

Lina Gisela Serrão Fernandes

**Estudo do papel da proteína
anexina A2 (ANXA2) em células
cancerígenas durante a hipóxia**

Dissertação do Mestrado

**Oncobiologia – Mecanismos Moleculares
do Cancro**



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2016

Lina Gisela Serrão Fernandes

**Estudo do papel da proteína
anexina A2 (ANXA2) em células
cancerígenas durante a hipóxia**

**Mestrado em Oncobiologia –
Mecanismos Moleculares do Cancro**

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Patrícia Madureira

E co-orientação de:
Professor Doutor Wolfgang Link



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2016

Título do trabalho: “Estudo do papel da proteína anexina A2 em células cancerígenas durante a hipóxia”

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 Lina Gisela Serrão Fernandes

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

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Patrícia Madureira, por todo o apoio, paciência, disponibilidade e atenção que me deu, mas principalmente por me ter recebido e orientado da melhor forma possível neste trabalho. Pela amizade ao longo deste ano, pelas gargalhadas, compreensão por toda a sua partilha de conhecimento científico e também, pela oportunidade, e principalmente pela pessoa que é.

Foram anos difíceis, de luta, força de vontade e amizades que sem elas eu não teria chegado aqui. Para ser família não precisa ser de sangue e por isso quero agradecer ao Fábio Anastácio e à Sónia Serrão por toda a amizade, apoio, motivação e ajuda no laboratório. Ao Bernardo Salvado, padrinho e infante na tuna, amigo e irmão de coração, pela amizade, apoio e conselhos ao longo destes anos, por todas as pelas palavras sábias na hora certa, experiências e gargalhadas.

À Joana Teixeira porque mesmo longe estive sempre perto para me ouvir e à Catarina Diniz, minhas duas marias por terem estado sempre lá quando precisei. À Ana Sofia Moreira, que apesar do pouco tempo que nos cruzamos, nunca faltou apoio e amizade e uma palavra de incentivo à vez.

À Susana Rodrigues, Goodmylla Cunha, Fátima Musachio e Jorge Pontes, meus companheiros do laboratório e amigos, por todas as gargalhadas e senhas do wi-fi partilhadas. Levo tudo comigo no meu coração para onde for. À Bibiana Ferreira pela força, encorajamento e motivação na fase mais intensa da minha vida, cujas palavras nunca irei esquecer.

Ao meu mais que tudo, meu amigo, confidente e namorado Wilson Rodrigues, um agradecimento muito especial pela pessoa que é, pelo apoio, motivação, pela força que me deu quando mais precisei tornando os meus dias menos cinzentos. Aos seus pais, meus segundos pais por terem sido incansáveis comigo nestes últimos 2 anos, um grande obrigado.

À Real Tuna Infantina, por todas as lições, amizades, laços e convívios que me proporcionou. Levo-a comigo sempre para onde for ao som de um bandolim. À minha madrinha Maria José, que estimo muito. Muito obrigado pelas orações, palavras de consolo, motivação que nunca faltaram.

Por último quero agradecer do fundo do meu coração às pessoas mais importantes da minha vida. Sem elas eu não estaria aqui hoje, não seria o que sou hoje nem tinha conquistado o que conquistei. Um grande e enorme obrigado a Deus e aos meus pais, porque ensinaram-me que a vida não é um mar de rosas e é preciso insistir, mas nunca desistir. Por terem acreditado em mim, por serem o meu porto de abrigo por sempre estarem lá para mim e me amarem mesmo quando eu menos merecia. Porque apesar da distância estiveram presentes em todos os momentos no meu coração e na minha mente. Ao meu querido irmão Tomás, por todo o carinho, amor, atenção e preocupação! Porque sempre souberam o que dizer na hora certa e nunca me deixaram desistir em circunstância alguma. A todos, um grande e enorme obrigado!

Resumo

Durante o a progressão tumoral, as células cancerígenas perdem acesso ao oxigénio (hipóxia) e à disponibilidade de nutrientes devido ao crescimento celular rápido e descontrolado. O HIF- α é o principal fator de transcrição que regula a resposta hipóxica ativando genes responsáveis pela sobrevivência das células cancerígenas. Vários estudos têm demonstrado que células sujeitas a um stress hipóxico exibem níveis elevados de espécies reativas de oxigénio (ERO) comparadas a células em normóxia. Devido às propriedades reativas destas espécies, as ERO podem contribuir para a oxidação de proteínas, peroxidação de lípidos e danos no DNA que podem resultar na morte celular ou mutagénese. Contudo, a ERO peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é um segundo mensageiro importante na ativação de várias vias de sinalização que regulam a proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Os sistemas antioxidantes têm certamente um papel fundamental na progressão tumoral durante condições de hipóxia regulando os níveis de ERO de forma a evitar que estes atinjam níveis letais para a célula. O nosso laboratório identificou recentemente uma proteína com função reguladora redox, a anexina A2 (ANXA2) e provou que a sua função antioxidante tem um papel crucial na progressão tumoral e resistência a quimioterapêuticos. Neste estudo propus-me a investigar o papel da ANXA2 em vias de sinalização durante a hipóxia. A ativação de vias de sinalização em linhas celulares cancerígenas pré estabelecidas com a depleção (*knockdown*) de ANXA2 como MDA MB 231, HT1080 e A549, e respetivos controlos foi estudada por *western blot*, estas células foram submetidas a tratamentos com $CoCl_2$, um agente indutor de hipóxia química e a hipóxia real (1% O_2), durante diferentes intervalos de tempo. Para estudar possíveis alterações génicas, recorreu-se à técnica de qRT-PCR utilizando células sujeitas à hipóxia vs células controlo. Ensaio de iodoacetamida biotínida BIAM foram realizados por forma a estudar alterações redox em proteínas durante a hipóxia (1% O_2). Os níveis intracelulares de ERO foram analisados em células depletadas de ANXA2 vs controlo as quais foram submetidas a um tratamento de hipóxia química com $CoCl_2$. Os nossos resultados mostram que a depleção de ANXA2 nas três linhas celulares levam a uma maior acumulação de HIF- α comparado a células controlo. Curiosamente em células HT1080 e A549 depletadas de ANXA2 observou-se a acumulação de HIF 2- α , o que não aconteceu nas células controlo. Também se observou a acumulação e sobre-expressão de PRDX II, (proteína antioxidante) em células MDA MB 231 depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo. Estas células poderão estar a tentar compensar a depleção de ANXA2, aumentando os níveis de outra proteína antioxidante, a PRDX II. Os resultados revelaram um aumento significativo de VEGFD nas células A549, depletadas de ANXA2, comparado às células controlo. Os resultados de expressão génica revelaram que a depleção de ANXA2 afetou a expressão de genes alvo de HIF- α como o *GLUT1*.

Palavras-chave: Anexina A2 (ANXA2), espécies reativas de oxigénio (ERO), hipóxia, *Hypoxia Inducible Factor* (HIF - α), vias de sinalização, proteínas antioxidantes.

Abstract

During tumour development cancer cells suffer oxygen deprivation (hypoxia) due to the very rapid and uncontrolled cell growth in conjunction with a poor blood supply. HIF is the main transcription factor that drives the hypoxic response leading to the expression of many target genes that regulate survival of cancer cells. Several studies have established that cancer cells undergoing hypoxic stress exhibit higher levels of reactive oxygen species (ROS) compared to non-hypoxic cancer cells. Due to their reactive properties ROS contribute to protein oxidation, lipid peroxidation and DNA damage that can ultimately result in cell death. However the ROS, hydrogen peroxide (H₂O₂) is an important second messenger in a large number of signaling pathways that regulate proliferation, differentiation, migration and apoptosis. The cellular antioxidant systems might play a main role in tumour progression during hypoxia regulating the maintenance of low to moderate levels of ROS while avoiding overload of ROS that can induce cell death. Our laboratory identified a novel redox regulatory function for annexin A2 (ANXA2) and showed that its antioxidant function plays a crucial role in supporting tumour growth and chemoresistance. With this project I investigated the role played by ANXA2 in oncogenic signaling pathways during hypoxia. Here, the activation of signalling pathways in pre-established MDA MB 231, HT1080 and A549 cancer cell lines with knockdown for ANXA2 and respective control cells was investigated by western blotting upon treatment of these cells with CoCl₂ a chemical hypoxia inducer and by exposing the cells to 1% of O₂ (real hypoxia) for different time points. qRT-PCR was performed to study alterations in gene expression upon ANXA2 depletion and hypoxia treatment compared to control cells. Biotinylated Iodoacetamide (BIAM) assays were done to assess the oxidation of reactive Cys residues in redox sensitive proteins upon hypoxia (1% O₂). Intracellular ROS level was also analyzed in ANXA2 depleted versus control cancer cells upon treatment with CoCl₂. Our results show that ANXA2 depletion in the three cancer cell lines induce higher accumulation of HIF- α compared to control cells. Interestingly, in HT1080 and A549 ANXA2 depleted cells we observed accumulation of HIF 2- α which was not observed in control cells. We observed upregulation of PRDX II (a redox regulatory protein) in ANXA2 depleted MDA MB 231 cells. ANXA2 knockdown cells might be upregulating PRDX II to compensate for the loss of the ANXA2 redox regulatory protein. In A549 ANXA2 depleted cells we observed a higher and significant accumulation of VEGFD compared to control cells. Gene expression results revealed that ANXA2 depletion affects some HIF- α targets, like *GLUT1*.

