet-derived growth factor*; fator de crescimento derivado das plaquetas;

PHD – Propil-4-hidroxilase;

qRT-PCR – *quantitative Real Time PCR*; PCR em Tempo Real quantitativo;

rpm - Rotações por minuto;

SDS – *Sodium dodecil sulphate*; dodecilsulfato de sódio;

SDS-PAGE – *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*; electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida;

shRNA - *Short hairpin RNA*;

TBS-T – *Tris buffer saline* – Tween 20; tampão Tris salino - Tween 20;

TEMED – Tetrametiletilenodiamina;

TGF- $\beta$  – *Transforming growth factor beta*; Fator crescimento transformante beta;

tPA- *tissue type plasminogen activator*; ativador tecidual do plasminogénio;

uPA- *urokinase type plasminogen activator*; ativador de plasminogénio tipo uroquinase;

uPAR – uPA *receptor*; recetor celular do ativador de plasminogénio tipo uroquinase;

VHL - von Hippel-Lindau;

# 1 – Introdução

O corpo humano é constituído por uma multiplicidade de diferentes tipos de células e tecidos, sendo que, o cancro pode surgir a partir de todos eles. Aquilo que é vulgarmente designado de cancro é na verdade uma acumulação de alterações genéticas nas células (Bunz, 2008). As células normais encontram-se harmoniosamente integradas com o seu ambiente e respondem a estímulos externos através de vias de transdução de sinal de forma a reprimir ou induzir a proliferação celular. O cancro surge quando a célula, por variados motivos, consegue escapar aos constrangimentos impostos ao seu crescimento e começa a dividir-se de uma forma desregulada (Boerner, 2005). 90% dos cancros são carcinomas, derivados de células epiteliais que revestem as glândulas e cavidades corporais (Bunz, 2008).

Ao longo de várias décadas, prevaleceu na comunidade científica, a visão reducionista de que o cancro se tratava de um processo autónomo da célula, isto é, todos os atributos das células cancerígenas podiam ser explicados à luz das alterações genéticas que estas células acumulavam. Atualmente existe uma outra perceção de que um tumor pode ser caracterizado diretamente pelo comportamento das células cancerígenas inseridas dentro de uma massa tumoral e respetivo microambiente que a compõem. Cada vez mais, se pode afirmar que o cancro é, na verdade, uma doença de tecidos, em particular, de tecidos complexos a que chamamos tumores (Weinberg, 2007).

Caracterizações histológicas de tumores epiteliais revelaram que estes são constituídos por um variado conjunto de diferentes tipos de células. Em alguns casos de carcinomas de prevalência mais comum, tais como o da mama, cólon, estômago e pâncreas, as células não neoplásticas, células do estroma, podem constituir cerca de 90 % das células no interior da massa tumoral (Weinberg, 2007).

Os diversos tipos de células do estroma pertencem a várias linhagens de células mesenquimais e, por conseguinte, são biologicamente muito diferentes das células epiteliais, cuja transformação leva ao crescimento dos carcinomas (Weinberg, 2007). O estroma é constituído por vários tipos de células, tais como, células vasculares endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, diferentes tipos de células derivadas da medula óssea incluindo macrófagos associados ao tumor, células angiogénicas derivadas da medula óssea, neutrófilos, mastócitos, células mieloides derivadas de linfócitos T supressores e

ainda células mesenquimais estaminais. Este conjunto de células do estroma são atraídas para o local do tumor primário promovendo o seu crescimento e metastização. Os mecanismos moleculares através dos quais as células do estroma são recrutadas e comunicam com as células cancerígenas são apenas compreendidos num número limitado de contextos (Joyce, 2009).

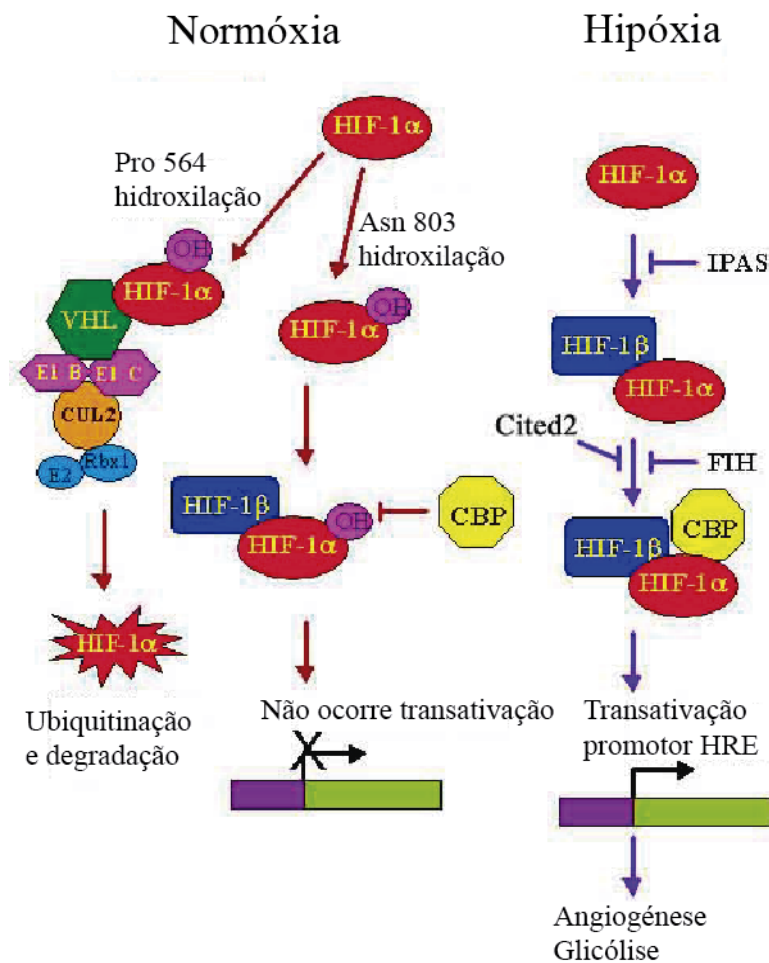
## 1.1 – Hipóxia e cancro

A hipóxia tumoral pode ocorrer logo no início do desenvolvimento do tumor primário. Nesta fase aumentam as necessidades de O<sub>2</sub>, fruto da proliferação celular desregulada característica destas células, sendo que a perfusão sanguínea não é suficiente para suprir as necessidades de oxigenação. O tecido epitelial, de onde provem cerca de 90% dos tumores, não tem vasculatura, logo a hipóxia intratumoral ocorre quando a difusão do O<sub>2</sub> é limitada devido ao aumento da distância entre os vasos sanguíneos do tecido conjuntivo adjacente e o tumor em crescimento. Desta forma o O<sub>2</sub> é consumido pelas células mais próximas da vasculatura deixando as restantes em situação de hipóxia. Para além disso pode ainda ocorrer hipóxia quando a perfusão sanguínea é bastante reduzida devido à heterogeneidade do tecido vascular formado ao longo de toda a massa tumoral. Como consequência destes factos, as áreas hipóxicas distribuem-se de uma forma bastante heterogênea por toda a massa tumoral (Semenza, 2012).

Vários estudos têm demonstrado que a baixa tensão de oxigénio nos tumores pode ser um marcador de mau prognóstico em diferentes tipos de cancro. Nestes estudos correlacionou-se a capacidade de metastização com a presença de tumores primários hipóxicos (Brizel, 1997; Hocke, 1999; Bussink, 2003; Hockel, 1996).

O fator de indução de hipóxia (*hypoxia inducible factor*, HIF) constitui o fator de transcrição chave durante a resposta hipóxica. O HIF é composto por duas subunidades o HIF- $\alpha$  e o HIF- $\beta$ . A subunidade HIF- $\alpha$  possui dois domínios terminais de ativação, o domínio N-terminal e o C-terminal. Enquanto que a subunidade HIF- $\beta$  é constitutivamente expressa nas células, o domínio N-terminal de HIF-1 $\alpha$ , também designado de domínio de degradação dependente de O<sub>2</sub>, confere uma regulação ao nível proteico desta subunidade em função da concentração de oxigénio. A principal função do

domínio C-terminal passa por recrutar e interagir com as proteínas co-ativadoras transcripcionais tais como o CBP/p300 (Semenza, 2012).



**Figura 1.1 - Regulação do HIF** – O HIF é regulado sob condições de normóxia e hipóxia. Na presença de O<sub>2</sub> os dois resíduos de prolina do HIF-α são hidroxilados pelo complexo Propil-4-hidroxilase (PHD) permitindo a ligação da proteína ligase de ubiquitina, von Hippel-Lindau e consequente degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Por outro lado o fator de inibição do HIF (FIH) promove a hidroxilação de um resíduo de asparagina, bloqueando a interação deste domínio com o cofator transcripcional CBP/p300 e inibindo assim a transcrição mediada pelo HIF. Sob condições hipóxicas, não é possível ocorrer a hidroxilação do HIF pois os complexos PHD e FIH são dependentes de O<sub>2</sub> logo o HIF-α é rapidamente estabilizado, translocado para o núcleo, onde se liga à subunidade HIF-β tornando-a funcionalmente ativa e aos seus co-ativadores CBP/ p300 levando à transcrição de um elevado número de genes envolvidos na resposta hipóxica (adaptado de Brat, 2003).

Na presença de O<sub>2</sub>, o complexo Propil-4-hidroxilase (PHD) adiciona grupos hidroxilo (OH<sup>-</sup>) a dois resíduos de prolina de HIF-α. Esta hidroxilação do HIF-α permite

a sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma através da ligação à proteína ligase de ubiquitina, von Hippel-Lindau (VHL). Um outro mecanismo de regulação do HIF é mediado pelo fator de inibição do HIF (FIH). O FIH promove a hidroxilação de um resíduo de asparagina na região C-terminal, bloqueando, desta forma, a interação deste domínio com o cofator transcricional CBP/p300 e inibindo assim a transcrição mediada pelo HIF (Dai, 2011; Sadri, 2013).

Sob condições hipóxicas, não é possível ocorrer a hidroxilação do HIF- $\alpha$  pois os complexos PHD e FIH são dependentes de O<sub>2</sub>, para além de que, a própria reação de hidroxilação necessita de O<sub>2</sub>. Logo, em condições de hipóxia o HIF- $\alpha$  é rapidamente estabilizado, translocado para o núcleo, onde se liga à subunidade HIF- $\beta$  tornando-a funcionalmente ativa e aos seus co ativadores CBP/ p300 levando à transcrição de um elevado número de genes envolvidos na resposta hipóxica (Semenza, 2012). Os co ativadores transcricionais, tais como CBP/p300 têm como principal função ligarem-se ao elemento de resposta de hipóxia (HRE) dentro da região promotora dos genes regulados pelo HIF, mediando assim a sua transcrição (Poon, 2009).

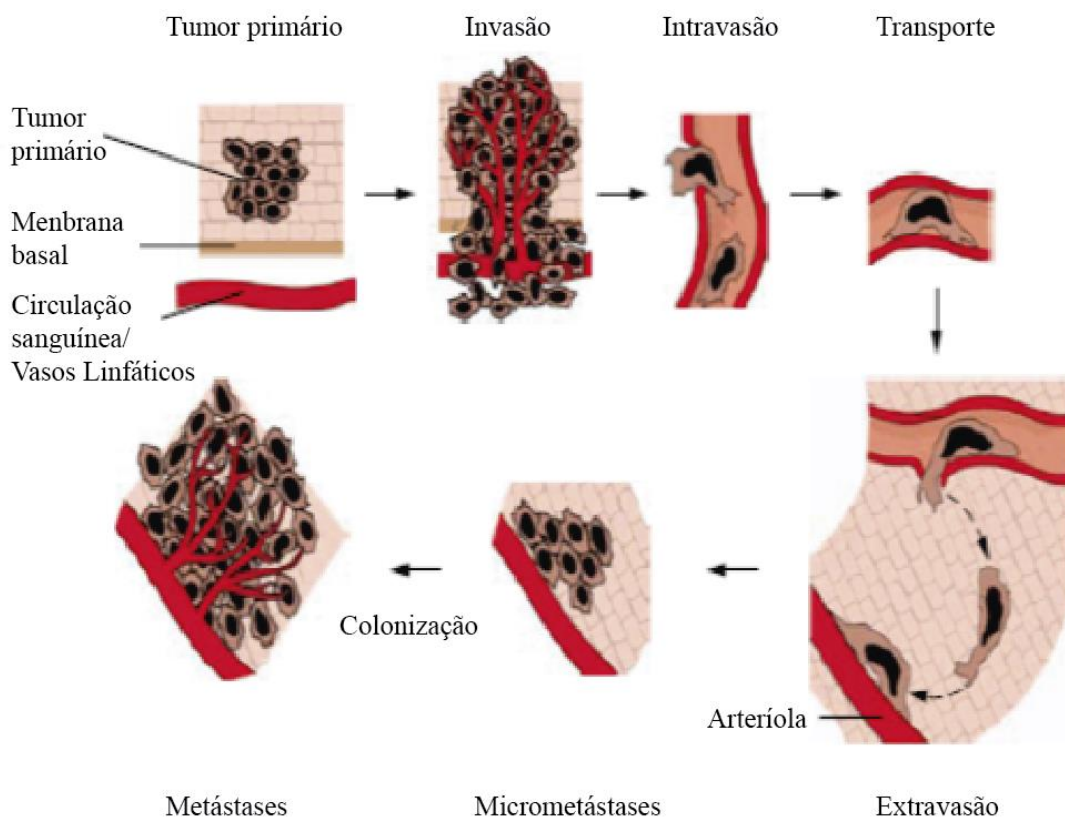
O HIF, enquanto fator transcricional ativo, regula a expressão de genes envolvidos em vários processos, incluindo angiogénese, alteração do metabolismo glicolítico, regulação do pH, sobrevivência celular, capacidade de invasão, transição epitelial-mesenquimal e proliferação celular (Dai, 2011; Semenza, 2012).

## **1.2 – Metastização**

A colonização de órgãos distintos do local de crescimento do tumor primário pelas células cancerígenas representa o atributo mais perigoso do cancro. Com efeito, a metastização é responsável por cerca de 90% da mortalidade associada à doença. Apesar dos avanços significativos no tratamento de tumores primários, as metástases continuam a ser um problema clínico significativo, provavelmente refletindo o conhecimento limitado dos mecanismos que regem este processo complexo (Weinberg, 2008).

A metastização representa o produto final de uma sucessão complexa de eventos designada por cascata de Invasão-Metastização (Figura 1.2). Nesta sequência de eventos, inicialmente as células cancerígenas do tumor primário, que se encontram em condições de hipóxia, promovem a formação de novos vasos sanguíneos através da angiogénese e

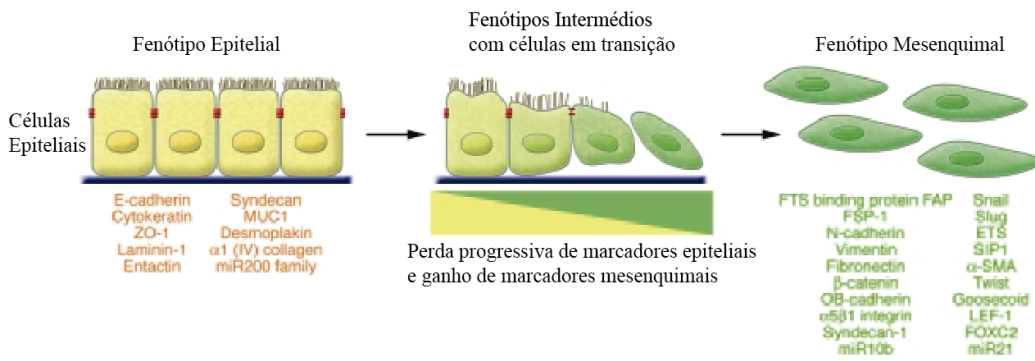
simultaneamente adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes (invasão), posteriormente entram nos vasos sanguíneos (intravasão) e são transportadas pela corrente sanguínea e linfática (transporte), saem da corrente sanguínea para novos tecidos/órgãos (extravasão), onde conseguem estabelecer-se (formação de micrometástases); finalmente podem adquirir a capacidade de proliferar nestes locais distantes e com um microambiente distinto do tumor primário formando macrometástases (colonização) (Weinberg, 2008).



**Figura 1.2 - Cascata Invasão- Metastização** - Inicialmente as células cancerígenas do tumor primário, que se encontram em condições de hipóxia, promovem a formação de novos vasos sanguíneos através da angiogénese e simultaneamente adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes (invasão), posteriormente entram nos vasos sanguíneos (intravasão) e são transportadas pela corrente sanguínea e linfática (transporte), saem da corrente sanguínea para novos tecidos/órgãos (extravasão), onde conseguem estabelecer-se (formação de micrometástases); finalmente podem adquirir a capacidade de proliferar nestes locais distantes e com um microambiente distinto do tumor primário formando macrometástases (colonização) (adaptado de Weinberg, 2008).

Tem sido demonstrado, por diversos estudos, que o processo designado por transição epitelial-mesenquimal desempenha um papel crítico na promoção de metástases derivadas de tecido epitelial (Tsai, 2013; Thiery, 2009; Thiery, 2002).

A transição epitelial-mesenquimal constitui um processo biológico que permite a uma célula epitelial polarizada, que normalmente estabelece adesões fortes a outras células epiteliais e com a membrana basal, sofrer uma série de alterações ao nível do seu programa de expressão génico que irão permitir à mesma adotar características fenotípicas de células mesenquimais. Estas alterações ocorrem ao nível da diminuição das interações fortes célula-célula e célula-matriz e pelo aumento de resistência à apoptose. Neste processo complexo, as alterações ao nível da programação celular nas células do tumor primário, irão conferir a estas uma plasticidade mesenquimal o que conduzirá a um fenótipo mais invasivo, com uma maior capacidade de sobrevivência, migração e invasão associado ao estado mesenquimal, escapando às barreiras físicas impostas pelo tumor primário e desta forma migrando para fora do tecido epitelial de origem (Kalluri, 2009; Sleeman, 2012).



**Figura 1.3 - Transição epitelial-mesenquimal** - A Transição Epitelial Mesenquimal envolve a transição funcional de células epiteliais polarizadas em células mesenquimais com mobilidade e capacidade de secreção dos principais componentes da matriz extracelular. Na figura encontram-se representados os principais marcadores fenotípicos característicos das células que sofrem este processo. (adaptado de Kalluri, 2009).

Alguns estudos apontam as células do estroma e o microambiente tumoral como elementos chave no processo de regulação da transição epitelial-mesenquimal. À medida que o tumor se desenvolve pensa-se que possam ocorrer alterações genéticas e epigenéticas, não só nas células tumorais, mas também, nas células que se encontram na proximidade do tumor (Junk, 2013; Hanahan, 2011). Foram identificados níveis elevados de uma grande variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas secretados pelas células do estroma, tais como HGF, EGF, PDGF e TGF- $\beta$  que podem ser responsáveis pela ativação de uma série de fatores de transcrição (Snail, Slug, zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), Twist, Goosecoid, FOXC2 entre outros) nas células cancerígenas envolvidos na transição epitelial-mesenquimal (Finak, 2008; Kalluri, 2009).

A destruição de barreiras biológicas, tais como a matriz extracelular que requer a ativação de enzimas proteolíticas, constitui um passo crucial durante o processo de invasão e metastização (Liotta, 1991). Estas protéases desempenham um papel fundamental na progressão tumoral desencadeando a degradação e reestruturação da membrana basal do um tumor primário promovendo o seu crescimento, expansão e estabelecimento de metástases. Diversos estudos têm demonstrado que o aumento da produção de membros da família das metaloproteinases da matriz (*Matrix metalloproteinases*, MMP) e da via de ativação da plasmina contribuem significativamente para a promoção da angiogénese, invasão e metastização do tumor (MacKay, 1990; Kwaan, 1992).

### 1.3 – Plasmina

A plasmina constitui uma protéase de serina envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, fibrinólise, trombólise, cicatrização de feridas e progressão tumoral. (Deryugina, 2012).