Keywords: Annexin A2 (ANXA2), reactive oxygen species (ROS), hypoxia, Hypoxia Inducible Factor (HIF - α), signaling pathways, antioxidant proteins.

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de Ilustrações	VII
Índice de Tabelas	VIII
Lista de Anexos	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
1. Introdução	1
1.1. Cancro	1
1.2. Hipóxia	4
1.2.1. Resposta hipóxica	6
1.2. Espécies reativas de oxigénio - ERO	9
1.3. ERO e estabilização de HIF-α	11
1.4. Sinalização celular mediada por ERO	12
1.5. Destoxificação e adaptação REDOX	14
1.6. Sistemas antioxidantes	15
1.7. Antioxidantes enzimáticos	16
1.7.1. Dismutases de superóxido	16
1.7.2. Catalase	16
1.7.3. Peroxidases de glutathiona	16
1.7.4. Peroxidases de tiorredoxina	16
1.8. Antioxidantes de Tiol	17
1.8.1. Glutathiona	17
1.8.2. Tiorredoxinas	18
1.9. Anexinas	19
1.9.1. Anexina A2 (ANXA2)	20
1.9.2. ANXA2 e o cancro	24
1.10. Hipótese	26
1.11. Objetivos	26
1.11.1. Objetivos específicos	26
2. Material e Métodos	27
2.1. Linha celulares estabelecidas:	27
2.2. Cultura de células	27
2.2.1. Descongelamento de células	27

2.2.2.	Manutenção, contagem e <i>stocks</i> das linhas celulares	28
2.2.3.	Preparação de placas, lisados proteicos e quantificação.....	30
2.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Western blotting</i>	32
2.4	DCF-DA - Determinação dos níveis intracelulares de ERO.....	35
2.5	Extração de RNA.....	36
2.6	Síntese de cDNA	36
2.7	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i> - qRT-PCR.....	37
2.8	Ensaio de Iodoacetamida Biotinilada (BIAM).....	39
3.	Resultados	42
3.1	Estabelecimento das linhas celulares.....	42
3.2	Hipóxia Química.....	43
3.2.1	Análise das vias de sinalização ativadas em resposta à hipóxia induzida por CoCl ₂ (hipóxia química).....	44
3.3	Hipóxia Real	48
3.3.1	Análise das vias de sinalização ativadas em resposta a condições de hipóxia real (1% de O ₂)	48
3.4	Análise da oxidação de resíduos de cisteína (Cys) reativos presentes em proteínas com capacidade redox após tratamento de hipóxia - BIAM	51
3.5	Análise da expressão relativa dos níveis de mRNA de genes regulados por HIF	53
3.6	Análise dos níveis de ERO em células depletadas de ANXA2 versus controlo....	57
4.	Discussão e Perspetivas Futuras	59
5.	Conclusão	67
6.	Referências Bibliográficas	69
Anexo I	XI
Anexo II	XII
Anexo III	XIII
Anexo IV	XIV
Anexo V	XV

Índice de Ilustrações

Figura 1.1. Modelo da carcinogénese: Iniciação, Promoção e Progressão.....	2
Figura 1.2. Marcas do Cancro.....	3
Figura 1.3. <i>Hypoxia inducible factor alpha (HIF – α)</i> é gerado no citoplasma.....	6
Figura 1.4. HIF e o metabolismo glicolítico.....	8
Figura 1.5. Espécies reativas de oxigénio (ROS) ativam vias de sinalização celular.....	13
Figura 1.6. Geração de ERO e níveis de toxicidade.....	15
Figura 1.7. Fontes endógenas de ROS e atividade redox.....	19
Figura 1.8. Estrutura da proteína ANXA2.....	21
Figura 1.9. Mecanismo de regulação redox de ANXA2.....	23
Figure 1.10. ANXA2 promove a tumorigénese e metastização.....	25
Figura 2.1. Contagem das células na câmara de Neubauer.....	30
Figura 2.2. Preparação da placa com o kit BCA Protein assay.....	32
Figura 2.3. Esquematização do método de 'sanduíche' na técnica de <i>western blot</i>	34
Figura 2.4. Medição dos níveis de expressão génica por qRT-PCR utilizando <i>SYBR Green</i> ..	38
Figura 2.5. Reatividade dos Tióis.....	39
Figura 2.6. Esquema de funcionamento do BIAM.....	40
Figura 3.1. Estabelecimento das linhas celulares.....	42
Figura 3.2. Estabelecimento da concentração de CoCl ₂ a ser utilizada nos ensaios de hipóxia química.....	44
Figura 3.3 Células HT1080 depletadas em ANXA2 expostas a 200 uM de CoCl ₂ estabilizam HIF-1 alfa.....	45
Figura 3.4. Células MDA MB231 depletadas em ANXA2 aumentam a PRDXII e estabilizam HIF 1- α após a exposição a 200 uM de CoCl ₂	46
Figura 3.5. Células A549 depletadas em ANXA2 expostas a 400 uM de CoCl ₂ estabilizam HIF 1- α	47
Figura 3.6. Células MDA MB 321 depletadas em ANXA2 mostram a indução de PRDX II em resposta afetando a expressão de HIF 1-alfa.....	49
Figura 3.7. Células depletadas em ANXA2 estabilizam HIF-1 e 2 alfa e ativação da via PI3K/AKT em resposta a um tratamento de hipóxia comparadas às células controlo.....	50

Figura 3.8. Depleção de ANXA2 aumenta os níveis de PRDXII em células MDA MB231 e VEGFD em células A549.....	51
Figura 3.9. Células HT1080 WT revelam estado oxidação-redução após serem submetidas a condições de hipóxia (1% O ₂).....	52
Figura 3.10. Expressão relativa dos mRNAs correspondentes ao gene da Perxirredoxina I (PRDX I) e Peroxirredoxina II (PRDX II) em células MDA MB 231 não tratadas.....	54
Figura 3.11. Expressão relativa dos mRNAs em células HT1080 WT expostas a um tratamento de hipóxia (1.5% O ₂) versus não tratadas.....	55
Figura 3.12. Expressão relativa dos mRNAs em células A549 depletadas em ANXA2 versus controlo expostas a um tratamento de hipóxia (1.5% O ₂).....	56
Figura 3.13. Medição da concentração de ERO pelo ensaio DCF-DA em células MDA MB 231, HT1080 e A549 com knockdown para a ANXA2 (shRNA3 e 4) e respetivo controlo (shRNA scramble) sob condições de hipóxia.....	57

Índice de Tabelas

Tabela I: Lista de linhas celulares, identificação, descrição e origem.....	27
Tabela II: Lista de Anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.....	34
Tabela III: Lista de primers utilizados no qRT-PCR.....	38

Lista de Anexos

Anexo I: Lista de equipamentos e componentes de géis para SDS-PAGE.....	XI
Anexo II: Soluções Tampão.....	XII
Anexo III: Solução ECL.....	XIII
Anexo IV: Poster apresentado no segundo congresso internacional da ASPIC – IPO Porto, Portugal, 28 e 29 de Abril de 2016.....	XIV
Anexo V: Certificado de participação no segundo congresso internacional da ASPIC – IPO Porto, Portugal, 28 e 29 de Abril de 2016.....	XV

Lista de Abreviaturas

A

ANXA2: anexina A2
ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
AMPK: *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*
APS: *amoniun persulphate* (persulfato de amónia)
APC: *Adenomatous polyposis coli*
ATP: *Adenosine triphosphate*
AKT: *Protein kinase B*
API1: *Activator protein 1*

B

BCA: ácido bicinconínico
BIAM: *biotinilated iodoacetamide* (iodoacetamida biotinilada)
BCL-2: *B-cell lymphoma 2*
BSA: *bovine serum albumin*

C

Cys-SH: resíduo de cisteína na forma tiol
Cys-S- resíduo de cisteína na forma anião tiolato
Cys-OH: resíduo de cisteína oxidado
Ca²⁺: ião de cálcio
Cu²⁺: ião de cobre
CO₂: dióxido de carbono
CoCl₂: cloreto de cobalto
CREB: *cAMP responsive element binding protein 1*
CXCR4: *C-X-C Chemokine Receptor type 4*

D

DMSO: dimetilsulfóxido
DMEM: *dulbecco's modified eagle medium*
DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
cDNA: DNA complementar
DCF-DA: diclorofluoresceína diacetato

E

ECL: *enhanced chemiluminescence substrat*
EGF: *Epidermal growth factor*; fator de crescimento epidermal;
EPO: eritropoetina
ERO: espécie reativa de oxigénio
ERK: *extracellular signal-regulated kinase*
ECM: *extracellular matrix*
ENO: Enolase
ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*

F

FBS: *fetal bovine serum* (soro fetal bovino)
Fe²⁺: Ferro
FIH: *Factor inhibiting hypoxia-inducibile factor*
FN1: *Fibronectin 1* (Fibronectina 1)

G

GLUT1: *Glucose transporter 1*
GSH: Glutaciona reduzida

H

HRP: *horseradish peroxidase enzyme* (enzima peroxidase de rábano)
H₂O: água
H₂O₂: peróxido de hidrogénio
HIF – α : *Hypoxia inducibile factor – α* (factor indutor de hipóxia)
HIV: *human immunodeficiency virus* (vírus de imunodeficiência humano)
HO1: *Heme oxygenase*