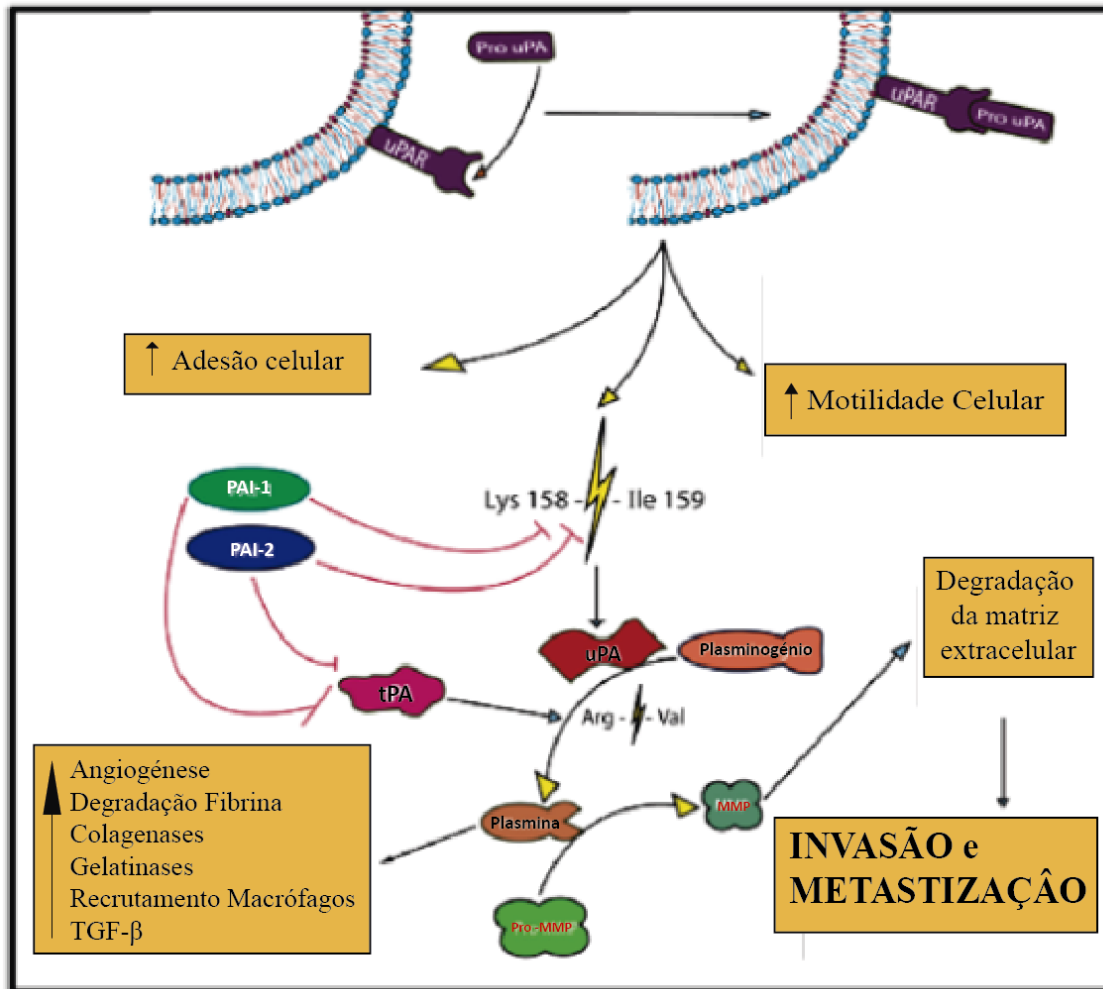
O zimogénio inativo, plasminogénio, é convertido na sua forma ativa, a protéase de serina de largo espectro, plasmina, através dos seus ativadores: ativador tecidual do plasminogénio (*tissue type plasminogen activator*, tPA) e o ativador de plasminogénio tipo uroquinase (*urokinase type plasminogen activator*, uPA). Estas protéases de serina específicas clivam o plasminogénio na ligação peptídica Arg561-Val562, resultando numa alteração conformacional e formação do local de ligação ao substrato. De forma a evitar uma proteólise desregulada, os ativadores do plasminogénio e a plasmina são inativados pelos inibidores dos ativadores do plasminogénio (PAI-1 e PAI-2) e pela  $\alpha$ 2-antiplasmina, respetivamente (Kwon, 2005).

O tPA é produzido exclusivamente pelas células endoteliais (Levin, 1983). O resíduo de lisina C-terminal dos recetores de plasminogénio das células endoteliais possibilitam um local de ligação quer ao plasminogénio quer ao tPA permitindo, desta forma, a co localização da enzima e substrato à superfície celular. Uma vez ancorados à superfície celular, o tPA e a plasmina ficam protegidos da inativação pelos seus inibidores. Para além de se ligarem à superfície celular, o plasminogénio e o tPA também se co localizam em coágulos de fibrina promovendo a sua dissolução. A fibrina é clivada

pela plasmina ligada à sua superfície resultando na formação de novos resíduos de lisina C-terminais e consequentemente novos locais de ligação para o plasminogénio e tPA (de Vries, 1990; Fleury, 1991; Fleury, 1993). Desta forma a fibrina desempenha um papel importante permitindo um local de ligação e a co localização destas proteínas para além de que, potencia a ativação do plasminogénio durante o processo de fibrinólise (Kwon, 2005).

Para além de desempenhar um papel importante na fibrinólise, a plasmina também assume uma função importante, na proteólise pericelular associada à invasão tumoral e metastização. A ativação do plasminogénio pelas células cancerígenas é normalmente iniciada pela secreção de uPA que se liga ao seu recetor celular, uPAR. O plasminogénio liga-se a um grupo heterogéneo de recetores à superfície celular. No entanto, apenas os recetores que se ligam ao plasminogénio através de resíduos de lisina C-terminais participam na ativação do mesmo. Mecanicamente, a interação do resíduo de lisina C-terminal do recetor com os motivos *kringle* do plasminogénio, permitem uma conformação molecular menos rígida e mais dinâmica. Para além disso, um subconjunto de recetores do plasminogénio também se co localiza junto ao complexo uPA-uPAR. Desta forma, quer a indução da alteração conformacional do plasminogénio quer a sua co localização com o complexo uPA-uPAR potenciam significativamente a conversão de plasminogénio em plasmina. A plasmina produzida através desta reação mantém-se ligada ao seu recetor, protegendo-a desta forma da ação do seu inibidor,  $\alpha$ 2-antiplasmina (Kwon, 2005; Madureira, 2011).

À superfície celular a plasmina catalisa a degradação de proteínas da matriz extracelular como a laminina e fibronectina (Tapiovaara, 1996; Andreasen, 1997). A plasmina desempenha também outras funções igualmente importantes ao promover a libertação de fatores de crescimento associados à matriz extracelular tais como o TGF- $\beta$  e o FGF-2 (Yehualaeshet, 1999; Kwon, 2002). Para além disso, a plasmina promove a ativação de diversos zimogénios de MMPs, como as pro-colagenases e as pro-gelatinases, permitindo, desta forma, às células obterem toda a maquinaria necessária para degradar e invadir as estruturas e tecidos circundantes. Assim sendo, a formação de plasmina à superfície das células constitui um evento chave na destruição da matriz extracelular promovendo a invasão das células tumorais através das barreiras fisiológicas naturalmente impostas (Lijnen, 1998; Rabbani, 2001).



**Figura 1.4 - Ativação da plasmina pelo sistema uPA/uPAR – funções biológicas e intervenientes** - A ativação do plasminogénio pelas células cancerígenas é normalmente iniciada pela secreção de uPA que se liga ao seu recetor celular, uPAR. A indução da alteração conformacional do plasminogénio bem como a sua co-localização com o complexo uPA-uPAR potenciam significativamente a conversão de plasminogénio em plasmina. À superfície celular a plasmina catalisa a degradação de proteínas da matriz extracelular, promove a libertação de fatores de crescimento associados à matriz extracelular tais como o TGF- $\beta$  bem como a ativação de diversos zimogénios de MMPs, como as pro-colagenases e as pro-gelatinases. Assim sendo, a formação de plasmina à superfície das células constitui um evento chave na destruição da matriz extracelular promovendo, assim, a invasão das células tumorais através das barreiras fisiológicas naturalmente impostas. (adaptado de Dass, 2008).

## 1.4 – Heterotetrâmero de anexina A2

### 1.4.1- Estrutura

O heterotetrâmero de anexina A2 (AII<sub>t</sub>) é composto por duas moléculas de anexina A2 (também denominada p36) ligadas entre si por um dímero da proteína S100A10 (também denominada p11) (Figura 1.6). Imagens obtidas através de microscopia

crioelectrónica demonstram que o complexo AII<sub>t</sub> se localiza à superfície celular, sem atravessar a membrana fosfolipídica, as subunidades S100A10 encontram-se posicionadas no centro com uma molécula de anexina A<sub>2</sub> em cada um dos lados ancoradas à superfície da membrana de forma dependente de Cálcio (Lambert, 1997) (figura 1.6). A análise da estrutura tridimensional do AII<sub>t</sub> por cristalografia mostra que os 10 primeiros aminoácidos da anexina A<sub>2</sub> formam uma  $\alpha$ -hélice, que se encontra numa fenda hidrofóbica formada por uma curva L<sub>2</sub> e uma hélice H<sub>IV</sub> de um monómero de S100A10, e uma hélice H<sub>I</sub> do outro monómero de S100A10. (Madureira, 2011).

A anexina A<sub>2</sub> pertence à família das anexinas. Esta família de proteínas liga-se a fosfolípidos aniónicos de uma forma dependente de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>). Todas as anexinas possuem domínios bastante conservados de sequências repetidas, aproximadamente de setenta resíduos de aminoácidos, compostos por cinco hélices alfa contendo vários sítios de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. Inserida no complexo AII<sub>t</sub>, a anexina A<sub>2</sub> apresenta-se como uma molécula planar, curvada com um dos seus lados côncavo e o outro, o oposto, convexo (Figura 1.6). O lado convexo está virado para a membrana celular e contém os sítios de ligação ao Ca<sup>2+</sup> e aos fosfolípidos, enquanto que, o lado côncavo fica virado para fora da membrana e contém as regiões N e C-terminais da anexina A<sub>2</sub>. A região N-terminal da anexina A<sub>2</sub> contém o local de ligação ao S100A10, um resíduo de cisteína reativo, locais de fosforilação e um sinal de exportação nuclear. Por sua vez, a região C-terminal contém, igualmente, um resíduo de cisteína reativo, locais de ligação para a actina F, fosfolípidos, fibrina e heparina. A anexina A<sub>2</sub> localiza-se essencialmente no citoplasma e membrana celular, sendo que, uma pequena fração localiza-se no núcleo (Madureira, 2011).

A proteína S100A10 é um membro da família de proteínas S100 que contém um braço EF dimérico com local de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. As proteínas S100 têm baixo peso molecular, frequentemente constituídas por polipeptídeos acídicos de aproximadamente 10 kDa, contendo uma região N-terminal num dos braços EF, uma outra região C-terminal no outro braço EF e ainda uma região bastante destruturada ao centro. Em contraste com as restantes proteínas da família S100, S100A10 não é regulada por Ca<sup>2+</sup> devido à sua diferente constituição em aminoácidos nos locais de ligação ao Ca<sup>2+</sup>. Assim sendo, o S100A10 não sofre alterações conformacionais induzidas pelo Ca<sup>2+</sup> mantendo uma conformação permanente e independente de Ca<sup>2+</sup>. Esta conformação adotada pela proteína S100A10 é semelhante à adotada pelas restantes proteínas S100 quando ligadas ao Cálcio. A maioria de S100A10 intracelular encontra-se associado à anexina A<sub>2</sub>. A

anexina A2 não só orienta a ligação de S100A10 na membrana celular, mas também está envolvida na estabilização de S100A10 protegendo esta proteína da degradação pelo proteassoma. Uma das principais características do S100A10 é a presença de um resíduo de lisina C-terminal que forma um sítio de ligação para o tPA e plasminogénio (Madureira, 2011).

A distribuição de anexina A2 e S100A10 em diferentes tecidos encontra-se descrita em mamíferos e também nas aves. Estas proteínas são indetetáveis no tecido cardíaco, músculo liso, esquelético e cartilagem. Foram ainda descritas baixas concentrações no cérebro, plaquetas, eritrócitos e fígado, enquanto que, concentrações intermédias foram relatadas no baço, rins e glândulas suprarrenais. Foram observadas concentrações elevadas no pulmão, placenta e intestino. As células epiteliais da pele, do trato respiratório e intestino, bem como, o endotélio e tecido conjuntivo contêm entre um nível intermédio a alto de anexina A2 e S100A10. Outros tipos de células ricas em anexina A2 e S100A10 são os macrófagos (Madureira, 2011).

#### **1.4.2- Regulação**

A expressão da anexina A2 é regulada, tanto a nível transcricional como pós-translacional. Especificamente, nas células cancerígenas, esta é transcricionalmente regulada por fatores de crescimento tais como a insulina, fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento epidermal. Também é induzida em células transformadas com v-src-, VH-ras, v-mos-, ou SV40 (Bharadwaj, 2013).

A região amino-terminal da anexina A2 contém locais suscetíveis de alterações pós-translacionais servindo estes para regular as propriedades de ambos os domínios amino e carboxilo-terminal. Assim, o domínio amino-terminal possui locais para a acetilação, fosforilação de serina e tirosina e ainda glutationilação. Estes eventos pós-translacionais permitem regular a exportação nuclear da anexina A2 bem como o local de ligação do S100A10, que se encontra alojado no domínio amino-terminal (Bharadwaj, 2013).

Ao nível transcricional encontra-se descrito que o *S100A10* é induzido pelo fator de transcrição STAT1 em células epiteliais bem como por outros fatores de crescimento tais como o TGF- $\beta$ , gonadotrofina, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de fibroblastos e interleucina 1 $\beta$ . Num estudo recente, utilizando um modelo de ratinhos com

depressão, foi demonstrado que a hipermetilação do promotor do *S100A10* se encontrava reduzida após a administração de antidepressivos, sugerindo um potencial de regulação epigenética do promotor de *S100A10* (Madureira 2012).

Ao nível celular a proteína S100A10 é regulada diretamente pela anexina A2 que o protege da degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Diversos grupos têm descrito que a anexina A2 é necessária para o transporte do S100A10 para a superfície celular. A anexina A2, no entanto, carece de motivo de sinalização para exportação o que sugere que o transporte para a superfície da célula ocorre por uma via de secreção não convencional. Outros estudos têm demonstrado que o transporte de S100A10 para a superfície celular requer a fosforilação da anexina A2 (Madureira 2012). Mais recentemente, Fang *et al* descreveu um mecanismo pelo qual IFN- $\gamma$  estimula a expressão de S100A10 resultando no aumento de S100A10 à superfície celular. Neste estudo foi demonstrado que o transporte de S100A10 para a superfície da célula é dependente da anexina A2 e utiliza uma via de secreção exossomal (Fang, 2012).

### **1.4.3- Funções**

Muitas funções têm sido atribuídas ao AII<sub>t</sub>. O AII<sub>t</sub> citoplasmático tem sido associado à endocitose e exocitose por transporte vesicular, à interação com moléculas de adesão celular, regulação de canais iônicos, mediação de rearranjos de actina e também como uma proteína estrutural responsável pela organização da membrana fosfolipídica. Um estudo relatou que 15% da anexina A2 celular era nuclear, sendo libertada do núcleo através da RNase A. Estes dados são consistentes com os estudos que revelam que a anexina A2 se liga ao RNA, no entanto o papel da anexina A2 nuclear ainda permanece indefinido (Madureira, 2011). Em resposta a estímulos externos, o AII<sub>t</sub> é capaz de promover alterações na polaridade da célula epitelial ao orquestrar dois processos, designadamente, a adesão célula-célula e a formação de junções aderentes. A participação do complexo AII<sub>t</sub> na formação de junções aderentes em células epiteliais e endoteliais é

devida à sua associação com a caderina E epitelial e caderina VE endotelial (Bharadwaj, 2013).



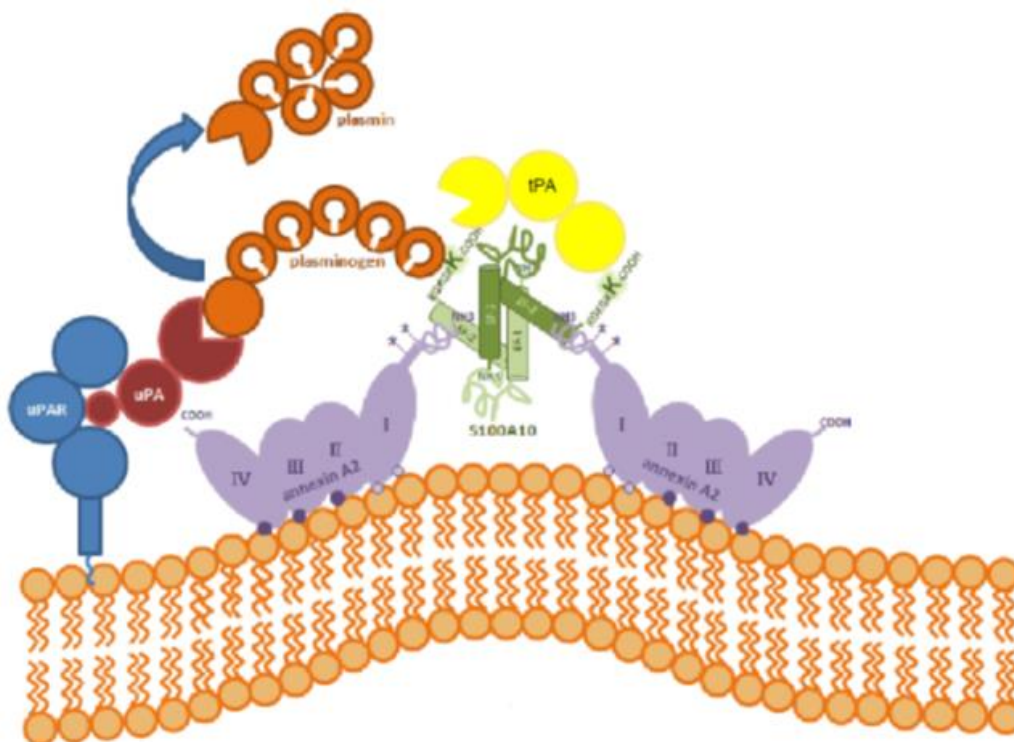
**Figura 1.5 - Funções do AII** – O diagrama esquemático sumariza as funções do AII discutidas no texto (adaptado de Bharadwaj, 2013).

#### 1.4.3.1- Heterotetrâmero de anexina A2 – recetor de plasminogénio

Os recetores de plasminogénio desempenham um papel crucial na regulação da ativação da plasmina à superfície da célula. A ativação de plasmina está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a fibrinólise e invasão de células tumorais. O processo de invasão é mediado à superfície das células endoteliais, macrófagos associados ao tumor e células cancerígenas e envolve a degradação da matriz extracelular e membrana basal. A taxa de produção de plasmina encontra-se significativamente aumentada na presença de recetores de plasminogénio na superfície das células, principalmente por ligação ao plasminogénio e também pela co-localização com os ativadores do plasminogénio tPA e uPA (Bharadwaj, 2013).

A anexina A2 foi originalmente identificada como um recetor de plasminogénio, no entanto, foi recentemente estabelecido que S100A10, e não anexina A2, é responsável pela conversão de plasminogénio em plasmina à superfície das células endoteliais (fibrinólise) e das células cancerígenas (via ativação do complexo uPA/uPAR) (Bharadwaj, 2013; Madureira, 2012).

S100A10 liga-se a tPA e ao plasminogénio, para além de que, se co localiza com o complexo uPA/uPAR, estimulando, desta forma, a conversão de plasminogénio a plasmina (Figura 1.6). A plasmina recém-formada liga-se a S100A10 protegendo-se, desta forma da inativação pelo seu inibidor,  $\alpha 2$ -antiplasmina concentrando a sua a actividade proteolítica à superfície da célula (Madureira, 2012).



**Figura 1.6 - Modelo esquemático da organização dos componentes presentes no complexo AIIIt e da ativação do plasminogénio pelo S100A10** – O AIIIt é composto por duas moléculas de anexina A2 que estão ligadas entre si por um dímero da proteína S100A10. A anexina A2 possui motivos de ligação a fosfolípidos carregados negativamente de forma dependente de iões de cálcio que permitem ancorar o AIIIt à membrana celular. O S100A10 possui um resíduo de lisina C-terminal que se liga aos motivos *kringle* do plasminogénio e ao tPA estimulando a ativação do plasminogénio para a sua forma ativa, a plasmina. O AIIIt também se co localiza na membrana celular com o complexo uPA/uPAR, estimulando, desta forma, a conversão de plasminogénio a plasmina. A plasmina recém-formada liga-se ao S100A10 protegendo-se, desta forma da inativação pelo seu inibidor, a  $\alpha 2$ -antiplasmina concentrando a sua a actividade proteolítica à superfície da célula (Adaptado de Madureira, não publicado).

Desta forma, a anexina A2 desempenha um papel secundário à superfície celular enquanto interveniente na cascata de produção de plasmina, já que não tem a capacidade de se ligar diretamente ao plasminogénio, apenas se encontra envolvida no transporte do S100A10 para a superfície celular, protege-o da degradação pelo proteassoma e ainda permite a sua ancoragem à membrana celular (Bharadwaj, 2013).

Uma característica-chave da maioria dos recetores de plasminogénio é a presença de um resíduo de lisina do C-terminal. Este resíduo de lisina interage com os domínios de ligação da lisina (*kringle*) existentes no tPA e plasminogénio (Bharadwaj, 2013). O dímero de S100A10 possui dois resíduos de lisina C-terminais que permitem a ligação quer ao tPA quer ao plasminogénio desempenhando, desta forma, um papel crítico na conversão de plasminogénio a plasmina, pelos ativadores de plasminogénio (Madureira, 2012). Em 2002, Fogg e colaboradores, provaram que a remoção das lisinas C-terminais do S100A10 através da carboxipeptidase B resulta na perda de ligação ao plasminogénio e consequente diminuição de produção de plasmina (Fogg, 2002).

Estudos levados a cabo por Surette e colaboradores com ratinhos *knockout* para *S100A10* (*S100A10*<sup>-/-</sup>) contribuíram em muito para a compreensão do papel de S100A10 como um recetor do plasminogénio. Surette *et al* descreveram que os ratinhos *knockout* para *S100A10* apresentavam um aumento de deposição de fibrina em vários tecidos, incluindo pulmões, fígado, baço e rins. Neste estudo, inicialmente demonstrou-se que o aumento de acumulação de fibrina nos ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> não ocorreu devido à intensificação da cascata de coagulação uma vez que os tempos de coagulação (tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada) medidos foram idênticos, quer nos ratinhos *wild type* quer nos ratinhos *knockout* para *S100A10*. De seguida, neste mesmo estudo, a fim de investigar como decorria a fibrinólise nos ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> foi utilizada uma abordagem inovadora que consistia na injeção de veneno de cobra, batroxobina, nestes ratinhos *knockout* e também nos *wild type*. Batroxobina é um enzima semelhante à trombina que cliva rapidamente o fibrinogénio resultando na produção de microcoágulos de fibrina que são removidos da vasculatura ao longo do processo de fibrinólise. Com esta experiência pretendeu-se comparar a capacidade dos ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> e *wild type* em dissolver os coágulos sanguíneos induzidos pela batroxobina. Os resultados demonstraram que os ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> tinham taxas de fibrinólise significativamente mais baixas quando comparados com os ratinhos *wild type* (Surette, 2011; Madureira, 2012).

Neste estudo também foi observada uma diminuição da angiogénese através de um método bem estabelecido, em que o Matrigel (que mimetiza a matriz extracelular) contendo o fator de crescimento bFGF é injetado subcutaneamente nos ratinhos *wild type* e *S100A10*<sup>-/-</sup>. Quando os fatores de crescimento angiogénicos conhecidos (como o bFGF) misturados com o Matrigel são injetados subcutaneamente em ratinhos ocorre a migração

das células endoteliais para o Matrigel formando estruturas semelhantes ao endotélio vascular. A partir desta experiência foi possível observar que nos ratinhos *knockout* para *S100A10* ocorria menos 79% de formação destas estruturas semelhantes ao endotélio vascular do que nos ratinhos *wild type*. Neste mesmo estudo também foi utilizado um outro método que permitiu evidenciar a diminuição da angiogénese nos ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup>. Esta nova experiência consistiu na injeção de células cancerígenas (T241) nos ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> e *wild type* tendo-se verificado passadas 3 semanas que os ratinhos *S100A10*<sup>-/-</sup> apresentavam 42% menos endotélio na massa tumoral injetada do que os ratinhos *wild type* (Surette, 2011; Madureira, 2012).

A partir deste estudo em que se utilizaram ratinhos *knockout* para *S100A10* como modelo foi possível estabelecer que a proteína *S100A10* desempenha um papel determinante como reguladora da fibrinólise e angiogénese *in vivo* (Madureira, 2012).

Num outro estudo efetuado por Phipps e seus colaboradores ficou demonstrado, igualmente, que o *S100A10* à superfície celular, enquanto responsável pela ativação da plasmina, desempenha um papel importante na migração de macrófagos para os locais de tumor (Phipps, 2011; Madureira, 2012).

Para além destes estudos mais recentes, já em 2003, Choi e colaboradores, haviam descrito que em ratinhos injetados com células de fibrossarcoma HT-1080 em que a transcrição de *S100A10* foi silenciada ocorria 3 vezes menos focos metastáticos nos pulmões comparativamente com os que haviam sido injetados com as células controlo. Neste mesmo estudo também foi observado que quando injetadas as células HT-1080 a sobre expressar *S100A10* ocorria um aumento de metástases pulmonares em cerca de 16 vezes comparativamente com os ratinhos do grupo controlo. Um outro estudo levado a cabo por Zhang e colaboradores em 2004, havia demonstrado que em células do cancro do colon CCL-222 onde a transcrição génica de *S100A10* foi silenciada por siRNA ocorria uma perda significativa de expressão de *S100A10* à superfície celular. Neste estudo ficou demonstrado que a diminuição do *S100A10* à superfície celular estaria correlacionada com a diminuição da capacidade de ligação ao plasminogénio à superfície celular em cerca de 45% e também com a perda em 65% de actividade da plasmina nestas células comparativamente com as células controlo. Nas células em que haviam silenciado o gene *S100A10* ocorreu ainda a perda total da sua capacidade de invasão dependente do plasminogénio. Coletivamente, os resultados estabelecidos nestes estudos vieram

demonstrar o papel determinante desempenhado pela expressão dos níveis extracelulares do S100A10 como recetor de plasminogénio oncogénico envolvido na promoção da capacidade de invasão e metastização das células cancerígenas (Choi, 2003; Zhang, 2004; Madureira, 2012).

## 2 - Objetivos

Com este trabalho pretendeu-se contribuir para o esclarecimento do papel desempenhado pelo AIIIt e particularmente a subunidade S100A10 na promoção da ativação de plasmina à superfície de células de cancro da mama hipóxicas.

Dentro deste tema principal as metas a alcançar foram:

- Verificar se ocorriam alterações na expressão do AIIIt extracelular nas células de cancro da mama quando expostas a condições de hipóxia;
- Analisar que tipo de regulação seria responsável pelas alterações de expressão do AIIIt durante a hipóxia;
- Avaliar se o AIIIt teria um papel importante na ativação de plasmina à superfície de células de cancro da mama hipóxicas.

## 3 - Materiais e Métodos

### 3.1 – Material

#### 3.1.1 - Equipamentos

Câmara de Fluxo Laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Astec);

Centrífuga *Himac CT6EL* (Hitachi);

Banho-maria *SHEL LAB Digital Water Bath* (Sleldon MFG Inc.);

Microscópio invertido *Primo Vert* (Zeiss);

Incubadora *Forma™ Series II Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators* (Thermo Scientific);

Banho seco *Thermo-shaker TS-100* (Biosan);

Centrífuga refrigerada *Heraeus™ Fresco 17 Centrifuge* (Thermo Scientific);

Agitador de placas *VWR® Mini Blot Mixer*;

Fonte de eletroforese *PowerPac™ Basic power supply* (Biorad);

Sistema de eletroforese *Mini-PROTEAN® Tetra Sistem* (Biorad);

Leitor de microplacas *Infinite® M200* (Tecan);

Balança analítica *Acculab ALC 210.4* (Sartorius group);

Balança de precisão *Acuulab ALC 2100.2* (Sartorius group);

Espetrofotômetro *NanoDrop2000c* (Thermo-Scientific);

Equipamento *ChemiDoc™ XRS* (BioRad);

Citômetro de fluxo *BD FACSCalibur™* (BD Biosciences);

Termociclador *CFX96™ Real-Time PCR Detection Sistem* (BioRad);

Microscópio *Axiomager Z2* (Carl Zeiss);

### 3.1.2 - Soluções Tampão

- Tampão de eletroforese (10x): 250 mM Tris base, 2.5 M glicina, 1 % SDS;
- Tampão de Transferência (10x): 25mM Tris Base, 20mM glicina, + 20% Metanol;
- Tampão *Loading* de Proteínas (4x): 8% SDS, 120 mM Tris pH 6.8, 20 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 20 %  $\beta$ -mercaptoetanol;
- Tampão Tris salino – Tween 20 (20x): 400 mM Tris pH 7.5, 2.4 M NaCl, + 1:2000 Tween 20;
- Tampão de Lise: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EGTA, 0.1% Deoxicolato de Sódio; 1:200 cocktail de inibidores de proteases (SIGMA, ref: P2714-1BTL), 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 10 mM NaF;
- Tampão de Incubação (ensaio plasmina): 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl, 200 mM Tris pH 7.5;

### 3.1.3 - Anticorpos

**Tabela 3.1** - Descrição dos anticorpos utilizados

<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>	<b>Origem</b>
Anti- p11	Anticorpo de ratinho anti - S100A10	610071	BD Biosciences
Anti- p11	Anticorpo de ratinho anti – S100A10	sc-50450	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti- p36	Anticorpo de cabra anti – anexina A2	sc-1924	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti- $\beta$ tubulina	Anticorpo de coelho anti - $\beta$ tubulina	sc-9104	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti- HIF 1 $\alpha$	Anticorpo de coelho anti - HIF1 $\alpha$	sc-10790	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Anti- actina	Anticorpo de cabra anti - actina	sc-1615	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti - uPA	Anticorpo de cabra anti - uPA	sc-6830	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti - uPAR	Anticorpo de coelho anti - uPAR	sc-10815	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de ratinho	Anticorpo secundário de ratinho conjugado à peroxidase (HRP)	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de coelho	Anticorpo secundário de coelho conjugado à peroxidase (HRP)	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de cabra	Anticorpo secundário de cabra conjugado à peroxidase (HRP)	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Alexa Fluor 488	Anticorpo secundário de ratinho Alexa Fluor 488	A11001	Invitrogen
Alexa Fluor 488	Anticorpo secundário de cabra Alexa Fluor 488	A11055	Invitrogen
IgG	Anticorpo IgG de coelho	PC85	Calbiochem

### 3.1.4 – Plasmídeos

**Tabela 3.2** - Descrição dos plasmídeos utilizados

Identificação	Descrição	Origem/R eferência
<p>pSUPER-retro-<i>S100A10</i> shRNA1 (shRNA 1 para o <i>S100A10</i> em células humanas e de ratinho)</p>	<p>Clonagem dos primers: 5'-GAT CCC CGT GGG CTT CCA GAG CTT CTT TCA AGA GAA GAA GCT CTG GAA GCC CAC TTT TTA-3' e 5'-AGC TTA AAA AGT GGG CTT CCA GAG CTT CTT CTC TTG AAA GAA GCT CTG GAA GCC CAC GGG-3' com o pSUPER.retro.puro (OligoEngine) como “backbone”</p>	<p>O’Connel, 2011</p>
<p>pSUPER-retro-<i>S100A10</i> shRNA5 (shRNA 5 para o <i>S100A10</i> em células humanas e de ratinho)</p>	<p>Clonagem dos primers: 5'-GAT CCC CAG AGT ACT CAT GGA AAA GGT TCA AGA GAC CTT TTC CAT GAG TAC TCT TTT TTA-3' e 5'- AGC TTA AAA AAG AGT ACT CAT GGA AAA GGT CTC TTG AAC CTT TTC CAT GAG TAC TCT GGG-3' com o pSUPER.retro.puro (OligoEngine) como “backbone”</p>	<p>O’Connel, 2011</p>
<p>pSUPER-retro-<i>S100A10</i> scramble (shRNA <i>scramble</i> para o <i>S100A10</i> em células humanas e de ratinho)</p>	<p>Clonagem dos primers: 5'-GAT CCC CGT GGG AGT TCA GAG CTT CTT TCA AGA GAA GAA GCT CTG AAC TCC CAC TTT TTA-3'e 5'-AGC TTA AAA AGT GGG AGT TCA GAG CTT CTT CTC TTG AAA GAA GCT CTG AAC TCC CAC GGG-3" com o pSUPER.retro.puro (OligoEngine) como “backbone”</p>	<p>O’Connel, 2011</p>

### 3.1.5 – Primers

**Tabela 3.3** - Descrição dos *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Sintetizado</b>
p36 RT PCR F	5' – CTCTACACCCCAAGTGCAT - 3'	63.9	Sigma
p36 RT PCR R	5' – TCAGTGCTGATGCAAGTTCC - 3'	64.1	Sigma
p11 RT PCR F	5' – AAATTCGCTGGGGATAAAGG – 3'	63.8	Sigma
p11 RT PCR R	5' – AGCCCACTTTGCCATCTCTA – 3'	63.7	Sigma
uPAR RT PCR F	5' – GCCTTACCGAGGTTGTGTGT – 3'	55.2	Nzytech
uPAR RT PCR R	5' – CATCCAGGCACTGTTCTTCA – 3'	54.7	Nzytech
uPA RT PCR F	5' – CACGCAAGGGGAGATGAA – 3'	56.8	Sigma
uPA RT PCR R	5' – ACAGCATTTTGGTGGTGACTT – 3	57.1	Sigma

### 3.1.6 - Material Biológico

#### 3.1.6.1 - Linhas celulares

**Tabela 3.4** - Descrição das linhas celulares utilizadas

<b>Identificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Origem</b>
MDA MB 231	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário	ATCC
MCF7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário	ATCC
Phoenix	Linha celular derivada das células 293T transformadas com adenovirus E1a	Allelebiotech

MDA Kd p11 – 1	Células MDA MB231 com o shRNA para o p11-1	Este estudo
MDA Kd p11 – 5	Células MDA MB231 com o shRNA para o p11-5	Este estudo
MDA Kd p11 - <i>scramble</i>	Células MDA MB231 com o shRNA para o p11- <i>scramble</i>	Este estudo

### 3.1.7 – Géis para SDS-PAGE

**Tabela 3.5** – Descrição da composição dos géis para SDS-PAGE

<i>Running gel</i>			<i>Stacking gel</i>	
[acrilamida:bisacrilamida]	9%	15%	[acrilamida:bisacrilamida]	5 %
1M Tris pH 8,8	3 ml	3 ml	1M Tris pH 6,5	312,5 µl
40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1)	1,8 ml	3 ml	40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1)	312,5 µl
Água destilada	3,1 ml	1,9 ml	Água destilada	1,8 ml
10% de SDS	80 µl	80 µl	10% de SDS	25 µl
25% de Persulfato de Amónia	32 µl	32 µl	25% de Persulfato de Amónia	12,5 µl
TEMED	12 µl	12 µl	TEMED	7,5 µl

## 3.2 – Métodos

### 3.2.1 - Cultura de células

Tendo as linhas celulares utilizadas características aderentes estas foram mantidas em meio DMEM (GIBCO<sup>®</sup>), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SIGMA<sup>®</sup>), penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml) e 2 mM de L-Glutamina (SIGMA<sup>®</sup>).

As células foram descongeladas a 37<sup>0</sup>C e colocadas em 10 ml de meio previamente aquecido, sendo de seguida centrifugadas em tubos de ensaio cónicos de 15 ml durante 5 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm) (800 g). Após centrifugação, aspirou-se o meio de modo a retirar o DMSO na sua totalidade. O *pellet* contendo as células foi então ressuspenso em 5 ml ou 15 ml de meio e colocadas em frascos T25 (Corning<sup>®</sup>) ou T75 (Corning<sup>®</sup>), respetivamente.

A cada dois ou três dias (dependendo do crescimento da linha celular) o meio antigo foi removido e substituído por meio novo sem que houvesse alteração pronunciada da coloração do meio (pH).

Para se proceder à passagem das células, após a remoção do meio antigo adicionou-se 5 ml (se frasco T75) ou 2 ml (se frasco T25) de tampão fosfato salino (PBS com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> da SIGMA<sup>®</sup>) tendo-se retirado o mesmo passado 1 minuto de agitação. O PBS permitiu remover alguns resíduos do meio antigo, incluindo o FBS que inativa a tripsina.

Adicionou-se 5 ml (se frasco T75) ou 1,5 ml (se frasco T25) de Tripsina-EDTA a 0,25% (SIGMA<sup>®</sup>) e incubou-se o frasco durante 3-5 minutos a 37 °C em atmosfera húmida e com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a incubação visualizou-se ao microscópio se as células se encontravam em suspensão e homogeneizou-se bem a solução de células e tripsina. Desta solução recolocou-se 0,5-1 ml (se frasco T75) ou 0,1-0,25ml (se frasco de T25) no frasco (dependendo do crescimento da linha celular) e perfez-se o restante volume com meio de cultura. No caso das linhas celulares com os shRNA também se adicionou, neste momento, a puromicina (10 mg/ml da SIGMA<sup>®</sup>) ao meio de cultura numa proporção de 1:5000 (concentração final de 2 µg/ ml de puromicina). Incubou-se o frasco a 37 °C em atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para estabelecimento de células para experiências e congelamento de células procedeu-se da seguinte forma: o restante volume de tripsina e células em suspensão foi colocado num tubo cónico de 15 ml e adicionou-se 2 ml de meio de cultura (de forma a que o FBS do meio de cultura inative a tripsina que é tóxica para as células). Centrifugou-se esta solução a 1500 rpm (800 g) durante 5 minutos e aspirou-se o sobrenadante de forma a remover a tripsina. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de DMEM homogeneizando-se muito bem. Pipetou-se 10 µl desta suspensão para um tubo *ependdordf* com 90 µl de azul de tripano (0,4 %) e homogeneizou-se bem. Pipetou-se 10 µl desta solução e encheu-se uma câmara de Neubauer de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Hausser Scientific). Após a visualização da câmara ao microscópio contou-se o número de células presentes em quatro quadrados de 1 mm<sup>2</sup>. A equação utilizada para determinar o número de células por milímetro cúbico foi: média do número de células em cada quadrado × Fator de diluição × 10<sup>4</sup> = número de células por ml.

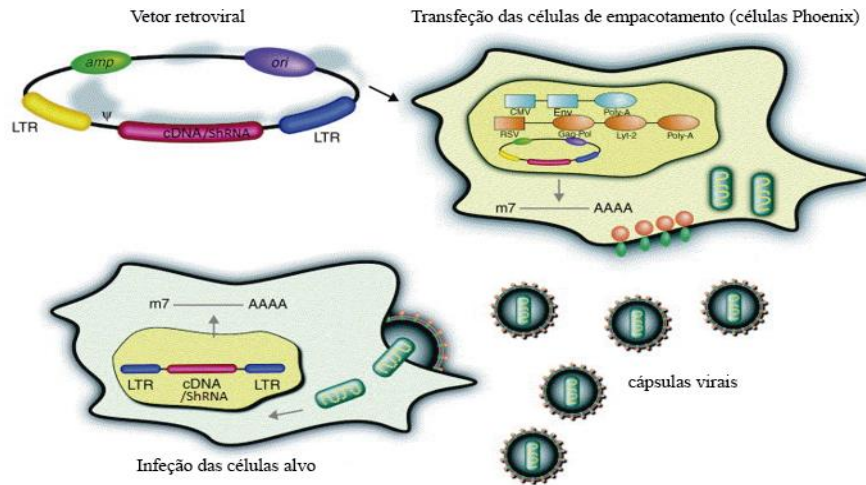
### **3.2.2 - Congelação de células**

As linhas celulares utilizadas neste estudo foram congeladas e mantidas numa solução criopreservante composta por FBS a 90 % e DMSO a 10 %. Após a tripsinização e contagem do número de células estas foram centrifugadas a 1500 rpm (800 g) durante 5 minutos e foi removido cuidadosamente todo o meio de cultura. De seguida ressuspendeu-se o *pellet* obtido na solução criopreservante, homogeneizando-se muito bem, e distribuiu-se 1 ml desta solução por cada tubo de congelação de 2 ml (VWR®). A densidade celular dispensada em cada um dos tubos de congelação foi de 2-3 × 10<sup>6</sup> células em 1 ml. Os tubos de congelação foram colocados num contentor Mr. Frosty™ a -80 ° C durante a noite, tendo sido transferidos para a arca a -150 ° C no dia seguinte.