I

iNOS: *Inducible nitric oxide synthase*
IGF-BP: *Insulin-like Growth Factor Binding-Protein* (Fator de ligação do Fator de Crescimento de Insulina)

J

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

L

LDHA: *Lactate Dehydrogenase A*

M

Myc: *Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene*
MMP2: metaloprotease 2
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*
MDR1: *multidrug resistance 1*

N

NT: não tratadas
Ni²⁺: níquel
NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NES: *nuclear export signal*
NOX: NADPH oxidases

O

O²⁻: ião superóxido
OH[•]: radical hidroxilo
O₂: oxigénio

P

PRDX II: peroxirredoxina II

PRDX I: peroxirredoxina I

PBS: *phosphate buffer saline* (tampão fosfato salino)

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

pVHL: *von Hippel–Lindau tumor suppressor*

PHD: *prolyl hydroxylase*

PDK1: *Pyruvate dehydrogenase kinase*

PKM: *pyruvate kinase M*

Q

qRT-PCR: *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

R

Rb: retinoblastoma

Ref-1: *Redox factor-1*

S

SDS: *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

shRNA: *short hairpin RNA*

siRNA: *small interfering RNA*

SOD: superóxido dismutase

RNA: ribonucleic acid

T

Trx: tiorredoxina

TBS-T: tampão salino *tween 20*

TAM: *Tumour associated macrophages*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TEMED: *Tetramethylethylenediamine*

TGF: *Transforming Growth Factor*

TP53: *Tumour Protein P53*

V

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial).

VEGFR: *VEGF receptor* (recetor VEGF).

U

UV: *ultra violet*

UPAR: *Urokinase Plasminogen Activator Receptor*

W

WT: *wild type*

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Oliver Wendell Holmes

1. Introdução

1.1. Cancro

As células normais colaboram umas com as outras construindo tecidos e órgãos até a formação de um organismo adulto. Esta comunicação é feita de forma controlada pelas células vizinhas que asseguram o tamanho e arquitetura adequados dos tecidos e órgãos de modo a garantir o bom funcionamento do organismo ¹. Isto significa que uma célula normal apenas se divide quando lhe é dada essa instrução pelas células vizinhas. Uma célula cancerígena por seu lado, não respeita as instruções que lhe são atribuídas pelo seu microambiente, o que se reflete na sua proliferação desregulada, podendo até adquirir a capacidade de migrar desde o tecido onde foi originada e invadir outros tecidos ². A anormalidade das células cancerígenas se desenvolve de forma gradual e progressiva até adquirir um comportamento agressivo e invasivo (malignidade), estas fases de desenvolvimento podem ser visíveis a nível histológico. A acumulação progressiva de mutações que afetam a proliferação e sobrevivência permite que as células cancerígenas alterem o seu comportamento tornando-se independentes dos mecanismos normais de controlo do ciclo celular ¹.

As células malignas podem então apresentar numerosas mutações/ alterações genéticas desde, rearranjos, amplificações, deleções, mutações de nucleótidos, metilação e acetilação do DNA entre outras que podem resultar na inativação de genes supressores de tumor, genes que inibem a proliferação celular (*p53*, *Rb*, *APC*, *PTEN*, entre outros) e/ou ativação de proto-oncogenes, genes que induzem a tumorigénese (*MYC*, *RAS*, *ABL*, *BCL-2*, entre outros) através do controlo do ciclo celular, sobrevivência, apoptose, imortalização e reparação de DNA.

Assim, esta transformação de uma célula normal numa célula neoplásica é caracterizada por três etapas, nomeadamente: Iniciação, Promoção e Progressão – figura 1.1. O passo de iniciação compreende mutações devido a danos no genoma que podem ser originadas por fatores exógenos e/ou endógenos. Os conservantes utilizados na preservação da comida, estilo de vida, álcool, tabaco, radiação ionizante, compostos químicos, asbestos e xenobióticos são alguns exemplos de fatores extrínsecos com potencial carcinogénico. De entre os agentes intrínsecos destacam-se: a disrupção do

sistema imune e subsequente inflamação crónica (ex cirrose), metabolismo (ex. formação de radicais livres durante a respiração aeróbia), mutações hereditárias. No entanto, apenas 5 % dos cânceres são hereditários e os restantes 95 % devem-se sobretudo a fatores extrínsecos^{3,4}.

Na fase de promoção, existe um crescimento clonal seletivo da célula alterada que dá origem a uma pré-neoplasia. O crescimento e proliferação celular são cruciais para a última etapa do desenvolvimento tumoral: Progressão; nesta fase as células adquirem mutações necessárias para se deslocarem do seu ambiente de origem, migrarem e invadirem outros tecidos formando novos focos tumorais, ou tumores secundários designados por metástases^{1,5}.

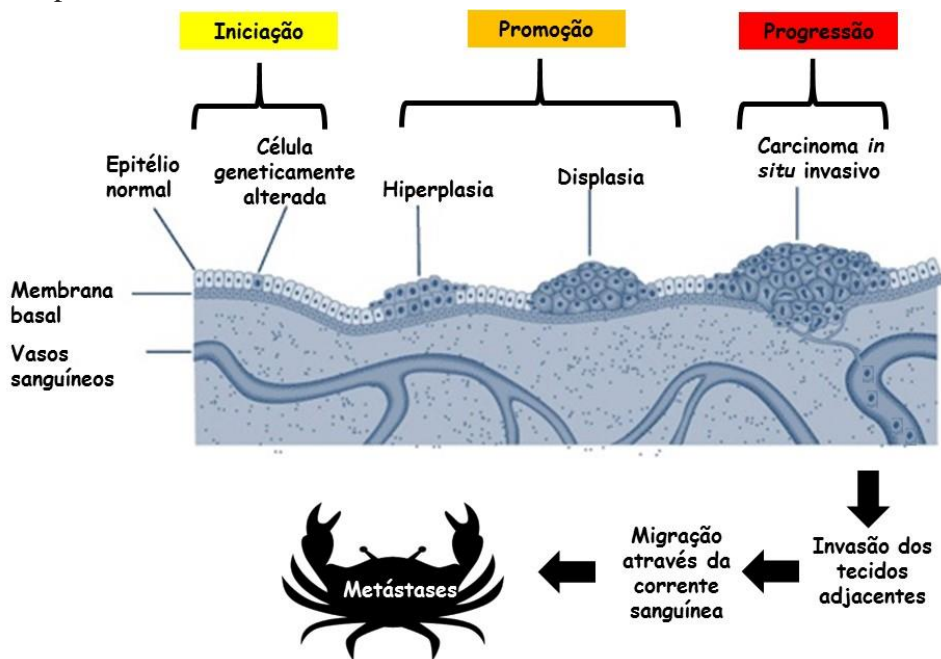


Figura 1.1 - Modelo da carcinogénese: Iniciação, Promoção e Progressão. A carcinogénese começa quando uma célula geneticamente alterada de uma população normal sustem capacidades proliferativas e de sobrevivência conseguindo escapar à morte celular e prevalecendo nessa população - **Iniciação**. Esta célula aparentemente normal dá origem a inúmeros clones (hiperplasia). Após alguns anos, uma destas células adquire novas mutações que levam um crescimento descontrolado, perda da orientação, resistência à apoptose, alterações na forma, no tamanho e número de mitoses (Displasia) levando à formação de tumores – **Promoção**. As células continuam a adquirir alterações genéticas que levam um tumor benigno degradar a matriz extracelular e invadir os tecidos e vasos sanguíneos ou linfa passando a ser considerado maligno - **Progressão**. As células nesta fase de migração, extravasam a vasculatura e quando encontram condições propícias ao seu desenvolvimento estabelecem novos tumores designados de metástases. Adaptado de Weinberg 1996.

O fenótipo maligno é portanto o resultado destas alterações que permitem à célula ganhar uma série de características que lhes confere vantagens como a inibição do sistema imune, aquisição de recetores de superfície, enzimas para degradar/proteolisar barreiras anatómicas, citocinas e fatores angiogénicos para facilitar a mobilidade e o aporte de nutrientes e oxigénio. Consequentemente, estas alterações levam a mudanças do

comportamento celular como: crescimento descontrolado, resistência a inibição por contato, instabilidade genômica e propriedades metastáticas -ver figura 1.2.