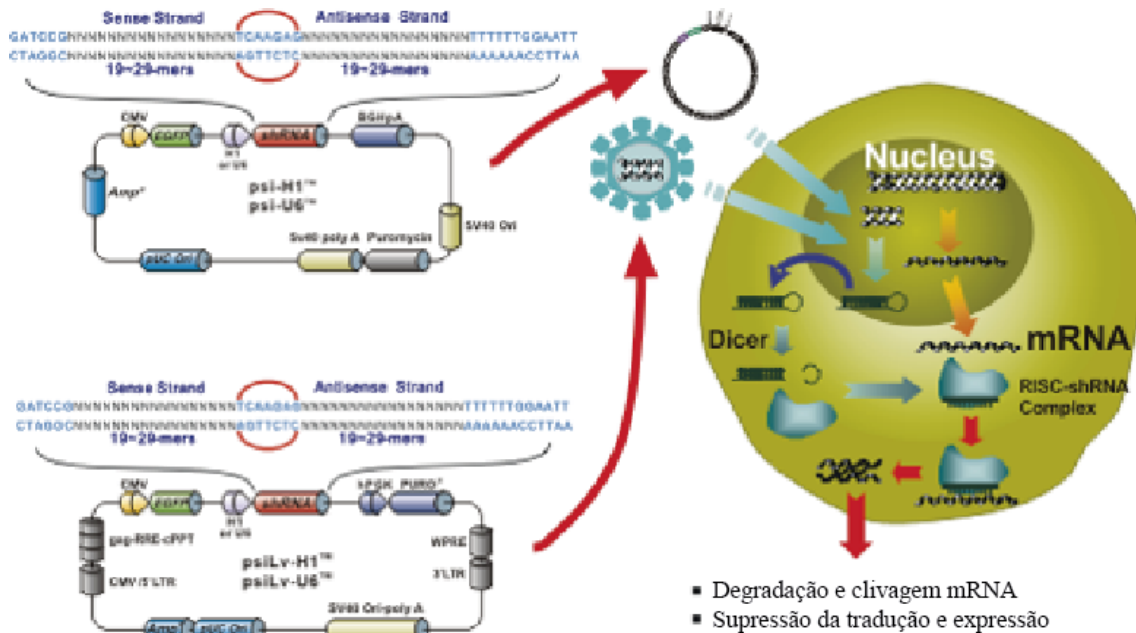
### **3.2.3 - Estabelecimento de linhas celulares *knockdown* para *S100A10***

De forma a estabelecer as linhas celulares *knockdown* e infetar as células alvo com os retrovírus contendo os shRNAs de interesse utilizou-se um sistema que produz retrovírus incompetentes. Neste sistema o nosso shRNA de interesse está inserido num plasmídeo retroviral e utilizaram-se as células de empacotamento Phoenix que permitem

a produção de partículas virais, representado na figura 3.1, sendo que, o mecanismo de atuação dos shRNAs se encontra descrito na figura 3.2.



**Figura 3.1 - Sistema retroviral células Phoenix** - O gene de interesse é clonado no local de clonagem múltipla de um vetor retroviral que contém também um sinal de empacotamento e um marcador de resistência a um antibiótico para a seleção. As linhas celulares de empacotamento (células Phoenix, p.e.) transfetadas com este vetor retroviral contendo o gene de interesse ou um vetor controle, produzem o RNA retroviral transformando o vetor retroviral num vírus infeccioso mas incompetente. Isto é uma consequência da integração estável dos genes virais necessários para a replicação e a formação de partículas no genoma viral (partículas GAG, POL, ENV) no genoma das células Phoenix. Mais tarde o meio de cultura contendo as partículas retrovirais contendo o vetor plasmídico é usado para infectar de células-alvo. Após a seleção com o antibiótico, as células alvo são testadas quanto à expressão da proteína codificada pelo gene de interesse e os seus efeitos biológicos. (Adaptado de Deregowski, 2008)



**Figura 3.2 - Mecanismo de estabelecimento de knockdown através de shRNA** - Uma vez a célula alvo seja infectada com o vetor retroviral e que este se encontre integrado no genoma do hospedeiro, o shRNA é então transcrito no núcleo. Após a transcrição, a sequência do shRNA é exportada para o citoplasma, onde é reconhecido por uma enzima endógena, Dicer, que processa o shRNA em duas cadeias de siRNA, uma sense e a outra antisense. A cadeia sense é degradada. A cadeia antisense, complementar do mRNA alvo a silenciar, vai-se ligar ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex). O complexo RISC vai sinalizar a sequência de mRNA que irá ser silenciada através de clivagem ou repressão da tradução (Adaptado de Moore, 2010)

As células Phoenix foram descongeladas, como descrito acima, e colocadas em cultura em frascos T25 até atingirem 80% confluência. Num tubo cônico de 15 ml colocou-se 250 µl de DMEM sem FBS e adicionou-se 12 µl do reagente FuGENE® 6 deixando-se a incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após incubação, transferiu-se esta mistura para um *ependdorff* contendo 4 µg de DNA plasmídico (tabela 3.2) e 250 µl de DMEM sem FBS homogeneizando muito bem e deixando-se a incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos. Enquanto decorreu a incubação removeu-se o meio de cultura das células Phoenix e adicionou-se 3,5 ml de DMEM desprovido de FBS. Decorrida a incubação adicionou-se a mistura de FuGENE e DNA plasmídico ao frasco com as células Phoenix e deixou-se a incubar a 37 °C em atmosfera húmida e com 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4-6 horas. Terminada a incubação removeu-se o meio das células Phoenix e adicionou-se 5 ml de meio DMEM completo (suplementado com FBS, penicilina, estreptomicina e L-Glutamina) deixando-se a incubar a 37 °C em atmosfera húmida e com 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Após 24 h da transfeção das células Phoenix, foram colocadas em cultura células MDA MB231 em frascos T25 por forma a estarem 60-70% confluentes no dia seguinte.

Decorridas as 48 h da transfeção das células Phoenix filtrou-se o meio de cultura das mesmas, recorrendo a um filtro de 0,45 µm. De seguida, removeu-se o meio de cultura às células a infetar (MDA MB231) e colocou-se o meio das Phoenix já filtrado em cada um dos frascos correspondentes. Após a infeção das células alvo adicionou-se 5 µl de Polybrene® (SIGMA) (10 mg/ ml) a cada um dos frascos de forma a aumentar a eficiência da infeção. Incubaram-se os frascos com células infetadas a 37 °C em atmosfera húmida e com 5 % de CO<sub>2</sub>. Decorridas 48h da infeção adicionou-se 2 µg/ ml de puromicina a cada um dos frascos de forma a iniciar a seleção das células com shRNA alvo. As células foram mantidas em cultura até se obterem linhas celulares estáveis.

As linhas celulares *knockdown* para *S100A10* foram posteriormente testadas por *Western-blotting* de forma a confirmar a eficácia dos *knockdowns*.

#### **3.2.4 - Lisados celulares proteicos**

Para realização dos ensaios de hipóxia foram plaqueadas células em placas de 35 mm numa densidade de  $3 \times 10^5$  células por placa. Decorridas 24h iniciaram-se os

tratamentos com o  $\text{CoCl}_2$  a 200  $\mu\text{M}$  ou introduziram-se as placas numa câmara de hipóxia real (1%  $\text{O}_2$ ) de acordo com os tempos estabelecidos.

Concluída a incubação em condições de hipóxia (química ou real) recolheram-se os lisados celulares proteicos de cada uma das placas. Para tal, inicialmente removeu-se o meio de cultura de cada uma das placas e lavou-se com 2 ml de PBS com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . De seguida, adicionou-se 150  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (composição descrita na secção 3.1.2- soluções tampão) a cada uma das placas e, com o auxílio de um raspador, raspou-se vigorosamente a superfície das placas transferindo-se o conteúdo obtido para os tubos *epppendorf* correspondentes. Deixaram-se os lisados a incubar em gelo durante 10 minutos e após a incubação centrifugaram-se durante 15 minutos a 13000 rpm (12000 g) a 4 °C. Após a centrifugação, separaram-se os sobrenadantes obtidos para novos tubos *epppendorf* e guardaram-se na arca a - 80 °C.

### **3.2.5 - Doseamento de proteínas**

As proteínas das amostras foram quantificadas através do Pierce® *BCA Protein Assay Kit* de acordo com as instruções do fabricante.

O método utilizado baseia-se na redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  pelas proteínas em ambiente alcalino (reação do Biureto). Esta reação promove a deteção sensível e seletiva do ião cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) pela solução do reagente que contém ácido bicinconínico (BCA). A reação estequiométrica combina duas moléculas de BCA por cada ião cuproso, formando um complexo molecular que exhibe uma forte absorvância a 562 nm que é diretamente proporcional à concentração proteica.

A curva de calibração foi estabelecida para uma gama de concentrações de interesse (0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  – 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) utilizando a albumina do soro bovino (bovine serum albumin, BSA), fornecida pelo fabricante, como padrão. Utilizou-se sempre também uma solução de referência contendo água. A solução de trabalho foi preparada numa proporção de 50:1 entre o reagente A (BCA em tampão bicarbonato) e reagente B (solução aquosa de sulfato de Cobre a 4%) respetivamente. Adicionou-se 8  $\mu\text{l}$  da solução de trabalho a 1  $\mu\text{l}$  de cada amostra (já previamente diluída a 1:10), padrão ou referência homogeneizando bem. Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a 37 °C e, terminado o tempo de incubação, fez-

se a leitura a um comprimento de onda de 562 nm utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop2000c* (Thermo-Scientific®).

### **3.2.6 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Os géis de separação foram preparados com 40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1) (AppliChem®), 1M Tris (pH 8,8), 10% de SDS (AppliChem®), 25% de Persulfato de Amônia (Sigma®), TEMED (AppliChem®) e água destilada. As concentrações finais dos géis de resolução (*running gels*) variou entre 9% a 15% de acrilamida:bisacrilamida (29:1). Quanto ao gel *stacking* o tampão utilizado foi 1M Tris (pH 6,5) e a concentração final foi de 5% de acrilamida:bisacrilamida (29:1).

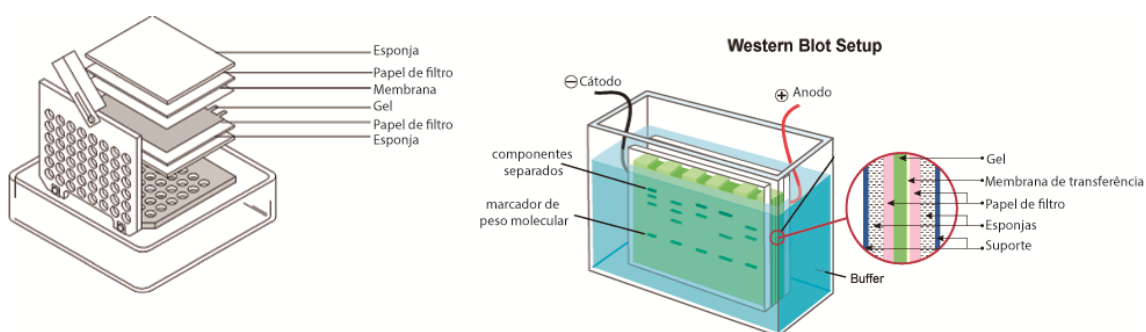
Colocaram-se os géis preparados no suporte *Mini-Protean* (BioRad®), seguindo as instruções do fabricante, e adicionou-se o tampão de eletroforese (composição descrita na secção 3.1.2-soluções tampão) até os géis estarem completamente submersos. Carregaram-se os géis com 18µl de amostra (20-30 µg de proteína conforme indicado) por poço e 3µl de marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Biorad®). A voltagem aplicada para a migração foi de 100V (entre 0,05-0,08A) até as amostras entrarem no gel de resolução após esse período aumentou-se a voltagem para 120-130V, mantendo a corrente entre 0,05-0,08A.

Para preparar as amostras para serem carregadas no gel pipetou-se o equivalente a 20 µg por poço (para as amostras das células MDA MB 231) ou 30 µg por poço (para as amostras das células MCF7) perfazendo com água milipore para um tubo *ependorf* e adicionou-se o mesmo volume/ou quarta parte do volume de 2×/ou 4× tampão *loading* de proteínas (composição descrita na secção 3.1.2- soluções tampão). De seguida, ferveram-se as amostras a 96 °C durante 5-10 minutos.

### **3.2.7 - Western-Blotting**

Para realizar a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm BioTrace™ NT (Pall Corporation®) colocou-se um suporte com uma placa de gelo e aplicou-se a voltagem de 100V (0,25-0,4A) durante 1h10min (de acordo com o esquema representado na figura 3.3). Terminada a transferência, bloqueou-se a membrana

com 5% de leite em pó magro dissolvido em Tampão de Tris salino – Tween 20 (TBS-T) durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. De seguida incubou-se a membrana com o anticorpo primário dissolvido numa solução de 5% de leite magro/ TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C, com agitação. Lavou-se a membrana quatro vezes com 5-10 ml de TBS-T, 5 minutos por lavagem e repetiu-se o processo de incubação de 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário adequado conjugado à peroxidase HRP. Lavou-se a membrana cinco vezes com 5-10 ml de TBS-T, 5 minutos por lavagem.



**Figura 3.3 - Ilustração do esquema de montagem de transferência de proteínas** – A transferência é efetuada através de um campo elétrico orientado perpendicularmente à superfície do gel levando as proteínas a moverem-se desde o gel para a membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose é colocada em sandwich entre o gel e o eletrodo positivo. A sandwich inclui dois papéis de filtro e duas esponjas cada um deles em cada uma das extremidades. A ligação das proteínas à membrana é baseada em interações hidrofóbicas e também em interações de cargas entre a membrana e as proteínas. (Adaptado de <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>; <http://www.antibodiesonline.com/resources/17/1224/Western+blotting+immunoblot+Gel+electrophoresis+for+proteins>).

Na deteção de quimioluminescência utilizou-se uma solução ECL (enhanced chemiluminescence) composta por uma mistura, numa proporção de 1:1, de duas soluções: a solução I (100mM Tris pH 8,5; 2,5mM luminol; 360 µM ácido p-cumárico) e a solução II (100mM Tris pH 8,5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,0185%). Cobriram-se completamente as membranas de nitrocelulose com a solução ECL durante 1-5 minutos. A visualização das bandas proteicas foi efetuada utilizando o equipamento ChemiDoc™ XRS (BioRad®) de acordo com as especificações do fabricante.

A incubação da membrana foi feita com os anticorpos anti-p11 (diluição de 1:200) da *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, anti-p36 (diluição de 1:500), anti-β tubulina (diluição de 1:1000), anti-HIF1α (diluição de 1:300), anti-actina (diluição de 1:500), anti-uPA (diluição de 1:300), anti-uPAR (diluição de 1:300) e anti-p11 (diluição de 1:1000) da *BD*

*Biosciences*<sup>®</sup>. Os anticorpos secundários foram utilizados numa diluição de 1:5000. Na tabela 3.1, indicam-se as referências de todos os anticorpos utilizados.

### 3.2.8 - Citometria de fluxo

Investigaram-se os níveis de expressão das proteínas anexina A2 e S100A10 na membrana celular por análise de *FACS* (*Fluorescent Activated Cell Sorter*- Citometria de fluxo), uma vez que são os níveis do heterotetrâmero de anexina A2 à superfície celular que são responsáveis pela sua função como recetor de plasminogénio. Para estas experiências submeteram-se as linhas celulares cancerígenas a condições de normóxia (20% O<sub>2</sub>) e hipóxia química (200 µM CoCl<sub>2</sub>).

Foram plaqueadas 5 placas de 35 mm com uma densidade de 3×10<sup>5</sup> células/ placa. Sendo que, umas das placas serviu de controlo negativo IgG, as outras duas placas não sofreram qualquer tipo de tratamento e as restantes foram incubadas em condições de hipóxia química (adicionando 200 µM CoCl<sub>2</sub>) durante 48 horas. Cada uma das duas placas que sofreram e que não sofreram tratamentos foram utilizadas para analisar a expressão de anexina A2 e S100A10 à superfície celular. Este procedimento foi efetuado para as linhas celulares MDA MB 231 e MCF7.

Depois de decorrido o tempo dos tratamentos, lavaram-se as células com 2 ml de PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Removeu-se o PBS e adicionou-se 1 ml de uma solução de formaldeído a 4 % em PBS em cada placa. Rasparam-se gentilmente as células e transferiu-se o conteúdo de cada placa para o respetivo tubo *ependorf*. Incubaram-se os tubos *ependorf* durante 10 minutos à temperatura ambiente com agitação. Após a incubação centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm (1500 g) durante 5 minutos a 4 ° C e descartaram-se os sobrenadantes. Adicionou-se 200 µl de PBS com anticorpo IgG (Calbiochem<sup>®</sup> Normal Rabbit IgG) numa diluição de 1:33 a cada uma das amostras. Incubaram-se as amostras durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação.

Terminada a incubação centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm (1500 g) durante 5 minutos a 4 ° C e removeram-se os sobrenadantes. Adicionou-se 100 µl de PBS com anticorpo anti-p36 ou anticorpo anti-p11 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*) numa diluição de 1:33 às amostras correspondentes (uma das duas amostras que não sofreu tratamento e outra das amostras que sofreu tratamento de hipóxia irão ser testadas para a anexina A2

e outras duas para o S100A10). Incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação. Concluída a incubação, centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm (1500 g) durante 5 minutos a 4 ° C e descartaram-se os sobrenadantes. Lavaram-se as amostras duas vezes com 500 µl de PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, sendo que, no final de cada lavagem centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm (1500 g) durante 5 minutos a 4 ° C e removeram-se os sobrenadantes.

Concluídas as lavagens adicionou-se uma solução de 100 µl de PBS com anticorpo Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, de acordo com a origem dos anticorpos primários (cabra e ratinho), numa diluição de 1:50 a cada uma das amostras. Incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação e ao abrigo da luz. Terminada a incubação repetiu-se o passo anterior das duas lavagens com PBS. Ressuspendeu-se cada um dos *pellets* em 500 µl de PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>.

Analisou-se a expressão de anexina A2 e S100A10 à superfície celular recorrendo ao filtro FL1 530/30 no citómetro de fluxo *BD FACSCalibur*<sup>™</sup> de acordo com as especificações do fabricante.

### **3.2.9 - Imunocitoquímica**

Para além da análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por *FACS* também se optou por investigar os mesmos por um método distinto, isto é, por imunocitoquímica.

Para tal, foram plaqueadas duas placas de 60 mm cobertas com 5 lamelas na sua superfície com uma densidade de 6 x 10<sup>5</sup> células/placa para cada linha celular. Uma das placas foi mantida em condições de normóxia (20% O<sub>2</sub>) e a outra foi submetida a condições de hipóxia química (200 µM CoCl<sub>2</sub>) durante 48 horas. Decorridos os tempos dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS contendo Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e de seguida adicionou-se solução fixadora composta por formaldeído a 2% tendo-se deixado a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente com agitação. Concluída a fixação das células lavaram-se as mesmas duas vezes com PBS com Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. De seguida, adicionou-se o anticorpo IgG bloqueante (Calbiochem<sup>®</sup> Normal Rabbit IgG numa diluição 1: 500) tendo-se deixado a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação constante. Após incubação, removeu-se o anticorpo IgG e adicionaram-se os anticorpos

primários correspondentes a cada uma das lamelas, sendo que a uma das lamelas não foi adicionado qualquer tipo de anticorpo primário pois constitui o controlo negativo IgG. Após incubação de 1 a 2 horas removeram-se os anticorpos primários e efetuaram-se quatro lavagens com a mesma solução usada anteriormente. De seguida, adicionaram-se os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 correspondentes de acordo com as respetivas origens dos primários (cabra e ratinho). Deixaram-se a incubar as lamelas com os anticorpos secundários à temperatura ambiente, com agitação e protegidas da luz durante 1 hora. Concluída a incubação efetuaram-se mais quatro lavagens com PBS e montaram-se as lamelas com o meio de montagem Clear-Mount™ (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante.