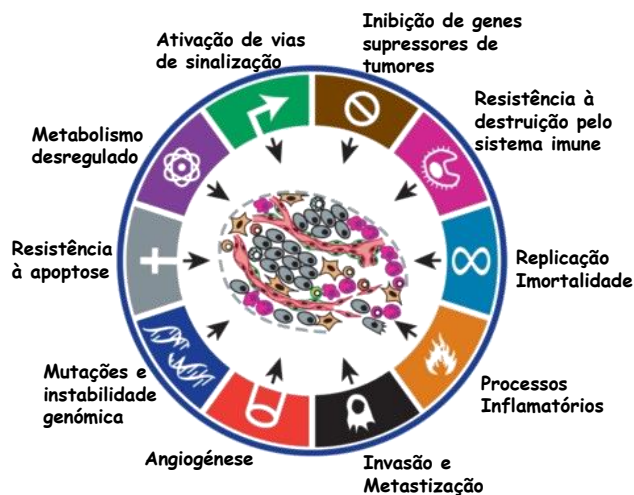


Figura 1.2. Marcas do cancro. A investigação avançada no cancro revelou inúmeras capacidades que as células cancerígenas adquiriram para escapar aos mecanismos de defesa do nosso organismo e formar neoplasias. A instabilidade genômica e alterações gênicas devido a mutações são os principais guias da progressão tumoral. Os processos inflamatórios designados para combater as infeções e restabelecer o tecido após um corte podem favorecer o crescimento e sobrevivência do tumor através dos sinais citotóxicos enviados pelas células do sistema imune. O crescimento tumoral pode levar a zonas de hipóxia obrigando as células a recrutarem fatores indutores de novos vasos sanguíneos, favorecendo a malignidade e originando tumores secundários devido à capacidade de invasão e metastização que estas células desenvolvem. Adaptado de ¹¹⁰

Descobertas feitas por arqueologistas revelaram a ancestralidade do cancro: a análise de um esqueleto humano com cerca de 2700 anos revelou evidências de um cancro da próstata que se espalhou para os ossos. Outras evidências foram encontradas em múmias, fósseis de animais e outros primatas ⁶.

Hipócrates, físico grego e pai da medicina (460-370 a.C.), descreveu pela primeira vez o cancro como um “caranguejo” devido à irrigação sanguínea na maioria dos tumores semelhante a um organismo com várias patas, um caranguejo ^{6,7}. São raras as evidências na pré-história de cancro em humanos, no entanto, a falta de evidência e métodos de diagnóstico deixa muitas lacunas por preencher de como e o que é que levou ao desenvolvimento do cancro nestes organismos ⁷.

Ao longo dos anos a incidência de cancro na população tem vindo a aumentar, podendo ser devido a dois fatores principais: aumento da esperança média de vida, pois ao longo dos anos os nossos mecanismos de reparação de danos no DNA deixam ser tão eficazes, e exposição a agentes cancerígenos como tabaco, químicos, radiação, infeções entre outros ^{6,8}. Tipicamente são necessárias décadas para uma célula adquirir todas as

transformações necessárias, sem serem reparadas pela maquinaria da célula e então se transformar numa célula cancerígena. Por este motivo, o cancro é mais comum em pessoas com idade mais avançada ⁶.

Cerca de 90% das mortes relacionadas com o cancro devem-se à formação de metástases. O cancro constitui um enorme problema de saúde global causando mais mortes do que o HIV, tuberculose e malária em conjunto. Em 2008 foram diagnosticados 12.7 milhões de casos e registadas cerca de 7.6 milhões de mortes causadas por cancro no mundo segundo a *American Cancer Society*. Em 2030 são estimados cerca de 21.4 milhões de novos casos e espera-se cerca de 13.2 milhões de mortes associadas ao cancro devido ao crescimento e envelhecimento da população ³.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em Portugal a mortalidade por cancro mais comum nos homens deve-se a cancro do pulmão (19.3%), colo rectal (15.3%), próstata (11.8%), gástrico (9.7%) e pancreático (4.8%). Nas mulheres, as mortes mais comuns devem-se principalmente a cancro da mama (16.9%), colo rectal (16.3%), gástrico (9.4%), pulmão (8%) e linfomas (6.2%). Estes dados são referentes a 2014 ⁹.

Apesar dos avanços na ciência e sobretudo na investigação em cancro, todos os esforços são necessários para compreender melhor esta doença e torna-se cada vez mais necessário incentivar a adoção de novas medidas e estilos de vida diferentes na população como: dietas saudáveis, atividade física, entre outros de forma a prevenir um dos maiores assassinos do mundo.

1.2 Hipóxia

Durante a progressão tumoral, a expansão e crescimento das células cancerígenas podem levar à formação de massas compactas (tumores sólidos). A proliferação rápida, anomalias estruturais e funcionais e a alta taxa metabólica associadas podem causar uma grande redução de O₂ dentro do tumor até valores fisiológicos muito baixos ^{10,11}. Esta redução, conhecida como hipóxia tumoral, é característica de tumores sólidos. Devido ao aumento de massa tumoral as células do centro desta massa ficam sob tensões muito baixas de oxigénio, e não conseguem ter acesso aos suplementos essenciais para continuar a dividir-se ^{12,13}.

A descoberta da hipóxia tumoral é relativamente recente. Foi há 60 anos, quando Thomlinson and Gray observaram que os tumores apresentavam regiões com baixos níveis de oxigénio e viram que havia uma relação de distribuição entre áreas necróticas e a vasculatura ¹³.

Hypoxia inducible factor (HIF) é um sensor molecular de O₂ que atua como fator de transcrição responsável pela transcrição de genes que promovem a proliferação, sobrevivência celular e adaptação a condições de hipóxia. O HIF pertence a uma família de fatores de transcrição caracterizada como *basic-loop-helix-loop* que se liga ao DNA na forma de heterodímero; na sua constituição verifica-se uma subunidade α regulada por oxigénio (HIF-1 α ; HIF-2 α ; HIF-3 α) e uma subunidade HIF-1 β , metabolicamente estável, a qual dimeriza com HIF- α em condições de hipóxia ^{14,15}. Todas as isoformas α agem como sensores dos níveis de oxigénio ¹⁶.

O HIF- α é então produzido em condições de normóxia no citoplasma com tempo médio de vida de 10 minutos ². Contudo, quando a quantidade de O₂ exigida é superior à disponível, as células entram em hipóxia e conseqüentemente sofrem uma crise metabólica que as obriga a adaptar-se a esta situação por forma a sobreviverem ¹⁷. Desta forma, o tempo de vida do HIF α é mais longo em hipóxia, ativando inúmeras vias de sobrevivência o que lhe confere a característica de um importante regulador metabólico. A regulação deste fator é controlada sobretudo pelos níveis de O₂ disponíveis, ou seja, menos oxigénio mais estabilidade da proteína HIF α ¹⁸.

A maioria do O₂ é consumido pela mitocôndria deixando uma parte livre para outras di-oxigenases não mitocondriais como é o caso das hidroxilases de prolina (prolyl hidroxilases, PHD) e do fator de inibição do HIF (*factor inhibiting HIF*, FIH) ¹⁷. As PHD têm como substrato o HIF- α ao qual adicionam grupos hidroxilo (OH) que são reconhecidos, mais tarde, pela ligase de ubiquitina pVHL, uma proteína supressora de tumores que também é responsável pelo recrutamento de outros elementos que conjuntamente com as elonguinas B, C e cullin-2 formam um complexo de ubiquitinases levando o HIF α à degradação pelo proteossoma ¹⁹. O FIH, por outro lado, hidroxila o resíduo de Asp⁸⁰³ de HIF - α , inibindo a interação da subunidade α com o complexo CBP/p300 e a subunidade HIF -1 β ¹⁷.

Em condições de hipóxia este ciclo produção-degradação é interrompido visto que as hidroxilases ficam impossibilitadas de exercer a sua função sem O₂ ¹⁹. A concentração celular de HIF- α aumenta no citosol e migra para o núcleo onde dimeriza com o complexo

HIF-1 β e se associa aos co-factores CBP/p300 resultando na transcrição de genes envolvidos na sobrevivência, angiogénese, eritropoiese, glicólise e transporte de glucose para dentro das células permitindo que sobrevivam em condições adversas – ver figura 1.3 (Weinberg, 2014).

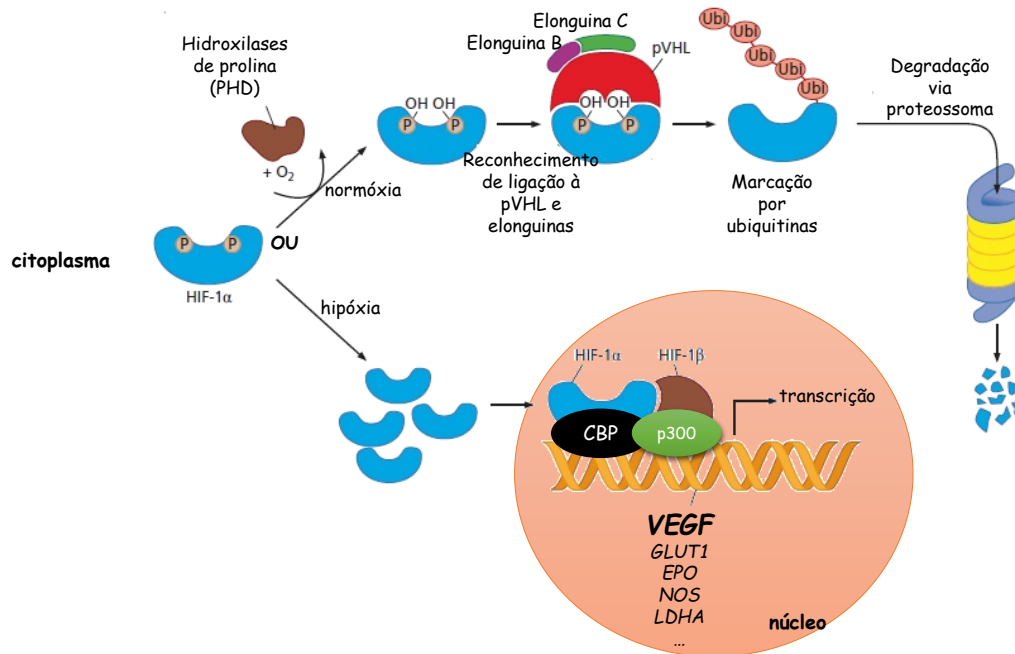


Figura 1.3. Hypoxia inducible factor alpha (HIF – α) é gerado no citoplasma. Em condições de normóxia é hidroxilado pelas PDH e marcado com ubiquitinas (pela pVHL) e posteriormente degradado via proteossoma. Em condições de hipóxia, as PDH são impossibilitadas de exercer a sua função devido ao défice de O₂ e HIF- α é estabilizado e migra para o núcleo onde dimeriza com a sub-unidade HIF-1 β , metabolicamente estável, e se associa ao complexo CBP/p300 induzindo a transcrição de genes que promovem a sobrevivência, mecanismo glicolítico, adaptação metabólica, etc. Adaptado de ².