As lâminas foram observadas no microscópio *Axiomager Z2* (Carl Zeiss) utilizando um filtro FL 38HEGFP. Para registar as fotografias recorreu-se ao software *AxioVision* tendo sempre em conta as especificações do fabricante.

A incubação das lamelas foi efetuada com os seguintes anticorpos primários todos eles numa diluição de 1:200: anti-p11 e anti-p36 da *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* Os anticorpos secundários utilizados foram os Alexa Fluor 488, de acordo com a origem dos anticorpos primários (cabra e ratinho), numa diluição de 1:2000.

### **3.2.10 - Ensaio de actividade da plasmina**

Foi investigada a importância do AII<sup>t</sup> na ativação de plasmina à superfície de células cancerígenas hipóxicas. Para tal, submeteram-se as células *knockdown* para o *S100A10* e *scramble* (células controlo) a condições de hipóxia química (200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>). A estas células adicionou-se o plasminogénio (feito em casa) e um substrato de plasmina, nomeadamente S2251 (Deltaclon SL.; ref: VA13). O S2251 quando clivado pela plasmina produz um produto cromogénico que pode ser quantificado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 405 nm ao longo do tempo. No último ensaio da actividade da plasmina efetuado, também se adicionou uPA (SIGMA) no mesmo momento em que se adicionou o plasminogénio.

Plaqueou-se uma placa de 96 poços com as linhas celulares MDA Kd p11-1, MDA Kd p11-5 e MDA Kd p11-*scramble*. Parte da placa foi tratada com 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> (hipóxia química) durante 48 horas e a outra não foi tratada.

Depois de decorrido o tempo dos tratamentos, retirou-se o meio de cultura a cada um dos poços. Posteriormente, lavaram-se os poços com 100 µl de tampão de incubação (composição descrita na secção 3.1.2-soluções tampão). De seguida adicionou-se 50 µl de uma solução composta pelo tampão de incubação e 2,5 µl de plasminogénio (2,22 mg/ml) em cada poço das 6 primeiras colunas de cada uma das placas. Às restantes colunas apenas foi adicionado 50 µl de tampão de incubação. Incubou-se a placa durante 15 minutos a 37 °C. Concluída a incubação, adicionou-se 50 µl de uma outra solução composta pelo tampão de incubação e 2,5 µl de S2251 (10 mM) em todos os poços e efetuou-se a leitura a 405 nm usando um leitor de microplacas *Infinite® M200* (Tecan), a cada 30 segundos durante 1h30min.

No último ensaio de actividade de plasmina efetuado, no mesmo momento em que foi adicionado o plasminogénio também foi adicionado uPA (20 nM).

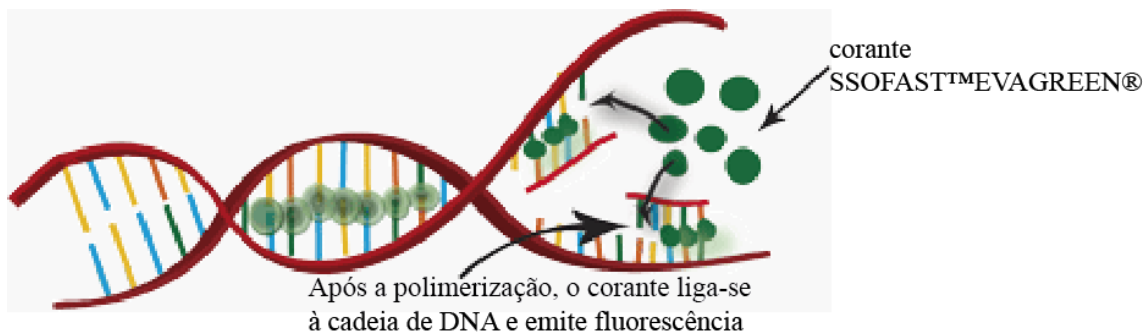
### **3.2.11 - PCR quantitativo em Tempo real (qRT-PCR)**

De forma a verificar se a transcrição dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA*, e *uPAR* sofriam alterações com a exposição das células a condições de hipóxia foi utilizado o método de PCR quantitativo em tempo real. Esta técnica é altamente sensível e permite a quantificação de transcritos raros bem como de pequenas mudanças na transcrição de genes (Livak, 2001). O método de quantificação baseia-se na transcrição relativa do gene alvo *versus* o gene de referência, nomeadamente um gene *housekeeping*.

As reações são caracterizadas pelo ciclo de PCR em que a amplificação do gene alvo é detetada. O ponto que deteta o número de ciclos nos quais a reação atinge o limiar da fase exponencial é designado por *Cycle Threshold* ( $C_T$ ), ou seja, o valor de tempo/ciclos em que a intensidade de fluorescência é superior à fluorescência base. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível com base na fluorescência obtida. Consequentemente, quanto mais elevada a quantidade de DNA na amostra inicial (ou a expressão dos genes em estudo), mais rapidamente surge um aumento de sinal de fluorescência, originando um  $C_T$  mais baixo.

O composto fluorescente utilizado neste trabalho é o SsoFast™EvaGreen®Supermix (Biorad), que se intercala reversivelmente com a cadeia dupla do DNA. Quando o corante SsoFast™EvaGreen® se liga ao DNA, a intensidade das emissões fluorescentes aumentam.

Quanto mais DNA for amplificado, maior o nível de emissão de fluorescência. Como tal, os valores de fluorescência gravados durante cada ciclo representam a quantidade de produto amplificado (figura 3.4).



**Figura 3.4 - Esquema representativo método de detecção do SSOFAST™EVAGREEN®SUPERMIX-** O princípio por trás do método do SSOFAST™EVAGREEN® é de que, à medida que processo de amplificação por PCR progride, há um aumento de intensidade de fluorescência emitida pelo SSOFAST™EVAGREEN®. Como o corante SSOFAST™EVAGREEN® se liga aos produtos de amplificação de cadeia dupla, ocorre uma alteração conformacional no fluorocromo que conduz à emissão de fluorescência de elevada intensidade (adaptado de [http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi\\_s03\\_m05\\_07\\_a.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm)).

Para realizar o ensaio foram colocadas em cultura as linhas celulares em estudo (MDA MB231 e MCF7) em placas de 35 mm. As células foram submetidas a tratamentos com 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> nos vários tempos indicados na figura 4.5. Após os tratamentos, foi realizada a extração de RNA total de cada uma das placas utilizando 500  $\mu$ l do reagente PureZOL® (Biorad) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação de RNA obtido foi feita a partir de 1  $\mu$ l da solução de RNA diluída em água DEPC (dietilpirocarbonato) e lida no espectrofotómetro *NanoDrop2000c* nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza de RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,8, e a quantificação de RNA foi obtida a partir da seguinte fórmula: [RNA]=A<sub>260</sub> x fator de diluição x 40  $\mu$ g/ml.

Depois da extração de RNA e respetiva quantificação, procedeu-se à transcrição reversa de cada amostra para produzir cDNA. Para tal utilizou-se o *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Nzytech®) seguindo as instruções do fornecedor. A tabela 3.5 indica a composição da reação.

A mistura de cada reação foi a incubar durante 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 52 °C e posteriormente inativada através do aquecimento a 85 °C durante 5 minutos sendo

de seguida colocada em gelo. Após inativação foi adicionado 1 µl de NZY Rnase H seguindo-se uma incubação a 37 °C durante 20 minutos e novamente inativação da reação colocando as amostras a 85 °C durante 5 minutos. As amostras foram posteriormente armazenadas a - 20 °C.

**Tabela 3.6** - Componentes da reação para síntese de cDNA.

<b>Componentes da reacção</b>	<b>Volume (10 µl)</b>
NZYRT 2x Master mix (Inclui oligo(dT) <sub>18</sub> , <i>random hexamers</i> , MgCl <sub>2</sub> e dNTPs)	5 µl
NZYRT Enzyme mix (Inclui NZY Transcriptase Reversa e NZY inibidor Ribonuclease)	1 µl
RNA extraído	0,5 µg
Água DEPC	Até perfazer volume final de 10 µl

A amplificação dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA*, e *uPAR* ocorreu no termociclador *CFX96™ Real-Time PCR Detection Sistem* (BioRad). O *housekeeping gene* utilizado foi o GAPDH. Os primers utilizados encontram-se descritos na Tabela 3.3.

A composição da mistura reacional para o PCR em Tempo Real é indicada na Tabela 3.6.

**Tabela3.7** - Componentes e respetivas quantidades para a reação de PCR em Tempo Real.

<b>Componentes</b>	<b>Volume (10 µl)</b>
SsoFast™EvaGreen®Supermix (Biorad)	5 µl
<i>Primer forward</i> (10 ng/ µl)	2 µl
<i>Primer reverse</i> (10 ng/ µl)	2 µl
cDNA (1 µg/ µl)	1 µl

A reação foi feita com a desnaturação inicial a 95 °C durante 20 segundos, seguida de 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60 °C, finalizando com 5 segundos com aumento temperatura de 65 °C até 95 °C para a extensão final.

### **3.2.12 – Análise estatística**

A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t* de Student. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados encontram-se expressos em média +/- *Standard deviation* (SD, desvio padrão).

## 4 – Resultados

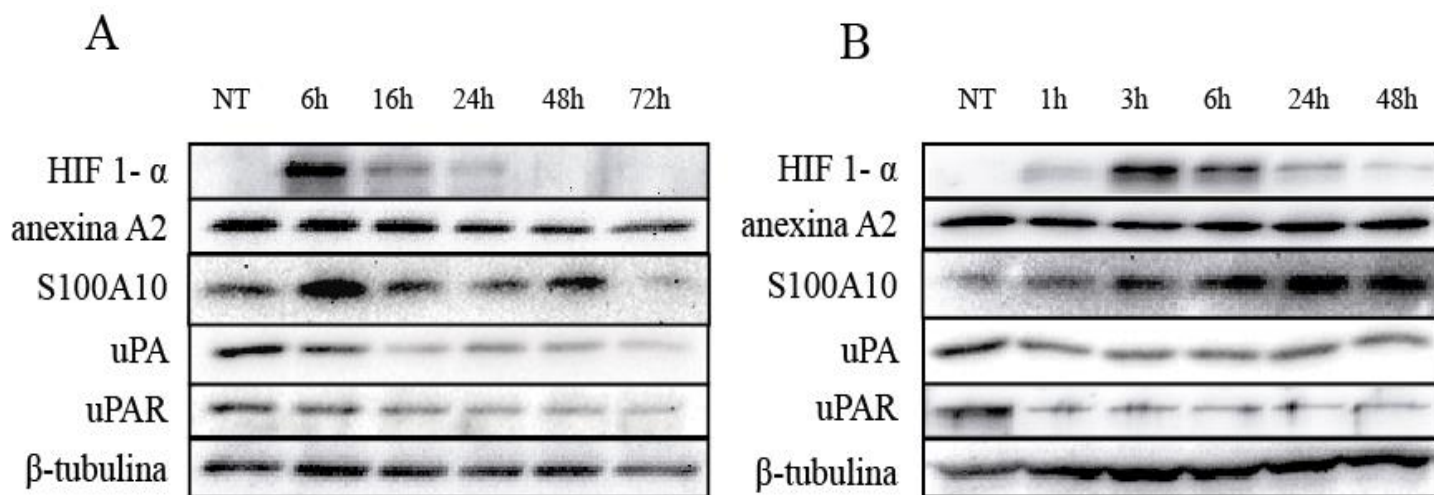
### 4.1 – Análise da expressão do AIIIt em linhas celulares de cancro da mama submetidas a condições de hipóxia *versus* normóxia

Inicialmente, de forma a investigar se haveria uma alteração dos níveis de expressão do AIIIt em células cancerígenas hipóxicas, submetem-se as linhas celulares MCF7 e MDA MB 231 a condições de normóxia ou hipóxia por diferentes períodos de tempo (*time course*). O ambiente hipóxico foi obtido através de dois métodos distintos: hipóxia química ou hipóxia real. O método da hipóxia química consistiu na adição de Cloreto de Cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) a 200  $\mu\text{M}$  ao meio de cultura, ao passo que, a hipóxia real foi obtida através da incubação das células em incubadoras de hipóxia (1% de  $\text{O}_2$ ). Após a incubação das células de cancro da mama em normóxia ou hipóxia por diferentes períodos de tempo (representados nas figuras 4.1 a 4.4), foram preparados lisados proteicos destas células que foram submetidos a SDS-PAGE. Em seguida, a expressão das proteínas anexina A2, S100A10, uPA e uPAR foi analisada por *western blotting*. Analisaram-se também os níveis de expressão do marcador de hipóxia HIF1- $\alpha$  e os níveis de actina/ $\beta$  tubulina por análise de *western blot*. A análise da actividade de marcadores de hipóxia constituiu um controlo importante para mostrar que as células estavam realmente sob condições de hipóxia. A análise dos níveis de actina/ $\beta$  tubulina permitiu confirmar que a quantidade de proteína total de cada amostra foi idêntica.

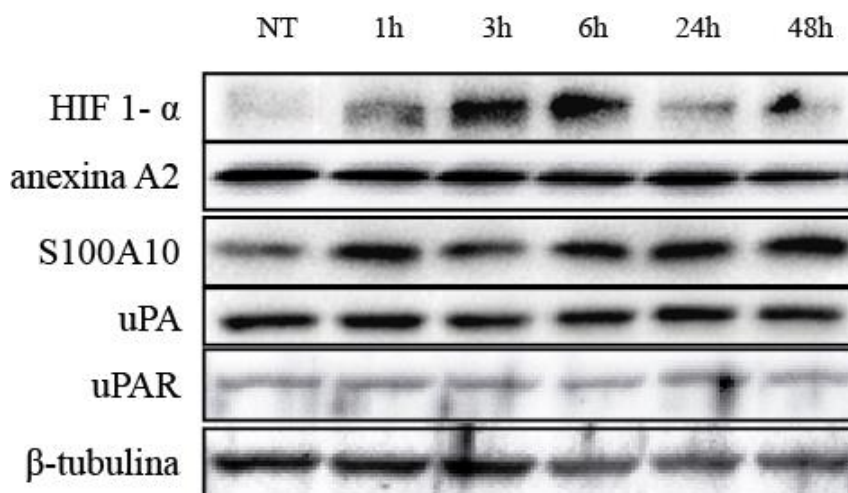
Os resultados destas experiências encontram-se representados nas Figuras 4.1 a 4.4.

A partir dos resultados representados nas figuras 4.1 a 4.4 é possível observar que ocorreu um aumento da expressão de S100A10 nas células MDA MB 231 e MCF7 quando expostas a condições de hipóxia (quer química, quer real) comparadas com as que cresceram em condições de normóxia. Nestas experiências verificou-se ainda que a expressão da anexina A2 não se alterou significativamente nas células submetidas à hipóxia real ou química comparativamente com as que cresceram em condições de normóxia. No entanto, a expressão de uPA e uPAR nas células MDA MB 231 decresceu nos ensaios efetuados em condições de hipóxia química a partir das 6h (primeiro *time point* de hipóxia da experiência) na experiência representada na figura 4.1A e logo após 1h na experiência representada na figura 4.1B. É de salientar que nestas mesmas células quando efetuada a experiência em hipóxia real os níveis de expressão de uPA e uPAR

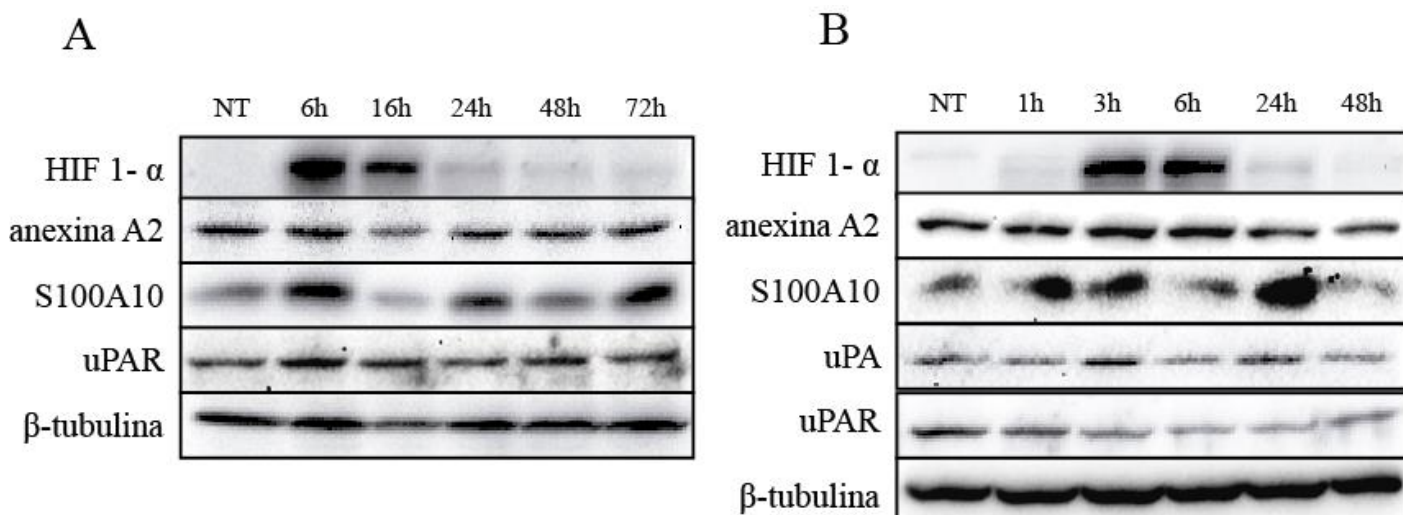
permaneceram constantes ao longo do tempo (figura 4.2). Para além disso, também é possível verificar que em qualquer um destes ensaios ocorreu uma indução significativa do principal fator de transcrição induzido durante a resposta hipóxica, HIF 1- $\alpha$ .



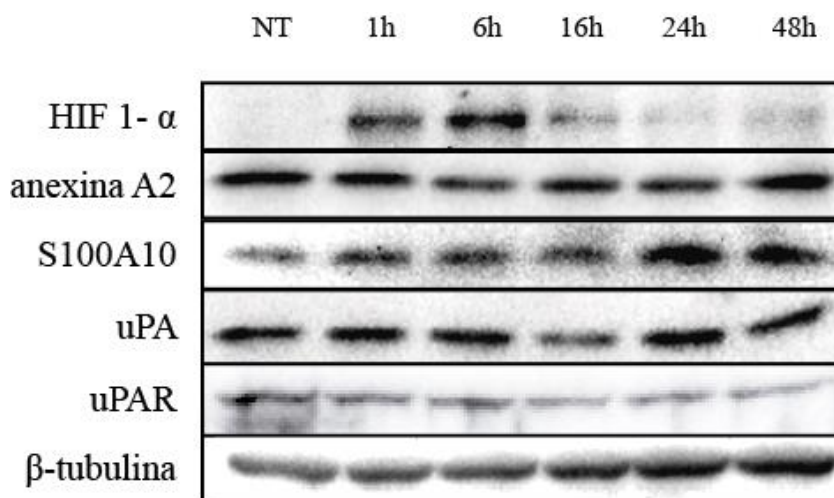
**Figura 4.1 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MDA MB 231 submetidas a condições de normóxia (NT) ou hipóxia química** - Células MDA MB 231 foram não tratadas (NT) ou tratadas com 200  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (1h, 3h, 6h, 16h, 24h, 48h e 72h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 20  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de western-blotting com os anticorpos indicados na figura. Figura representativa de 3 experiências independentes.



**Figura 4.2 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MDA MB 231 submetidas a condições de normóxia (NT) ou hipóxia real** - As células MDA MB 231 foram incubadas em condições normóxicas (NT, não tratadas) ou incubadas em incubadora de hipóxia (1%  $\text{O}_2$ ) por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (1h, 6h, 16h, 24h e 48h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 20  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de western-blotting com os anticorpos indicados na figura.



**Figura 4.3 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MCF7 submetidas a condições de normóxia (NT) ou hipóxia química** - Células MCF7 foram não tratadas (NT) ou tratadas com 200  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (1h, 3h, 6h, 16h, 24h, 48h e 72h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 30  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de western-blotting com os anticorpos indicados na figura. Figura representativa de 3 experiências independentes.