1.2.1 Resposta hipóxica

Na década de 90, Semenza *et al* preconizou a identificação de uma região promotora em alguns genes relacionados com a homeostasia sistémica, local ou intracelular, sobrevivência, proliferação ou genes cuja expressão está de certa forma relacionada com os níveis intracelulares de O₂ ²⁰.

Hoje sabe-se que HIF é um fator de transcrição que regula uma grande variedade de genes cuja função vai desde a proliferação celular (ex. ciclinas, *IGF*, *TGF*), sobrevivência (ex. *IGF-BP*, *TGF*), apoptose (ex. *NIP3*), motilidade (*TGF*), eritropoiese (*EPO*), angiogénese (*VEGF*), invasão/metastização (*CXCR4*, *MMP2*, *FNI*, *Colagénio*

tipo V, UPAR), metabolismo glicolítico (*GLUT1, LDHA, ENO*), resistência a drogas (MDR1), entre outros ²¹⁻²³.

Existem dois fatores maioritariamente envolvidos na resposta ao stress hipóxico: AMPK (*AMPK-activated protein kinase*) e o HIF. A AMPK atua como um sensor de energia, sensível a mudanças da concentração de ATP intracelular.

Um dos mecanismos imprescindíveis às células cancerígenas, é o mecanismo glicolítico (por exemplo, via *GLUT1, LDHA*) e importe de ATP durante a hipóxia; o aumento da atividade transcricional de HIF leva a um aumento significativo do importe de glucose e conseqüentemente da quantidade de ATP mediada pela glicólise, a via primária de produção de ATP nas células cancerígenas; 1 molécula de glucose metabolizada em 2 ATP – ver figura 1.4. No entanto, apesar da respiração oxidativa ser muito mais vantajosa a nível energético (32 ATP) as células cancerígenas mantêm o mecanismo glicolítico mesmo na presença de oxigénio – chamado efeito de *Warburg* ¹⁷. Uma possível explicação para esta preferência deve-se ao facto da glicólise atuar como um gerador independente de ATP cujos intermediários funcionam como precursores de moléculas envolvidas no crescimento e proliferação celular como por exemplo, na biossíntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e lípidos. Desta forma, ao bloquear o último passo da glicólise (ciclo de *Krebs*), as células cancerígenas asseguram a acumulação dos intermediários necessários para a biossíntese ^{2,24,25}. Este bloqueio é possível devido à ativação da cinase desidrogenase de piruvato (*piruvate dehydrogenase kinase, PDK*) por HIF que por sua vez inibe a desidrogenase de piruvato mitocondrial (*piruvate dehydrogenase, PDH*) reduzindo o importe de piruvato (e conversão para acetil CoA) para o ciclo do ácido Tricarboxílico ou ciclo de *Krebs* ver figura 1.4. O substrato 2-oxoglutarato é um dos intermediários do ciclo de *Krebs*, utilizado pelas PHD para exercer a sua atividade de hidroxilase. O facto das células reduzirem/inibirem a atividade do ciclo de *Krebs* e o consumo de oxigénio, não só economiza a utilização de O₂, como também contribui para a acumulação de HIF- α por redução de uns dos substratos das PHD²³. Visto

que a glicólise consegue atuar independentemente dos níveis de O_2 acaba por ser muito mais vantajoso manter um mecanismo glicolítico, pelas razões mencionadas acima ²⁵.

Um dos principais genes regulados por HIF é o *VEGF* – figura 1.3. A proteína VEGF liga-se ao seu recetor (VEGFR) ativando a proliferação de células endoteliais formando uma nova vasculatura (angiogénese/linfangiogénese). Elevados níveis de VEGF levam à formação de uma vasculatura tumoral deficiente, tortuosa, desorganizada e com maior permeabilidade ²⁶. Este passo é fundamental para a expansão tumoral visto que permite, em conjunto com outros fatores (como por exemplo a ativação de

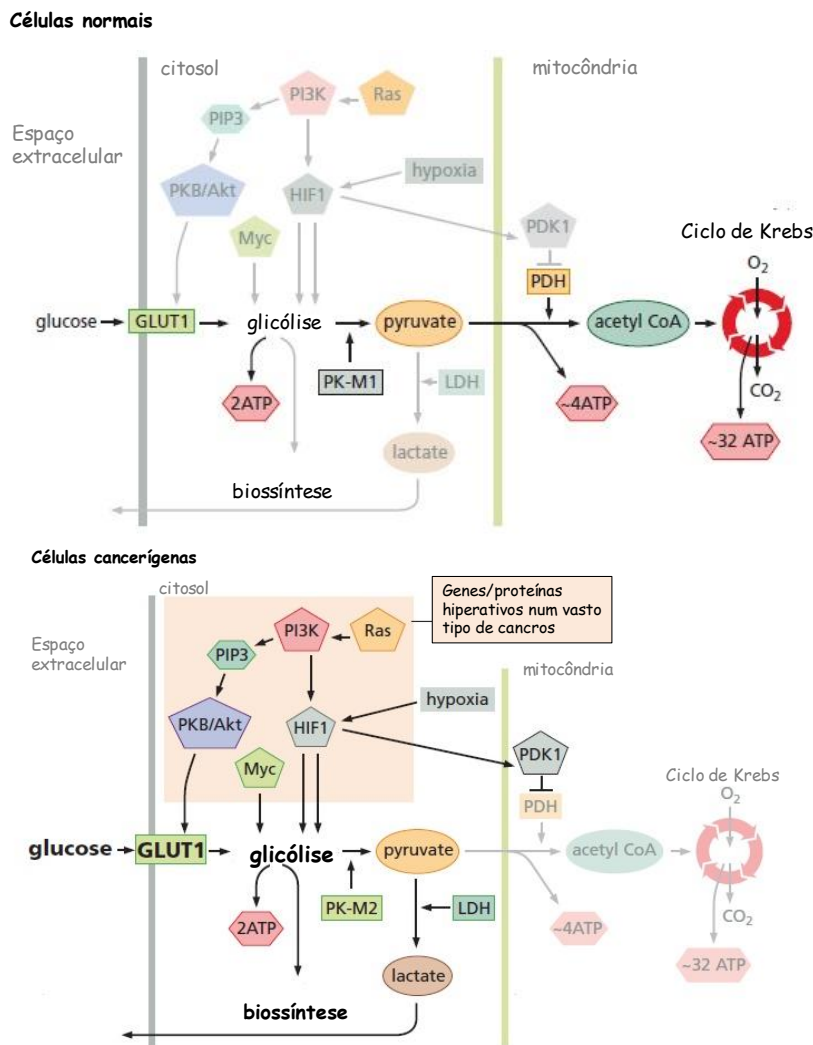


Figura 1.4. HIF e o metabolismo glicolítico. Em células cancerígenas em hipóxia, HIF α é estabilizado reforçando o importe de *GLUT1* aumentando o transporte glicolítico. A enzima Desidrogenase de Lactato A (LDHA) converte o piruvato a lactato que depois é transportado para fora da célula e é utilizado como substrato na respiração por outras células não-hipóxicas. O piruvato, considerado um ponto de controlo metabólico crucial, pode ser convertido em acetil-coenzima o complexo desidrogenase de piruvato (PDH) permitindo a entrada desta no ciclo de *Krebs* (células normais). No entanto, em células cancerígenas em hipóxia, a cinase desidrogenase de piruvato (PDK1), ativada por HIF1, tem como alvo fosforilar o domínio catalítico de PDH, impedindo-o de converter o piruvato em acetil CoA inativando toda a maquinaria seguinte. Desta forma é favorecido o metabolismo glicolítico como fonte de ATP, biossíntese de ácidos nucleicos e lípidos. Adaptado de ^{2,111}

metaloproteases –MMP2) a intravasão das células na corrente sanguínea e colonização de outros tecidos, formando tumores secundários – metástases – figura 1.3 (SCHULZ, W. A. 2005; Gilkes, 2014).

Este *stress* hipóxico induz uma vasta gama de alterações na estrutura da mitocôndria, atividade e instabilidade genómica. Consequentemente estas alterações geram disfunção mitocondrial que por sua vez, leva a *stress* oxidativo, levando a uma diminuição da produção de ATP, acumulação de mutações (DNA mitocondrial), formação de espécies reativas de oxigénio (ERO) e aumento do dano oxidativo. Estas espécies medeiam por sua vez a estabilização de HIF- α através da oxidação do ião de ferro, [Fe(II) \rightarrow Fe(III)] impossibilitando as PHDs de exercerem a sua função, mecanismo descrito nas secções seguintes ²⁷⁻²⁹.