**Figura 4.4 - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MCF7 submetidas a condições de normóxia (NT) ou hipóxia real** - As células MCF7 foram incubadas em condições normóxicas (NT, não tratadas) ou incubadas em incubadora de hipóxia (1%  $\text{O}_2$ ) por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (1h, 6h, 16h, 24h e 48h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 30  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de western-blotting com os anticorpos indicados na figura.

## 4.2 – Análise da transcrição de *anexina A2* e *S100A10* em células de cancro da mama sob condições de hipóxia versus normóxia

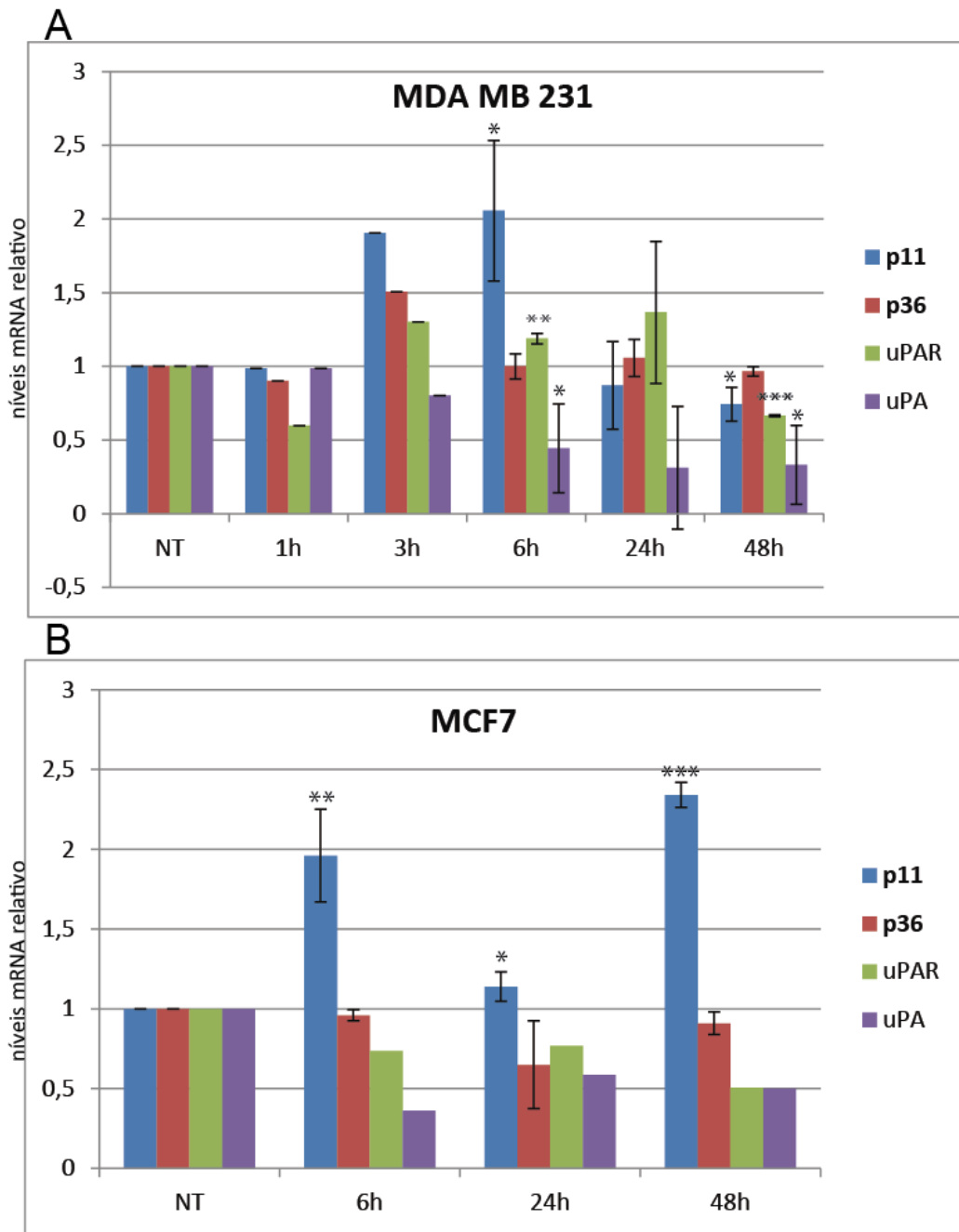
Posteriormente, de forma a perceber se o aumento de expressão de *S100A10* em células do cancro da mama quando submetidas a condições de hipóxia se devia a um aumento da transcrição do gene que codifica para esta proteína, procedeu-se à técnica de PCR em tempo real quantitativa analisando os genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA* e *uPAR*. Para tal, submeteram-se as células MDA MB 231 e MCF7 a condições de normóxia ou hipóxia química por diferentes períodos de tempo (indicados na figura 4.5) extraíndo-se, de seguida, o RNA das mesmas. Após extração do RNA procedeu-se à transcrição reversa de cada amostra de forma a produzir o cDNA. Em seguida analisou-se a transcrição dos genes alvo através da técnica de PCR em tempo real quantitativa. Utilizou-se o gene *GAPDH* (gene *housekeeping* eleito) para normalizar as amostras

Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.5.

A partir da análise dos gráficos da figura 4.5 é possível constatar que ocorreu uma regulação transcricional dos genes que codificam as proteínas *S100A10*, *uPAR* e *uPA* em ambas as linhas celulares quando sujeitas a condições de hipóxia química comparativamente com normóxia.

Considerando os resultados das células MDA MB 231 verifica-se que ocorreu o aumento da transcrição do *S100A10* logo após 3h de exposição ao  $\text{CoCl}_2$  sendo que observou-se o maior aumento transcricional às 6h. A partir das 24h observa-se um declínio na quantidade de *S100A10*. Os níveis de mRNA de *anexina A2* ao longo da experiência não sofreram alterações significativas. Os níveis de mRNA do *uPAR* e *uPA* diminuíram ao longo do tempo de exposição ao  $\text{CoCl}_2$ , sendo que, o *uPA* decresceu de uma forma mais pronunciada.

Relativamente aos resultados das células MCF7 observou-se mais uma vez um aumento significativo do *S100A10* às 6h, tendo este diminuído às 24h para novamente aumentar às 48h. Nestas células os níveis de mRNA de *anexina A2* permaneceram constantes ao longo do tempo. Observando os valores de mRNA de *uPAR* e *uPA*, mais uma vez, se verifica que estes diminuíram ao longo do tempo de exposição ao  $\text{CoCl}_2$ .



**Figura 4.5 - Análise da transcrição dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPAR* e *uPA* por qRT-PCR nas células MDA MB 231 (A) e MCF7 (B) em condições de normóxia (NT) e hipóxia química (200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) nos tempos indicados** - Células MDA MB 231 (A) e MCF7 (B) foram não tratadas (NT) ou tratadas com 200  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (1h, 3h, 6h, 24h e 48h). De seguida foi extraído o RNA das mesmas (método PureZOL<sup>®</sup>, Biorad) e procedeu-se à transcrição reversa de cada amostra de forma a produzir o cDNA (NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit, Nzytech<sup>®</sup>). A transcrição dos genes alvo versus o gene *GAPDH* (gene housekeeping eleito) foi analisada através da técnica de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR). Os resultados encontram-se expressos em quantidades relativas de mRNA da *anexina A2*, *S100A10*, *uPAR* e *uPA* comparativamente às células em normóxia (NT). No gráfico (A) os valores da *anexina A2*, *S100A10*, *uPAR* e *uPA* nos pontos NT, 6h, 24h e 48h encontram-se expressos em média +/- o desvio padrão sendo que o N=2. No mesmo gráfico (A) mas nos pontos 1h e 3h o N=1 para todos os genes analisados. No gráfico (B) apenas a *anexina A2* e o *S100A10* se encontram representados em média +/- o desvio padrão em todos os pontos, sendo que o N=2. No mesmo gráfico (B) os restantes genes analisados (*uPAR* e *uPA*) o N é sempre igual a 1. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t* Student : \*\*\* P < 0,001; \*\* P < 0,01 e \* P < 0,05; A análise estatística foi efetuada entre os valores observados durante o tratamento com CoCl<sub>2</sub> a diferentes tempos relativamente às células não tratadas.

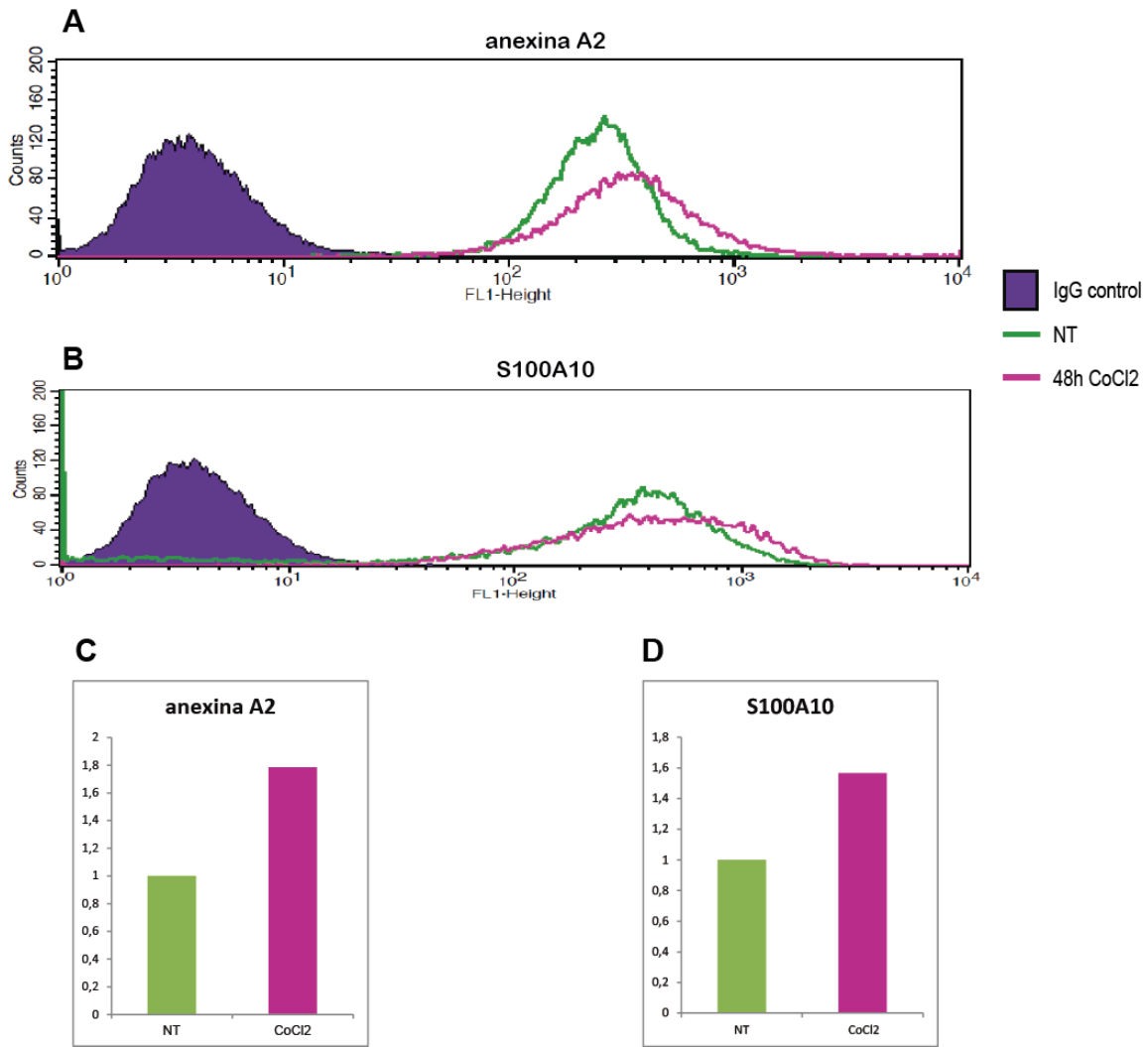
### **4.3 – Análise dos níveis extracelulares do AIIIt em células do cancro da mama sob condições de hipóxia *versus* normóxia**

Para além dos níveis totais de expressão investigou-se, também, os níveis de expressão das proteínas anexina A2 e S100A10 na membrana extracelular de células de cancro da mama por análise de *FACS* (*Fluorescent Activated Cell Sorter* - citometria de fluxo) e imunocitoquímica, uma vez que são os níveis do AIIIt à superfície extracelular que são responsáveis pela sua função como recetor de plasminogénio.

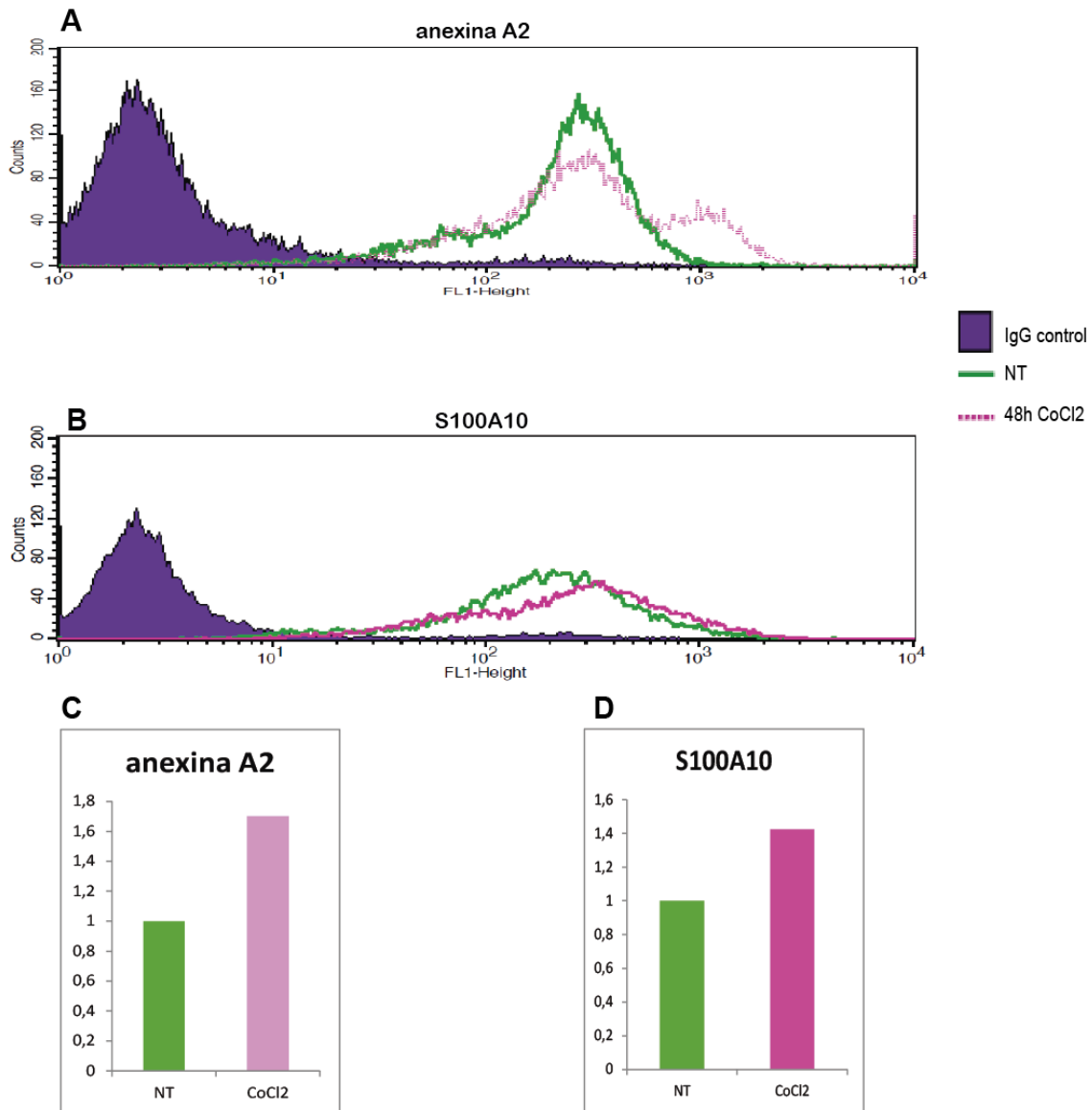
#### **4.3.1 – Citometria de fluxo**

Para estas experiências submeteram-se as células MCF7 e MDA MB 231, a condições de normóxia ou hipóxia química (200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ ). Estas células foram fixadas com 4% de formaldeído e depois incubadas com anticorpos contra a anexina A2 ou S100A10 durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que a ligação da anexina A2 à membrana celular é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , e incubadas com anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor® 488 durante 1 hora. Após este procedimento as células foram lavadas, novamente, com PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e a expressão de anexina A2 ou S100A10 na membrana celular foi quantificada por *FACS* utilizando um filtro para o Alexa Fluor® 488 (FL-1). Estes resultados permitiram determinar se existiam diferenças nos níveis de expressão do heterotetrâmero de anexina A2 na superfície de células cancerígenas em condições de normóxia *versus* hipóxia.

Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras de 4.6 e 4.7.



**Figura 4.6 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por FACS nas células MDA MB 231 em normóxia (NT) ou submetidas a 48 horas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$**  - As células MDA MB 231 foram não tratadas (NT) ou incubadas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  durante 48h. De seguida as células foram fixadas com 4% de formaldeído e depois incubadas com anticorpos contra a anexina A2 ou S100A10 durante 1 hora. Decorrida a incubação as células foram então lavadas e incubadas com anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor® 488. A expressão de anexina A2 e S100A10 na membrana celular foi quantificada por FACS utilizando um filtro para o Alexa Fluor® 488. Para estas experiências as células não foram permeabilizadas. Nos gráficos (A) e (B) encontra-se representada a população de células marcada com os anticorpos da anexina A2(A) e S100A10(B) quando sujeitos a condições de normóxia (população representada a verde) e 48h de hipóxia química (população representada a cor-de-rosa). Os gráficos (C) e (D) ilustram a análise da intensidade de fluorescência média emitida por cada uma das populações de células. Os resultados dos gráficos (C) e (D) encontram-se expressos em quantidades relativas de intensidade de fluorescência média da anexina A2 e S100A10 comparativamente às células em normóxia (NT).



**Figura 4.7 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por FACS nas células MCF7 em normóxia (NT) ou incubadas durante 48 horas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  -** As células MCF7 foram não tratadas (NT) ou tratadas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  durante 48h. De seguida as células foram fixadas com 4% de formaldeído e depois incubadas com anticorpos contra a anexina A2 ou S100A10 durante 1 hora. Decorrida a incubação as células foram então lavadas e incubadas com anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor® 488. A expressão de anexina A2 e S100A10 na membrana celular foi quantificada por FACS utilizando um filtro para o Alexa Fluor® 488. Para estas experiências as células não foram permeabilizadas. Nos gráficos (A) e (B) encontra-se representada a população de células marcada como anticorpos da anexina A2(A) e S100A10(B) quando sujeitos a condições de normóxia (população representada a verde) e 48h de hipóxia química (população representada a cor-de-rosa). Os gráficos (C) e (D) ilustram a análise da intensidade de fluorescência média emitida por cada uma das populações de células. Os resultados dos gráficos (C) e (D) encontram-se expressos em quantidades relativas de intensidade de fluorescência média da anexina A2 e S100A10 comparativamente às células em normóxia (NT).

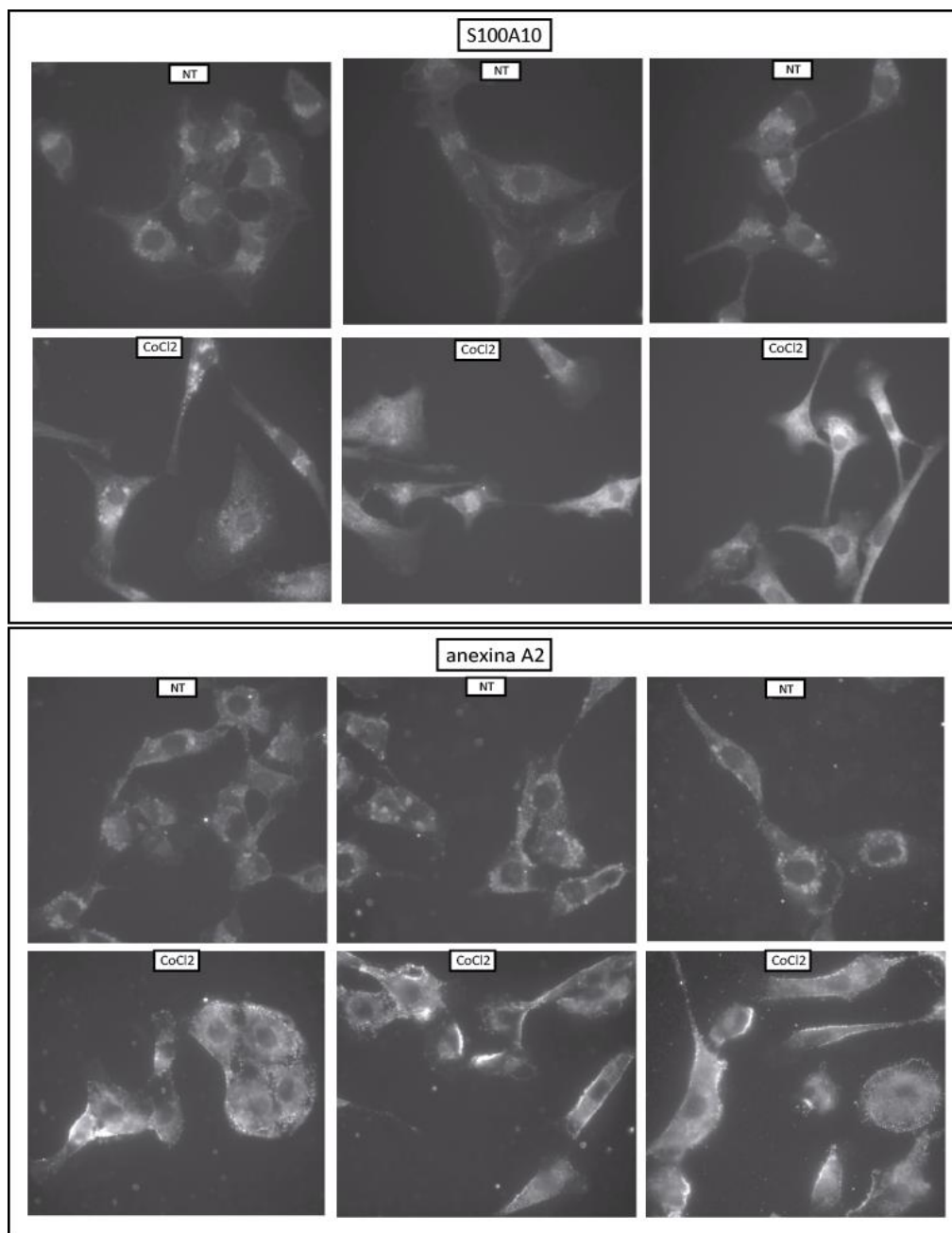
Considerando os resultados representados nas figuras 4.6 e 4.7 verificou-se que ocorreu um aumento de expressão à superfície celular quer da anexina A2 quer de S100A10 em ambas as linhas celulares analisadas (MDA MB231 e MCF7) quando submetidas a 48 horas de hipóxia química. Os gráficos (C) e (D) das figuras 4.6 e 4.7 ilustram a intensidade de fluorescência média emitida pelas populações celulares que expressam a anexina A2 e S100A10 à superfície quando expostas a condições de normóxia (representado a verde) e em hipóxia química (representado a cor-de-rosa). Nestes gráficos encontra-se evidenciado um aumento de aproximadamente 40-50% do nível de expressão, quer da anexina A2 quer de S100A10, à superfície celular nas populações submetidas a 48 horas de hipóxia química comparativamente com as células não tratadas.

#### **4.3.2 Imunocitoquímica**

Para além da análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por *FACS* também se optou por investigar os mesmos por um método distinto, isto é, por imunocitoquímica por forma a validar e confirmar os resultados obtidos por *FACS*. Para efetuar estes ensaios, submeteram-se lamelas contendo as células MDA MB231 em cultura a condições de normóxia ou hipóxia química (200  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$ ). Estas foram fixadas com formaldeído a 2% e depois incubadas com anticorpos contra a anexina A2 ou S100A10 durante 1 hora. As células foram então lavadas com PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e incubadas com anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor® 488 durante 1 hora. Após este procedimento as células foram lavadas, novamente, com PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e a expressão de anexina A2 ou S100A10 na membrana celular foi observada utilizando um microscópio *Axiomager Z2* (Carl Zeiss) com um filtro FL 38HEGFP para o Alexa Fluor® 488.

À semelhança do observado na análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por citometria de fluxo, também, por imunocitoquímica se verificou um aumento de expressão de ambas as proteínas à superfície das células MDA MB 231 quando expostas a 48h de hipóxia química.

A partir da figura 4.8 é possível verificar que quando expostas ao  $\text{CoCl}_2$  as células MDA MB 231 emitem mais fluorescência para o S100A10 e anexina A2 quando comparadas com as mesmas células marcadas com os mesmos anticorpos mas em condições de normóxia (NT).

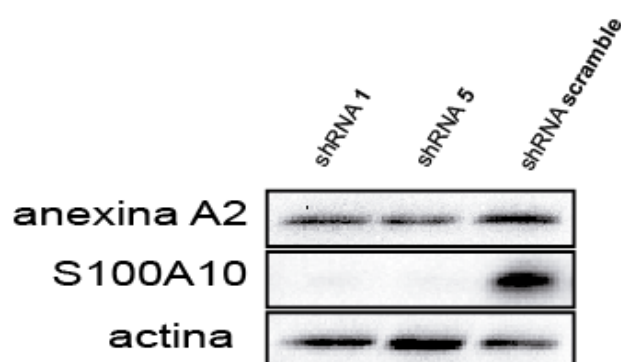


**Figura 4.8 - Análise dos níveis extracelulares de anexina A2 e S100A10 por Imunocitoquímica das células MDA MB 231 em normóxia (NT) e quando incubadas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  durante 48 horas -** As células MDA MB 231 foram incubadas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  durante 48 horas. De seguida foram fixadas com 2% de formaldeído durante 10 minutos e depois incubadas com anticorpos contra a anexina A2 ou S100A10 durante 1 hora. Decorrida a incubação as células foram então lavadas com PBS contendo  $\text{Ca}^{2+}$  e incubadas com anticorpos secundários marcados com Alexa Fluor® 488. A expressão de anexina A2 e S100A10 na membrana celular foi observada através do microscópio Axioimager Z2 (Carl Zeiss) utilizando um filtro para o Alexa Fluor® 488. Para estas experiências as células não foram permeabilizadas.

## 4.4 – Ensaio funcionais

### 4.4.1 - Estabelecimento de linhas celulares *knockdown* para *S100A10*

Uma vez que se observou um aumento de expressão total e à superfície celular de *S100A10* em células do cancro da mama hipóxicas, fomos investigar se o aumento deste recetor de plasminogénio poderia levar a um aumento de produção de plasmina à superfície destas células durante a hipóxia. De forma a esclarecer qual o papel desempenhado pelo *S100A10* na ativação da plasmina nas células cancerígenas quando submetidas a condições de hipóxia, procedeu-se ao *knockdown* de *S100A10* nas células MDA MB 231 por shRNA. Por forma a executar estes ensaios, preparou-se inicialmente o DNA plasmídico retroviral que codifica para dois shRNAs de *S100A10* e um shRNA *scramble* (não específico). Em seguida, introduziu-se este DNA plasmídico em células Phoenix por transfeção utilizando o reagente Fugene (Roche). Adicionou-se, então, às células cancerígenas alvo o sobrenadante das células Phoenix contendo as partículas retrovirais para expressão dos shRNAs para *S100A10* e *scramble*. Linhas celulares estáveis foram obtidas através de seleção com antibiótico (puromicina). As células que expressam o shRNA *scramble*, que não é específico para qualquer gene, constituíram as células controlo. Após este procedimento confirmou-se a eficácia do *knockdown* para *S100A10* por análise de *western blot* (figura 4.9).

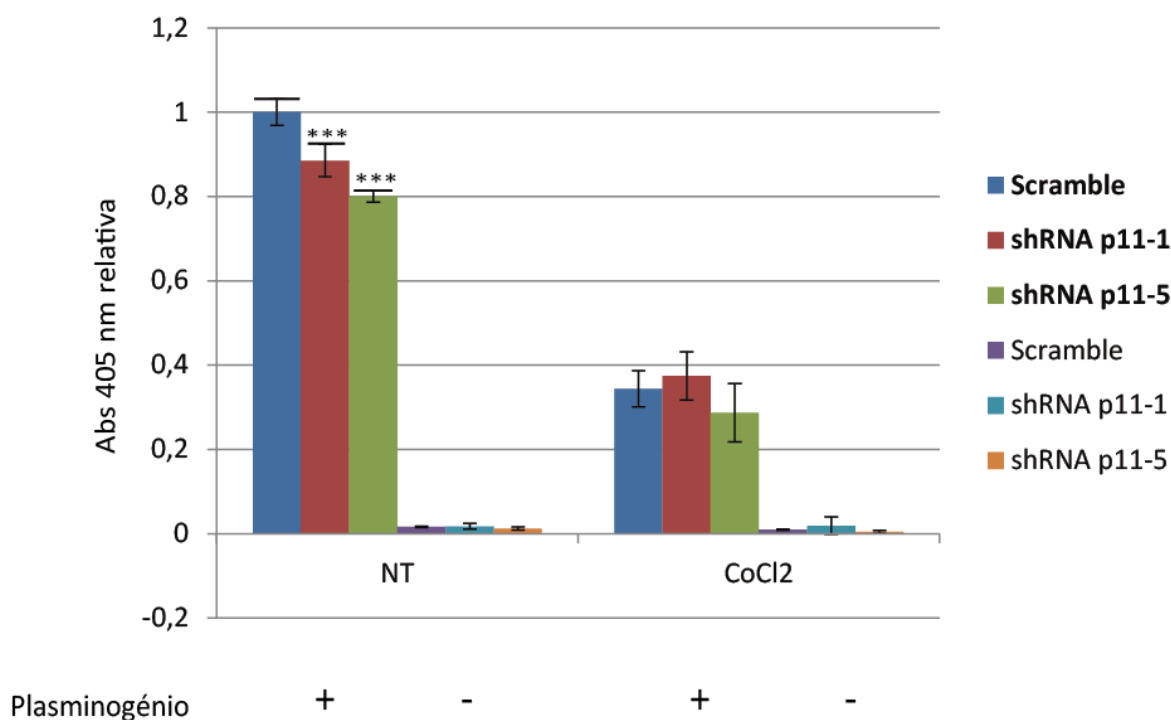


**Figura 4.9 - Western blotting das células MDA MB 231 com *knockdown* para *S100A10*** - Células MDA MB 231 foram infetadas com sobrenadante retroviral de células Phoenix transfectadas com pSUPER-retro-*S100A10* shRNA1 (shRNA1); pSUPER-retro-*S100A10* shRNA5 (shRNA5) ou pSUPER-retro-*S100A10* scramble (controlo shRNA; shRNA scramble) como indicado na figura. Foram preparados lisados das duas linhas celulares e 20 µg de cada lisado foi sujeito ao SDS-PAGE seguido de *western blotting* com os anticorpos indicados. Figura representativa de 5 experiências distintas.

A partir da figura 4.9 é possível verificar que conseguiram-se estabelecer as linhas celulares MDA MB231 *knockdown* para *S100A10* com sucesso. Observou-se uma diminuição bastante significativa de expressão de *S100A10* nas linhas celulares com os shRNAs 1 e 5, comparativamente com a linha celular controlo (*scramble*) por análise de *western blot*.

#### 4.4.2- Ensaio de actividade da plasmina

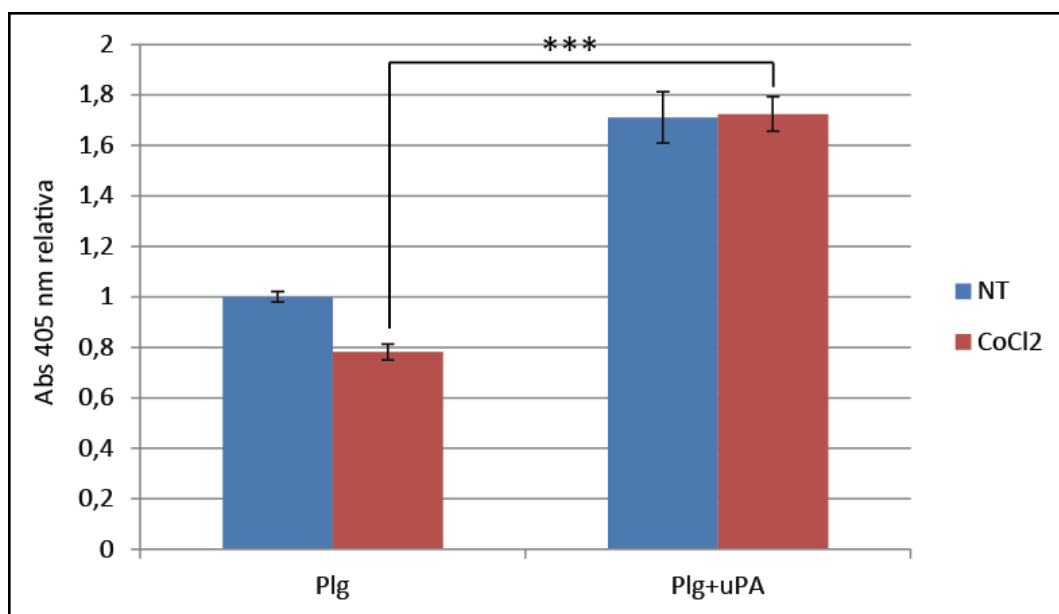
Após o estabelecimento das linhas celulares *knockdown* para *S100A10* pretendeu-se determinar se o heterotetrâmero de anexina A2 tem um papel importante na ativação de plasmina à superfície de células cancerígenas hipóxicas. Para tal submetem-se as células *knockdown* para *S100A10* e as células controlo a condições de hipóxia química (200  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$ ). A estas células foi adicionado plasminogénio e um substrato



**Figura 4.10 - Ensaio de actividade da plasmina nas células MDA MB 231 com o knockdown para o *S100A10* em normóxia (NT) ou incubadas com 200  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$  durante 48 horas** – Decorridos os tratamentos com o  $\text{CoCl}_2$  as células foram lavadas com um tampão de incubação (composto por 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 120 mM NaCl e 200 mM Tris pH 7.5) e de seguida foram incubadas com o tampão de incubação mas desta vez contendo 0 a 0,6  $\mu$ M de Plasminogénio durante 15 minutos a 37°C. Decorrida a incubação foi adicionado 250  $\mu$ M de S-2251 (substrato da plasmina) em cada poço. Absorvância foi lida a 405 nm a cada 30 segundos durante 1h30min. Os resultados encontram-se expressos em Absorvância a 405 nm relativa comparativamente às células com o shRNA *scramble* em normóxia (NT). Os valores encontram-se expressos em média +/- o desvio padrão sendo que o N=6. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t* Student : \*\*\* P < 0,001; A análise estatística contempla a comparação entre a produção de plasmina nas células *knockdown* para *S100A10* não tratadas relativamente às células controlo em normóxia.

cromogénico de plasmina, nomeadamente S2251. O S2251 quando clivado pela plasmina produz um produto com cor que pode ser quantificado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 405 nm ao longo do tempo. No último ensaio da actividade da plasmina efetuado, também se adicionou uPA no mesmo momento em que se adicionou o plasminogénio.

Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 4.10 e 4.11.



**Figura 4.11 - Ensaio de actividade da plasmina nas células MDA MB 231 com o shRNA scramble em normóxia (NT) e quando submetidas a 48 horas de 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> adicionando apenas Plasminogénio (Plg) ou o Plasminogénio e uPA em simultâneo** - Decorridos os tratamentos com o CoCl<sub>2</sub> as células foram lavadas com um tampão de incubação (composto por 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 120 mM NaCl e 200 mM Tris pH 7.5) e de seguida foram incubadas como tampão de incubação mas desta vez contendo 0 a 0,6  $\mu$ M de Plasminogénio e também 0 a 500  $\mu$ M de uPA durante 15 minutos a 37°C. Decorrida a incubação foi adicionado 250  $\mu$ M de S-2251 (substrato da plasmina) em cada poço. Absorvância foi lida a 405 nm a cada 30 segundos durante 1h30min. Os resultados encontram-se expressos em Absorvância a 405 nm relativa comparativamente às células só contendo o Plasminogénio em normóxia (NT). Os valores encontram-se expressos em média +/- o desvio padrão sendo que o N=6. . A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste *t* Student : \*\*\* P < 0,001; A análise estatística compara a produção de plasmina nas células *scramble* tratadas com o CoCl<sub>2</sub> quando adicionado o uPA+Plasminogénio comparativamente às mesmas células em hipóxia química mas apenas adicionando o Plasminogénio.

Ao analisar os resultados obtidos na figura 4.10 é possível verificar que as linhas celulares utilizadas não têm por si só capacidade intrínseca de formar plasmina isto porque só quando o plasminogénio é adicionado é que é possível quantificar a plasmina formada. Estas células em que não foi adicionado plasminogénio funcionaram como controlo negativo.

Observando o ensaio da plasmina em que as células foram tratadas com 200  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  durante 48 horas (figura 4.10) verificou-se um decréscimo da actividade da plasmina em todas as linhas celulares testadas relativamente às mesmas em condições de normóxia. Quando se adicionou o uPA e plasminogénio num outro ensaio (figura 4.11), mas desta vez apenas utilizando as células *wild type*, já se verificou que a actividade da plasmina nas células hipóxicas foi restaurada para níveis semelhantes aos das células normóxicas, o que indica que a diminuição de expressão de uPA e uPAR nas células hipóxicas (figuras 4.1 e 4.5) leva a uma diminuição da produção de plasmina pelas células MDA MB 231 durante a hipóxia.

## 5 – Discussão

Ao longo dos últimos anos a visão reducionista de que o cancro seria uma doença heterogénea vista à luz da acumulação de alterações genéticas aberrantes de um conjunto de células tem vindo a ser desmistificada. Atualmente é aceite pela comunidade científica que um tumor pode ser caracterizado não só diretamente pelo comportamento das células cancerígenas inseridas dentro de uma massa tumoral, mas também pelo respetivo microambiente. Este complexo nicho tumoral permite às células cancerígenas obter um crescimento sustentado, capacidade de invasão e metastização em locais distantes (Weinberg, 2007; Quail, 2013).

Atualmente, é consistente o papel determinante da hipóxia na adaptação genética e epigenética de clones celulares, aumentando a capacidade de invasão e de metastização (Semenza, 2003). A hipóxia por si só é um forte fator epigenético que regula o fator de transcrição HIF- $\alpha$ , gerando radicais livres de oxigénio, que são capazes de estabilizar e de induzir o gene *HIF* (Gatenby, 2004). Por outro lado, a hipóxia é um mediador da instabilidade genómica e da reparação de DNA, contribuindo para a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor promovendo a angiogénese, progressão e metastização (Yong, 2004). Adicionalmente, um número crescente de estudos evidencia que a hipóxia tumoral possui um impacto relevante na expressão genética, com alterações nas enzimas glicolíticas, fatores de crescimento ou moléculas pró-angiogénicas, as quais parecem ser um fator de agressividade e progressão tumoral (Haddad, 2001).

As propriedades invasivas das células cancerígenas são dependentes da ativação de protéases à sua superfície sendo que a plasmina é uma das principais protéases de serina envolvida na fibrinólise, degradação da matriz extracelular, invasão e angiogénese (Kwaan, 1992). Diferentes estudos demonstraram que os recetores celulares do plasminogénio desempenham um papel determinante na regulação da actividade da plasmina (Fogg, 2003; Miles, 2005; Redlitz, 1995). Estudos desenvolvidos recentemente permitiram caracterizar a importância do heterotetrâmero de anexina A2 como recetor celular para o plasminogénio/ ativador de plasmina em diversos processos fisiológicos e patológicos, tal como na fibrinólise, na promoção de invasão de células de cancro, no recrutamento de macrófagos para locais de inflamação e para tumores e ainda na hiperfibrinólise observada na leucemia promielocítica aguda (Madureira, 2012). No

entanto, o papel desempenhado pelo heterotetrâmero de anexina A2 em células cancerígenas durante a hipóxia ainda não foi investigado.