1.2 Espécies reativas de oxigénio - ERO

O nível de oxigénio na atmosfera tem um papel crucial durante a evolução desde uma realidade virtualmente anóxica de cerca de 15 % de O₂ atmosférico há 1.8 milhares de milhões de anos para a situação atual de 21 % ³⁰. A respiração mitocondrial é responsável por 90 % do oxigénio consumido por nós, humanos. As células utilizam o oxigénio como o último aceitador de eletrões na respiração aeróbia para gerar ATP, vital para a produção de energia e para o seu funcionamento ¹⁷. No entanto, a redução molecular do O₂ pode ocorrer de forma parcial gerando espécies reativas de oxigénio (ERO). As ERO intracelulares são então sub-produtos da redução incompleta do oxigénio (O₂) que resultam em espécies altamente reativas com DNA, lípidos e proteínas. De entre estas espécies reativas destacam-se: o anião superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o radical hidroxilo (HO⁻). O O₂⁻ é formado durante a respiração oxidativa através da redução molecular incompleta do O₂ e é rapidamente convertido em H₂O₂, de modo espontâneo ou através da ação da dismutase de superóxido (superoxide dismutase, SOD) ^{31,32}. O H₂O₂, consegue atravessar membranas celulares por difusão e através de aquaporinas. O H₂O₂ interage com iões de ferro Fe²⁺ ou Cu⁺ oxidando-os, e ficando reduzido ao radical OH⁻ - reação de *Fenton* ³¹. O OH⁻ é a molécula mais instável, com tempo de vida curto (10⁻⁹ segundos) e responsável por danos sobretudo ao nível do DNA. Devido à elevada reatividade de OH⁻, este rapidamente ataca o DNA oxidando bases e

causando quebras nas cadeias simples e duplas, modificação das bases purina e pirimidina ou até mesmo o bloqueio das DNA/RNA polimerases levando a erros de replicação e instabilidade genômica, associados à carcinogênese³³⁻³⁵. O O_2^- possui também um tempo de vida curto tendo sido originalmente proposto a teoria de que participava na sinalização celular, no entanto hoje em dia sabe-se que esta molécula é o precursor de H_2O_2 que por sua vez tem uma função de mensageiro secundário em vias de transdução de sinal³⁶.

As mitocôndrias são os organelos de maior consumo de oxigênio e por sua vez são consideradas o organelo que mais contribui para a produção de ERO intracelular, através dos complexos I, II e III^{15,37}.

As ERO podem também ser produzidas após estímulos celulares, de forma induzida pelas NADPH oxidases (NOX), responsável pela formação da primeira espécie reativa: O_2^- . As NOX são complexos enzimáticos essencialmente localizados na membrana plasmática mas também nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático e constituem os principais produtores enzimáticos de ERO³⁸. As células possuem um elevado número de dismutases de superóxido, enzimas responsáveis pela dismutação do O_2^- em H_2O_2 , que é novamente convertido em H_2O por peroxidases de tiorredoxina, como as peroxirredoxinas e por peroxidases de glutatona no citosol e nas mitocôndrias (estes sistemas antioxidantes serão descritos em detalhe adiante). O *stress* oxidativo causado pelo aumento dos níveis intracelulares de ERO pode ter causas naturais como situações de exercício físico extremo ou resposta inflamatória, mas também pode ter causas não naturais como a ingestão de xenobióticos; ex: substâncias químicas presentes em pesticidas^{36,39,40}.

As fontes de ERO podem ser endógenas como referido acima ou exógenas como é o caso do tabaco, uma fonte carcinogénica de ROS que pode causar um aumento de danos oxidativos no DNA num ratio de 30-50%; e a radiação ionizante³⁵. As células, incapazes de remover os danos tentam recorrer à morte celular programada para garantir que as mutações criadas por ERO não são herdadas pelas células filhas; contudo sob certas circunstâncias, essas mutações conferem a vantagem de resistir à apoptose aumentando desta forma a probabilidade de um crescimento tumorigénico⁴¹.

Estudos revelam que quando a célula atinge níveis aberrantes de ERO, que ultrapassam a capacidade celular de inativar ERO, pode causar danos irreversíveis, implicados em vários eventos celulares como proliferação, diferenciação, adaptabilidade metabólica, migração e apoptose, causando o desenvolvimento de doenças como o

cancro, doenças neuro degenerativas, cardiovasculares, gastrointestinais e diabéticas 15,31,32,42 .

1.3 ERO e estabilização de HIF- α

O HIF- α responde não só a estímulos hipóxicos mas também a estímulos não hipóxicos como à insulina, entre outros, que também induzem ERO como parte das cascatas de sinalização interferindo diretamente com a estabilização de HIF- α em células mesmo em normóxia ^{15,43}. Sabe-se que as mitocôndrias possuem também um papel de sensor os níveis de oxigénio devido à sensibilidade do complexo III no qual está envolvido a cadeia de transporte de eletrões (*electron transport chain* – ETC). Estudos demonstraram que sob condições de hipóxia (1.5 % O₂) este organelo produz uma elevada quantidade de ERO proveniente especialmente da ETC cuja atividade contribui para um dos mecanismos de inativação das PHD e da degradação de HIF- α ^{23,44}. As PHD requerem a presença de três substratos para operar: O₂, 2-oxoglutarato (mencionado anteriormente) e Fe[II]. As ERO conseguem regular a atividade catalítica das PHD na medida em que interfere com a quantidade de Fe[II] disponível para o funcionamento das PHD ⁴⁵. A reação de *Fenton* caracteriza-se, portanto, pela oxidação de Fe[II] a Fe[III]: H₂O₂ + Fe[II] → OH• + OH⁻ + Fe[III]. Esta reação inibe as PHD contribuindo para a estabilização de HIF- α e transcrição de genes regulados por este fator de transcrição ¹⁵.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que células em hipóxia são caracteristicamente resistentes a radiação ionizante e algumas drogas anticancerígenas ^{46,47}. Este facto está correlacionado com um mau prognóstico em vários tipos de cancro devido a fatores como: (1) a hipóxia induz a paragem do ciclo celular ou diminui o rácio de proliferação. Tendo em conta que algumas drogas atuam sobretudo em células em proliferação (ex: taxanos e antraciclina) torna-se difícil induzir a morte das células alvo; (2) Distância da vasculatura. Devido à distribuição não-homogénea da vasculatura, estas drogas não conseguem atuar em células distantes dos vasos sanguíneos; (3) amplificação de genes (ex. *RAS*, *MYC*) e (4) produção de proteínas que conferem quimioresistência (ex. ANXA2) ⁴⁸.

Várias drogas quimioterapêuticas levam à morte celular através de mecanismos que induzem a produção de ROS, ex. etoposido, doxorubicina, tamoxifeno. No entanto,

células em hipóxia aumentam a sua capacidade antioxidante como resposta ao *stress* oxidativo a que se encontram sujeitas. Devido a este aumento do sistema antioxidante, quando introduzido um tratamento quimioterapêutico que induz ROS, as células já possuem uma certa resistência a este mecanismo, o que por sua vez irá contribuir mais uma vez, para a estabilização de HIF- α – figura 1.5 ^{27,36,49}. Estudos mostraram que HIF- α estimula também a expressão de genes que codificam para proteínas antioxidantes em ratinhos como o *SOD2* ²³. Em correlação com estes factos, a depleção de HIF levou à redução de outras proteínas com funções antioxidantes *HMOX1* e outros, que por sua vez, levou a consequentes níveis elevados de ERO, quebras no DNA e morte celular por aumento transcricional de p53, o guardião do genoma ⁵⁰. A atividade do p53 e os níveis de ERO foram significativamente atenuados com a adição de antioxidantes, o que revela evidências suficientes de que as células necessitam manter os níveis de ERO controlados para que estes não se tornem citotóxicos e a célula cancerígena consiga sobreviver ^{23,51}.

1.4 Sinalização celular mediada por ERO

Existem dois fatores importantes que contribuem para determinar a interação de ERO com o alvo: o organelo onde é produzido e a reatividade do alvo. O local onde a ERO é produzida é muito importante no caso de moléculas que apresentem um fator de difusão limitado. Visto que estas moléculas não conseguem regular ao longo da via de sinalização, mas apenas iniciá-la ou inibi-la, o alvo apenas é atingido se estiver relativamente perto das moléculas de ERO ⁵². Desta forma o sítio onde é produzido pode também permitir a acumulação local de ERO, pelo que a sua distribuição na célula não é uniforme e a ativação das vias pode acontecer de forma oportunista. A reatividade do alvo por sua vez engloba propriedades químicas e estruturais como por exemplo, a existência de grupos $-S^-$ (ião tiolato) que permitam a interação entre a ERO e o alvo proteico. ^{52,53}. Normalmente, as células utilizam níveis transientes de ERO para ativar mecanismos de proliferação e sobrevivência ³⁶. O H_2O_2 atua como segundo mensageiro para regular a transdução de sinal ativando várias vias de sinalização– ver figura 1.5 ^{31,54}. As proteínas com resíduos de cisteína reativos são os principais alvos redox do H_2O_2 . As cisteínas podem existir sob duas formas: na forma sulfidrilo (Cys -SH) ou como anião tiolato (Cys- S^-) que é muito mais reativo, reversivelmente oxidado (enquanto que os grupos -SH não

são). Contudo, em ambientes básicos estas cisteínas podem aumentar a sua reatividade com H_2O_2 ,⁵¹. A reação de ionização dá-se por substituição nucleofílica (SN_2) e quanto menor for a estabilidade do grupo tiolato, maior será a magnitude da reatividade com H_2O_2 .

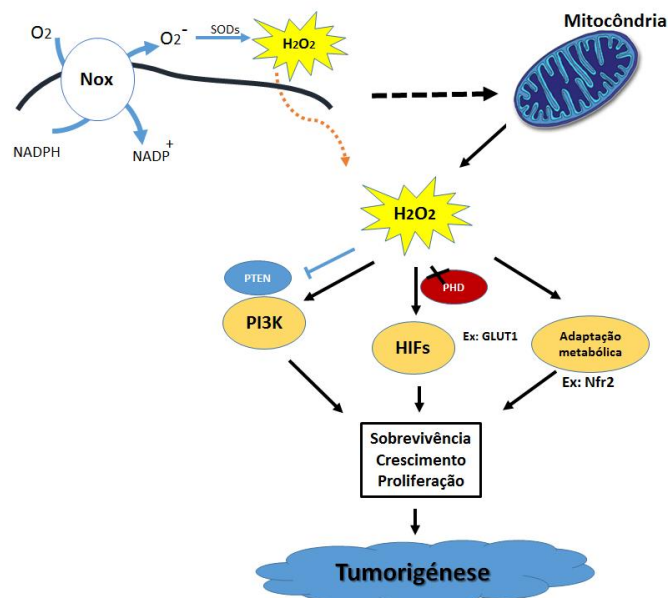


Figure 1.5. Espécies reativas de oxigênio (ROS) ativam vias de sinalização celular. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) derivado nas NADPH oxidases (NOX) entra na células por aquaporinas e/ou difusão membranas reagindo com vários alvos levando à ativação de vias indutoras de sobrevivência, crescimento e proliferação celular. Algumas das vias mais sensíveis estão mencionadas. São elas: PI3K/AKT por inibição do inibidor da via (PTEN), HIF- α por inibição das hidroxilases de prolina que regulam a degradação de HIF, um potente fator de transcrição e adaptações metabólicas de forma a controlar os níveis de ROS intracelulares, as células produzem mais antioxidantes para manterem os níveis redox moderado. Adaptado de³⁷.

A elevada difusibilidade, estabilidade e especificidade de H_2O_2 para marcar vários alvos (proteínas-S⁻) desde proteínas antioxidantes (GSH, PRDX, TRX), fatores de transcrição (AP-1, NRF2, CREB, HIF-1, TP53, NF- κ B, NOTCH e outros), cinases (PI3K/AKT, JNK) ativando-as, fosfatases (PTEN) inibindo-as, permite que esta molécula ative processos como a proliferação, migração, diferenciação e apoptose^{37,51}. Uma outra característica do H_2O_2 é que este consegue regular positivamente a produção dos seus inibidores (proteínas antioxidantes). Desta forma, a célula consegue rapidamente reverter os níveis de H_2O_2 para níveis basais, após a transdução de sinal, evitando a danificação de estruturas celulares. Um exemplo é o fator de transcrição Nrf2 que regula a expressão de antioxidantes como NAD(P)H, SOD, catalase, HO-1, TRX, GST que se sabe estarem envolvidos na resistência a quimioterapêuticos⁵⁵; alguns descritos na secção *Sistemas Antioxidantes* desta tese. Todas estas características fazem do H_2O_2 um mensageiro secundário muito eficaz^{36,56}. Estes mecanismos referem-se sobretudo a mecanismos

mediados diretamente por H_2O_2 , no entanto esta molécula pode ainda gerar outros mensageiros secundários; as ERO produzidas pelas mitocôndrias podem levar à peroxidação de lípidos formando lípidos eletrofílicos reativos que atuam como segundos mensageiros na ativação de cinases mitogénicas - ex. MAPK/JNK, p38/MAPK, MAPK/ERK ⁵¹.

Em suma, as ERO parecem ter um papel ativo na progressão tumoral, no entanto, uma ativação oncogénica das NOX obriga a célula a detoxificar muito mais ERO para minimizar uma acumulação letal e adaptar-se – ver figura 1.6 ³⁶.

1.5 Destoxificação e adaptação REDOX

O metabolismo glicolítico providencia às células os metabolitos que estas necessitam para a biossíntese de macromoléculas e de ERO para que as células se adaptem ao *stress* metabólico e proliferem ⁵⁷. Os níveis excessivos de ERO são contrabalançados pela atividade de sistemas antioxidantes que os neutralizam ¹⁵. Por este motivo, a regulação dos níveis de ERO intracelular é feita a nível da sua produção e degradação ³⁷. Existem diversos sistemas antioxidantes como por exemplo a peroxidase de glutathione (GSH), dismutase de superóxido (SOD) e Tiorredoxina (TRX) que estão presentes por toda a célula de forma a minimizar o stress oxidativo e tentar estabelecer um equilíbrio redox ^{25,35}. A produção destes antioxidantes é mediada pela estabilização do fator de transcrição Nrf2, quando os níveis de ERO são elevados. Esta indução faz todo o sentido se pensarmos que as células cancerígenas são sujeitas a stress oxidativo que pode trazer vantagens quando os níveis de ERO são moderados ativando vias de sinalização de proliferação e sobrevivência, no entanto, necessitam de um *feedback* negativo para que esses níveis não se tornem citotóxicos e danifiquem a célula ou ativem mecanismos de apoptose ^{25,37,57} – figura 1.6.

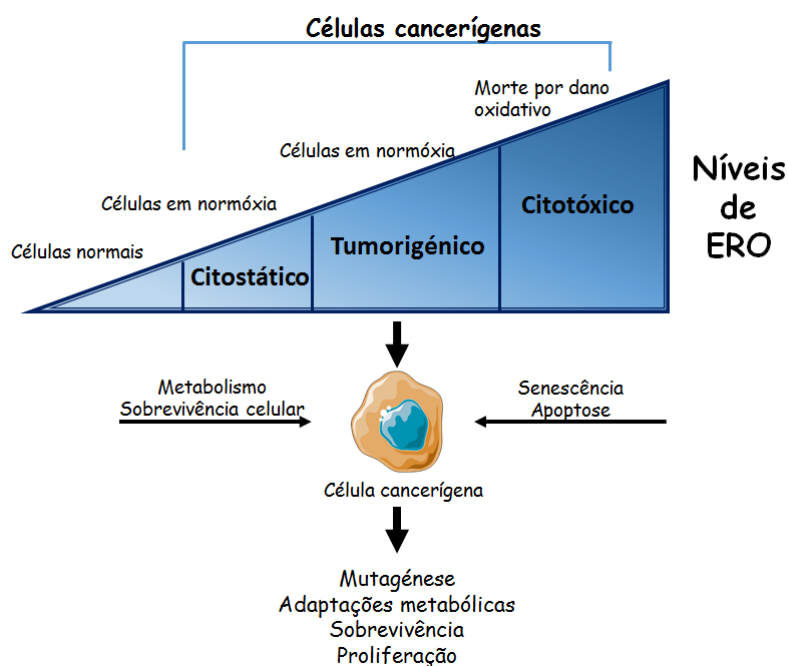


Figura 1.6. Geração de ERO e níveis de toxicidade. A estimulação de ERO (por oncogenes, mutações em genes supressores de tumores, mutações mitocondriais e hipóxia) estimulam a tumorigênese. O balanço entre a geração e a eliminação de ERO é importante pois a célula necessita de manter níveis moderados que estimulem a progressão tumoral.

1.6 Sistemas antioxidantes

Como referido anteriormente, os níveis elevados de ERO são contrabalançados pela produção de antioxidantes que neutralizam estas moléculas. Uma proteína antioxidante é caracterizada por: ter especificidade por um determinado radical livre; capacidade de reduzir outras proteínas antioxidantes (como a TRX e GSH) de forma a que estas mantenham a sua função podendo ser reciclada novamente; existir em grande quantidade nos tecidos; ser capaz de atuar em meio aquoso e membranas – figura 1.7 ³⁵.

A classe de antioxidantes mais eficiente é a classe enzimática: As dismutases de superóxido (SOD), catalase, peroxidases de glutathione e de tiorredoxina. No entanto também existem antioxidantes não enzimáticos como é o caso das vitaminas C e E, carotenoides, antioxidantes de tiol (glutathione, tiorredoxina, e ácido lipóico), entre outros. ⁵⁸⁻⁶⁰.

1.7 Antioxidantes enzimáticos

1.7.1 Dismutases de superóxido

As SOD possuem um papel primário durante a formação de ERO pelas NOX. Esta enzima (SOD) é responsável pela dismutação de O_2^- em H_2O_2 ^{58,59}. No corpo humano existem três isorformas: extracelular (EC-SOD), citoplasmática (Cu, Zn-SOD) e mitocondrial (Mn-SOD). Estas enzimas eliminam o O_2^- , de forma sucessiva, através de reações de oxidação-redução de um íon metálico (metal de transição – cobre ou zinco) situado no seu centro ativo ³⁵.