### **5.1 – Análise da expressão do AII<sub>t</sub> em linhas celulares de cancro da mama submetidas a condições de hipóxia *versus* normóxia**

O presente estudo, mostrou pela primeira vez que a hipóxia induz o aumento da expressão de S100A10 em células de cancro da mama, MDA MB 231 e MCF7 (figuras 4.1 a 4.4). No estudo levado a cabo por *Huang et al* em 2011 já havia sido descrito que ocorria aumento de expressão de S100A10 em células endoteliais, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) quando sujeitas a condições de hipóxia real e química durante 16 horas.

É de salientar que nas experiências descritas neste estudo (figuras 4.1 a 4.4) a expressão da anexina A2 não sofreu alterações significativas. Estes resultados demonstram que a anexina A2 e o S100A10 não se encontram sujeitos ao mesmo tipo de regulação quando expostos a condições de hipóxia.

Nos ensaios representados na figura 4.1 verificou-se ainda que a expressão de uPA e uPAR nas células MDA MB 231 decresceu ao longo do tempo quando sujeitas a tratamento com CoCl<sub>2</sub>, sendo que, quando expostas à hipóxia real não ocorreram alterações significativas na expressão destas proteínas.

### **5.2 – Análise da transcrição dos genes que codificam para a anexina A2 e S100A10 em células de cancro da mama sob condições de hipóxia *versus* normóxia**

A análise da expressão dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA* e *uPAR* por PCR quantitativo (figura 4.5) permitiu constatar que ocorre uma regulação transcricional dos genes que codificam as proteínas S100A10, uPAR e uPA em ambas as linhas celulares quando sujeitas a condições de hipóxia química comparativamente com normóxia. Considerando os resultados do *S100A10* verifica-se que ocorreu um aumento da

transcrição (*upregulation*) em ambas as linhas celulares, ao passo que, os níveis de mRNA de *anexina A2* ao longo das experiências não sofreram alterações significativas.

A partir destes resultados concluiu-se que em resposta à exposição ao  $\text{CoCl}_2$  observa-se um aumento de transcrição de *S100A10* ao passo que os níveis de *anexina A2* permanecem praticamente constantes.

Relativamente aos resultados dos níveis de mRNA do *uPAR* e *uPA* obtidos verifica-se que estes diminuíram (*downregulation*) em ambas as linhas celulares quando expostas ao  $\text{CoCl}_2$ . Estes resultados vão de encontro às experiências efetuadas anteriormente neste estudo em que os níveis de proteína total de *uPA* e *uPAR* diminuíram ao longo do tempo de exposição ao  $\text{CoCl}_2$  sendo mais acentuada nas células MDA MB 231.

Seria interessante efetuar este ensaio de quantificação dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA* e *uPAR* submetendo as células MDA MB 231 e MCF7 a condições de hipóxia real (1%  $\text{O}_2$ ) de forma a verificar se estes mantinham o comportamento observado com a hipóxia química.

### **5.3 – Análise dos níveis extracelulares do AIIIt em células do cancro da mama sob condições de hipóxia *versus* normóxia**

Considerando os resultados obtidos através da análise por citometria de fluxo (figuras 4.6 e 4.7) verificou-se que ocorreu um aumento de expressão à superfície celular quer da *anexina A2* quer do seu companheiro *S100A10* em ambas as linhas celulares de cancro da mama analisadas (MDA MB231 e MCF7) quando submetidas a 48 horas de hipóxia química. Nos gráficos 4.6(C), 4.6(D), 4.7(C) e 4.7(D) encontra-se evidenciado um aumento de aproximadamente 40-50% do nível de expressão, quer da *anexina A2* quer de *S100A10*, à superfície celular nas populações analisadas.

Ao analisar os níveis extracelulares de *anexina A2* e *S100A10* por imunocitoquímica (figura 4.8) também se verificou um aumento de expressão de ambas as proteínas à superfície das células MDA MB 231 quando expostas a 48h de hipóxia química.

Estes resultados vão de encontro ao esperado pois são os níveis extracelulares de AIIIt que são responsáveis pela sua função enquanto recetor de plasminogénio/ativador plasmina. Como tal, e uma vez que em resposta ao estímulo de stress hipóxico ocorreu um aumento de expressão de S100A10 seria espectável que também aumentasse a sua fração extracelular. Para que tal pudesse ocorrer seria necessário que aumentasse a fração extracelular da anexina A2 pois é esta que é responsável pela estabilização e transporte do S100A10 do interior da célula até à superfície bem como pela ancoragem do AIIIt à membrana extracelular, e isto também foi observado (Bharadwaj, 2013; Madureira, 2012).

Posto isto, verificou-se que em resposta ao stress hipóxico ocorreu indução do S100A10 através de regulação transcricional bem como aumento do AIIIt extracelular nas células de cancro da mama testadas.

#### **5.4 – Ensaio funcionais**

Analisando os ensaios da plasmina em que as células foram submetidas a 48h de hipóxia química (figura 4.10) verifica-se que ocorreu um decréscimo da actividade da plasmina em todas as linhas celulares relativamente às células em normóxia. Curiosamente, quando efetuado um novo ensaio de actividade da plasmina com o mesmo tempo de exposição ao  $\text{CoCl}_2$  mas desta vez adicionando uPA (figura 4.11) constatou-se que a actividade da plasmina nas células hipóxicas foi restaurada para níveis semelhantes aos das células normóxicas. Tal facto poderá dever-se ao défice de expressão de uPA e uPAR, já anteriormente observado nas experiências representadas nas figuras 4.1 e 4.5, que poderá conduzir a uma diminuição de produção de plasmina nas células MDA MB 231 durante a exposição à hipóxia química. Estes resultados são sugestivos da existência de um mecanismo de inibição ao nível transcricional do uPA na presença do  $\text{CoCl}_2$ . No entanto os resultados obtidos são insuficientes para esclarecer convenientemente de que forma este hipotético mecanismo se desenrola.

Considerando os resultados das células em normóxia representados na figura 4.10 verifica-se o que já havia anteriormente sido descrito por *Surette et al* e *Madureira et al* com outras linhas celulares em que as células *knockdown* para o S100A10 apresentam a actividade da plasmina significativamente diminuída relativamente à linha celular

controlo. Estes resultados vêm mais uma vez salientar o papel determinante desempenhado pelo S100A10 dentro do AII<sub>t</sub> à superfície celular enquanto recetor de plasminogénio/ativador de plasmina.

## 6 – Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram consolidar o que já havia sido descrito anteriormente na literatura relativamente à importância do papel desempenhado pelo S100A10 dentro do AIIIt enquanto recetor de plasminogénio.

Ficou demonstrado, igualmente, que sob condições de hipóxia ocorre um aumento de expressão do AIIIt extracelular nas linhas de cancro da mama testadas. Dentro do AIIIt foi possível constatar que o S100A10 é regulado a nível transcricional ao passo que a anexina A2 deverá ser regulada através de mecanismos pós-translacionais isto porque apenas se verificou um aumento da anexina A2 à superfície celular.

Os ensaios de actividade da plasmina não permitiram esclarecer qual o papel do AIIIt enquanto recetor de plasminogénio em ambiente hipóxico devido a um possível mecanismo inibitório a nível da transcrição de *uPA* e *uPAR* em ambiente de hipóxia química.

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que ocorre um aumento do nível de expressão extracelular do AIIIt nas células de cancro da mama testadas quando submetidas a hipóxia não tendo sido possível, no entanto, comprovar os efeitos desse aumento de expressão ao nível funcional.

Numa massa tumoral (constituída por células cancerígenas e células associadas ao tumor) a expressão de *uPA* por células na vizinhança das células cancerígenas pode ter um papel importante para a produção da plasmina pelas células cancerígenas. Assim sendo, o aumento da expressão de AIIIt à superfície das células cancerígenas pode ter um papel mais significativo no ambiente tumoral aonde a expressão de *uPA* é mais elevada, devido à sua produção por células associadas ao tumor (como por exemplo macrófagos). O facto de se ter observado um aumento significativo de produção de plasmina em células hipóxicas após adição exógena de *uPA* apoia esta hipótese. Seria necessário efetuar ensaios de produção de plasmina nas células *knockdown* para *S100A10* comparativamente com células controlo hipóxicas com adição de *uPA* para testar esta hipótese.

## 7 – Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos demonstraram que quando expostas a condições de hipóxia ocorre aumento da transcrição do *S100A10* e translocação da anexina A2 e S100A10 para a superfície extracelular em ambas as linhas celulares estudadas.

Seria interessante efetuar novos ensaios de quantificação dos genes *anexina A2*, *S100A10*, *uPA* e *uPAR* bem como novas experiências de citometria de fluxo e imunocitoquímica submetendo as células MDA MB 231 e MCF7 a condições de hipóxia real (1% O<sub>2</sub>) de forma a verificar se estas teriam um comportamento semelhante ao observado com a hipóxia química.

Os ensaios de actividade da plasmina não permitiram esclarecer qual o papel do AII<sub>t</sub> enquanto recetor de plasminogénio em ambiente hipóxico. No entanto, novos ensaios em hipóxia química adicionando uPA e ainda ensaios em condições de hipóxia real (com e sem adição de uPA) poderiam ser mais esclarecedores sobre a função do AII<sub>t</sub> enquanto recetor do plasminogénio durante a hipóxia.

Por fim, se se comprovasse que o aumento de expressão de AII<sub>t</sub> extracelular durante a hipóxia se traduzia num aumento de actividade da plasmina seria importante completar o estudo com ensaios de invasão.

## 8 - Bibliografia

Andreasen P, Kjoller AL, Christensen L and Duffy MJ (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer* **72**:1-22.

Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R and Waisman D (2013). Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function. *Int J Mol Sci.* **14**(3): 6259–6305.

Boerner JL, Biscardi JS and Parsons SJ (2005). Overview of Oncogenesis. The Cancer Handbook. 2ª edição. John Wiley and Sons, Inc. University of Virginia, Charlottesville, VA, USA **3**, 25-34.

Brat DJ, Kaur B, Van Meir EG. (2003) Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors. *Front Biosci.* **8**:100-116.

Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **38**:285-289.

Bunz F (2008). Principles of Cancer Genetics. 1ª edição. Springer Netherlands. Maryland **1**, 1-45.

Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. (2003) Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol.* **67**:3-15.

Cardenas-Navia LI, Mace D, Richardson RA, Wilson DF, Shan S, Dewhirst MW (2008). The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res.* **68**(14):5812–5819.

Carmeliet P, Jain RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* **407**(6801):249–257.

Choi K, Fogg DK, Yoon C, Waisman DM. (2003) p11 regulates extracellular plasmin production and invasiveness of HT1080 fibrosarcoma cells. *FASEB J.* **17**(2):235-246.

Dai Y, Bae K, Siemann DW. (2011) Impact of hypoxia on the metastatic potential of human prostate cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **81**(2): 521–528.

Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH (2008). Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev.* **34**: 122– 136.

de Vries C, Veerman H, Koornneef E and Pannekoek H (1990). Tissue-type plasminogen activator and its substrate Glu- plasminogen share common binding sites in limited plasmin- digested fibrin. *J Biol Chem* **265**:13547-13552.

Deregowski V, Canalis E. (2008) Gene Delivery by Retroviruses. *Methods Mol Biol.* **455**:157-62.

Deryugina EI and Quigley JP. (2012) Cell Surface Remodeling by Plasmin: A New Function for an Old Enzyme. *J Biomed Biotechnol.* **2012**: 564259.

Fang YT, Lin CF, Wang CY, Anderson R and Lin YS (2012). Interferon- $\gamma$  stimulates p11-dependent surface expression of annexin A2 in lung epithelial cells to enhance phagocytosis. *J Cell Physiol.* **227**(6):2775–2787.

Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, et al. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* **14**:518–527.

Fleury V, Loyau S, Lijnen HR, Nieuwenhuizen W and Angles-Cano E (1993). Molecular assembly of plasminogen and tissue-type plasminogen activator on an evolving fibrin surface. *Eur J Biochem* **216**: 549-556.

Fleury, V. and Angles-Cano E (1991). Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry* **30**: 7630-7638.

Fogg DK, Bridges DE, Cheung KK, et al. (2002). The p11 subunit of annexin II heterotetramer is regulated by basic carboxypeptidase. *Biochemistry* **41**(15):4953-4961.

Gatenby RA, Gillies RJ. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* **4**:891-899.

Haddad JJ, Land SC. (2001) A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Lett.* **505**: 269-274.

Hanahan D and Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**:646–674.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*. **56**:4509-4515.

Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. (1999) Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res*. **59**:4525-4528.

<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html> , data de consulta 08/04/2014.

<http://www.antibodiesonline.com/resources/17/1224/Western+blotting+immunoblot+Gel+electrophoresis+for+proteins>, data de consulta 08/04/2014.

[http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi\\_s03\\_m05\\_07\\_a.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_07_a.htm), data de consulta 09/04/2014.

Huang B, Deora AB, He KL, Chen K, Sui G, Jacovina AT, Almeida D, Hong P, Burgman P and Hajjar KA (2011) Hypoxia-inducible factor-1 drives annexinA2 system-mediated perivascular fibrin clearance in oxygen-induced retinopathy in mice. *Blood*. **118**(10): 2918-2929.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. **61**(2):69–90.

Joyce JA, Pollard JW (2009).Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. **9**(4):239–252.

Junk DJ, Cipriano R, Bryson BL, Gilmore HL and Jackson MW (2013). Tumor Microenvironmental Signaling Elicits Epithelial-Mesenchymal Plasticity through Cooperation with Transforming Genetic Events. *Neoplasia*. **15**:1086–1095.

Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. **119**(6):1420-8.

Kwaan HC (1992). The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Ver*. **11**: 291-311.

Kwon M, Caplan JF, Filipenko NR, Choi KS, Fitzpatrick SL, Zhang L and Waisman DM (2002). Identification of Annexin II Heterotetramer as a Plasmin Reductase. *J Biol Chem.* **277**: 10903-10911.

Kwon M, MacLeod TJ, Zhang Y, Waisman DM (2005). S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors. *Front Biosci.* **10**:300-25.

Lambert O, Gerke V, Bader MF, Porte F, Brisson A.(1997) Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **272**(1):42-55

Levin, EG. (1983) Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* **80**: 6804-6808.

Lijnen H, Silence RJ, Lemmens G, Frederix L and Collen D (1998). Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost.* **79**:1171-1176.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* **51**:5054–9.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* **25**:402–408.

MacKay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorgeirsson UP (1990). Basement membrane type IV collagen degradation: evidence for the involvement of a proteolytic cascade independent of metalloproteinases. *Cancer Res.* **50**:5997–6001.

Madureira PA, O'Connell PA, Surette AP, Miller VA, Waisman DM (2012). The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis. *J Biomed Biotechnol.* **2012**:353687.

Madureira PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MAS, Miller VA and Waisman DM (2011). The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood.* **118**(18):4789-97.

Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ (2005). Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci.* **10**: 1754-62.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT and Taxman DJ. (2010). Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol.* **629**:141–158.

O’Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P and Waisman DM. (2010) S100A10 regulates plasminogen dependent macrophage invasion. *Blood.* **116**(7):1136–1146.

O’Connell PA, Madureira PA, Berman JN, Liwski RS, Waisman DM. (2011) Regulation of S100A10 by the PML-RAR- $\alpha$ -oncprotein. *Blood.* **117**(15):4095-4105.

Phipps KD, Surette AP, O’Connell PA and Waisman DM. (2011) Plasminogen receptor S100A10 is essential for the migration of tumor-promoting macrophages into tumor sites. *Cancer Research.* **71**:6676–6683.

Poon E, Harris AL and Ashcroft M. (2009) Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med.* **11**:e26.

Quail DF and Joyce JA (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**(11):1423-1437.

Rabbani SA and Mazar AP (2001). The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* **10**:393-416.

Rao JS, Gondi C, Chetty C, Chittivelu S, Joseph PA and Lakka SS (2005). Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non–small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **4**:1399-1408.

Redlitz A, Plow EF (1995). Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin Haematol.* **8**: 313-27.

Sadri N and Zhang PJ. (2013) Hypoxia-Inducible Factors: Mediators of Cancer Progression; Prognostic and Therapeutic Targets in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers.* **5**:320-333.

Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* **33**:207–214.

Semenza GL (2012). Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends Mol Med.* **18**(9): 534–543.

Semenza GL. (2003) Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med.* **54**:17–28.

Sleeman JP. (2012) The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**:429–440.

Stamenkovic I (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* **200**:448–64.

Surette AP, Madureira PA, Phipps KD, Miller VA, Svenningsson P and Waisman DM (2011) Regulation of fibrinolysis by S100A10 in vivo. *Blood.* **118**(11):3172–3181.

Tapiovaara H, Alitalo R and Vaheri A (1996) Plasminogen activation on tumor cell surface and its involvement in human leukemia. *Adv Cancer Res* **69**:101-133.

Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Neito MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* **139**:871–890.

Thiery JP. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* **2**:442–54.

Tsai JH and Yang J. (2013) Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & Dev.* **27**: 2192-2206.

Vihinen P, Kahari VM (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* **99**:157–66.

Weinberg RA, (2007) Dialogue Replaces Monologue: Heterotypic Interactions and the Biology of Angiogenesis. *The Biology of Cancer.* 1<sup>o</sup> edição. Garland Science, New York. **13**, 528-530.

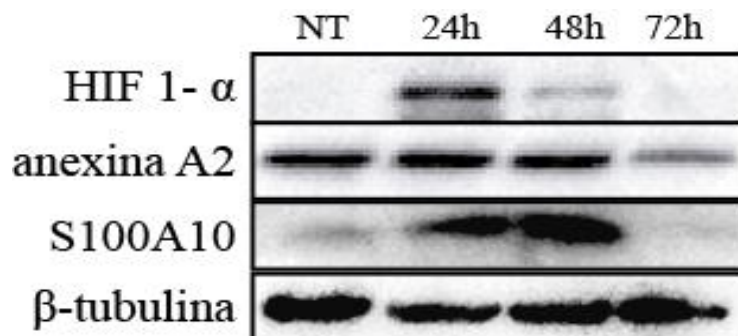
Weinberg RA, (2008) Cancer: a genetic disorder. *The Molecular Basic of Cancer.* 3<sup>a</sup> edição. Elsevier Inc., Philadelphia. **1**, 3-16.

Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, Mai S, Silverstein R, Murphy-Ullrich JE and Khalil N (1999) Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol* **155**: 841-851.

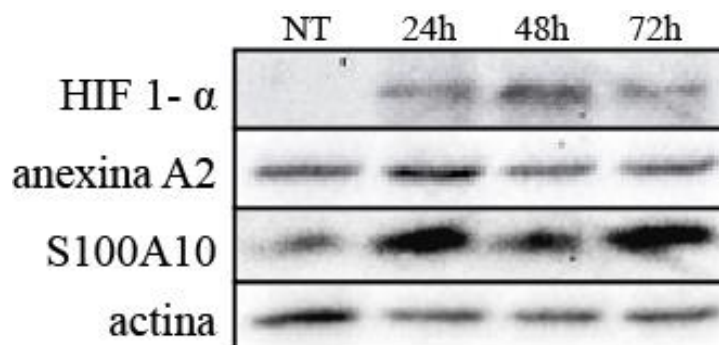
Yong HS, Wei GF (2004). Hypoxia inducible factor in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* **10**(8):1082-1087.

Zhang L, Fogg DK and Waisman DM (2004). RNA Interference-mediated Silencing of the *S100A10* Gene Attenuates Plasmin Generation and Invasiveness of Colo 222 Colorectal Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **279**:2053-2062.

## 9 – Anexos



**Figura I - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MDA MB 231 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia química** - Foram adicionados 200  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  ao meio de cultura das células MDA MB 231, tendo estas permanecido em condições de hipóxia por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (24h, 48h e 72h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 20  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de *western-blotting* com os anticorpos indicados na figura.



**Figura II - Análise dos níveis de expressão de proteínas em células MCF7 submetidas a condições de normóxia (NT) e hipóxia química** - Foram adicionados 200  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$  ao meio de cultura das células MCF7, tendo estas permanecido em condições de hipóxia por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (24h, 48h e 72h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 30  $\mu$ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de *western-blotting* com os anticorpos indicados na figura.