1.7.2 Catalase

A catalase é uma enzima altamente conservada em diversos organismos (plantas, animais e algumas bactérias). Localizada no peroxissoma, esta enzima é extremamente eficaz na conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Apenas 1 molécula de catalase consegue converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 ³⁵. Em alguns tumores, a diminuição da capacidade de destoxificação de peróxido de hidrogénio deve-se a uma diminuição dos níveis da catalase ^{58,59}.

1.7.3 Peroxidases de glutatona

As peroxidases de glutatona podem existir em duas formas: selénio-dependente (glutatona peroxidase-GPx) e selénio-independente (glutatona-S-transferase - GST). GPx atuam juntamente com o tripéptido de glutatona (GSH) adicionando dois eletrões para reduzirem os peróxidos levando à formação de selenol (Se-OH). As propriedades destas selénio-enzimas permitem ter como substrato o H_2O_2 ou um peróxido orgânico ($ROOH$). O H_2O_2 é convertido pela catalase em água ou álcool; e simultaneamente o GSH é oxidado, GSSG. Os peróxidos ($ROOH$) são eliminados de forma a não serem usados como substratos para a reação de *Fenton* que leva à formação do radical OH^- ³⁵.

1.7.4 Peroxidases de tiorredoxina

As peroxidases de tiorredoxina utilizam a tiorredoxina como doador de eletrões para redução de ERO ^{61,62}. Em vez de utilizarem cofatores metálicos para a sua atividade redox, estas peroxidases contêm resíduos de cisteína reativos no domínio de redução de peróxidos, estando sobreexpressas em vários tipos de cancro e associadas sobretudo à

inibição da apoptose ⁶³. Esta sua característica redox distingue esta enzima de outras peroxidases ⁶⁴.

1.7.4.1 Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas (PRDXs) são peroxidases de tiorredoxina que constituem uma família de proteínas antioxidantes conservadas ao longo da evolução. Tal como as GPx, as peroxirredoxinas predominam de forma relativamente abundante no citosol, mitocôndrias e retículo endoplasmático ⁶⁵. Existem seis proteínas da família das PRDXs (I, II, III, IV, V, VI) cuja constituição também apresenta um domínio de cisteínas (cys) em ambas as extremidades da proteína que é oxidado pelo H₂O₂ e reduzido pela TRX redutase completando o ciclo catalítico ^{65,66}. As PRDX I e PRDXII são as que existem em maior quantidade no citosol. As restantes estão distribuídas pelas mitocôndrias (PRDXIII e V), no retículo endoplasmático e alguns peroxissomas (PRDX IV), e no núcleo (PRDXV). A PRDXVI reside sobretudo no citosol ^{67,68}. Estudos revelaram que as PRDX estão em níveis elevados em vários cancros, sobretudo em cancro da mama, sugerindo que estes antioxidantes possuem um papel protetor na sobrevivência das células cancerígenas e são umas das proteínas que se destacam por serem responsáveis pela resistência a quimioterapêuticos ^{66,69}. Em situações de stress oxidativo, a PRDX II participa na sinalização redox, e pode translocar-se para o núcleo, possivelmente para proteger o DNA de danos causados por ERO ⁷⁰.

1.8 Antioxidantes de Tiol

1.8.1 Glutationa

A glutaciona é um tripéptido antioxidante multifuncional não-enzimático. É considerado o maior ‘tampão’ celular antioxidante. Distribui-se abundantemente no citosol, núcleo e mitocôndrias e caracteriza-se por ser o antioxidante mais solúvel nestes compartimentos ⁷¹. A sua forma reduzida é GSH e a oxidada apresenta-se sob forma de glutaciona-dissulfeto (GSSG). Este tripéptido possui uma função muito importante principalmente no núcleo devido à capacidade de regular o estado redox de moléculas protegendo-as de danos oxidativos ³⁵. Esta capacidade deve-se ao átomo de enxofre presente na sua constituição que muito facilmente perde um eletrão reduzindo as proteínas

alvo participando em várias reações redox ³⁵. Isto só é possível devido ao poder redutor do complexo fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida (NADPH) que atua como aceitador de elétrons de GSH (NADP⁺ a NADPH), permitindo o regresso à forma reduzida e desta forma conservar a sua atividade redox. ²⁵. Entre várias funções que apresenta, a glutathiona tem a capacidade de destoxificar diretamente o peróxido de hidrogénio e regenerar vários antioxidantes protegendo as células contra o *stress* oxidativo ³⁵.

1.8.2 Tiorredoxinas

As tiorredoxinas (TRX) constituem um pequeno complexo multifuncional que contém uma proteína redox dissulfeto-dependente e possui duas cisteínas reativas dentro de um centro ativo, um domínio conservado (Cys-Gly -Pro -Cys). Na sua forma reduzida (forma ativa), as Trx contêm dois grupos -SH que são convertidos a ligação dissulfeto na sua forma oxidada. Semelhante à glutathiona, este antioxidante consegue passar por várias reações redox devido ao poder redutor de NADPH que ajuda a manter a sua função intacta podendo ser reutilizada várias vezes, apesar de existirem em muito menor quantidade do que as GSH ^{25,35}. Em situações de *stress* oxidativo, Trx transloca-se para o núcleo em resposta a H₂O₂, TNF e radiação ionizante onde fica a proteger fatores de transcrição que possuam resíduos de cisteína reativos; ex. Ref1 – estado ativo: reduzido ^{36,72}. Existem outras proteínas que possuem também atividade redox, sendo a de interesse neste estudo a anexina A2.

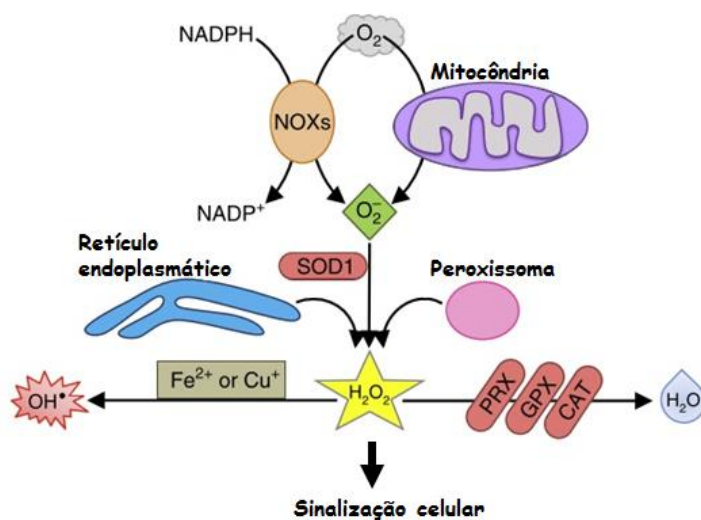


Figure 1.7. Fontes endógenas de ROS e atividade redox ROS é produzido pelas NADPH oxidases (NOX), retículo endoplasmático, mitocôndrias e peroxissoma. O H_2O_2 é a molécula mais estável de ROS e alvo de antioxidantes como as peroxirredoxinas, glutatona, catálase, e outras (tioredoxina e Anexina A2 não presentes na figura). No entanto o H_2O_2 pode reagir com íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+) formando o íon OH^\bullet , que causa danos oxidativos irreversíveis no DNA, proteínas e lípidos. O H_2O_2 é um potente indutor de sinalização celular através da oxidação de tióis (-SH) promovendo a proliferação, diferenciação e alterações de metabolismo.

1.9 Anexinas

As anexinas (ANXA) constituem uma família de proteínas (em vertebrados: A1-A13) que estruturalmente se ligam a fosfolípidos aniônicos de forma dependente de cálcio⁴². Estas proteínas interagem com vários componentes celulares e membranares que estão envolvidos em processos de sinalização intracelular, crescimento e organização estrutural. Foram pela primeira vez descritas em vertebrados pela sua capacidade de se anexar ou agregar-se à membrana, no entanto, estas proteínas existem numa vasta quantidade de organismos desde vertebrados (ANXA), invertebrados (ANXB), fungos (ANXC), plantas (ANXD) e protistas (ANXE)⁷³⁻⁷⁵. Estruturalmente, as anexinas possuem um domínio clássico na extremidade carboxílica, bastante conservado com sequências repetitivas de aproximadamente 70 aminoácidos (I-IV). Um destes domínios contém uma região uma dobra de endonexina (região de homologia) que é considerada como sendo a assinatura das anexinas, uma sequência de aminoácidos onde está localizada o domínio de ligação ao cálcio⁷⁴. Cada repetição (I-IV) contém cinco hélices α e um domínio de ligação a íons de cálcio que liga duas das hélices^{36,73}. A extremidade

amina é variável entre as anexinas e é responsável pela sua localização celular e função especializada como endocitose (anexinas A1, A2 e A6), exocitose (anexinas A2 e A7), regulação de transporte de iões (anexinas A2, A4, e A6), citoesqueleto (anexinas A2, A3, A5 e A11), tráfego vesicular (anexinas A2 e A11) e regulação redox (anexina A2) mas também podem estar relacionadas com processos extracelulares como inflamação e apoptose (anexina A1), fibrinólise (anexina A2) e coagulação (anexina A5) ^{36,74,76,77}.

A primeira anexina a ser atribuída a função de peroxidase foi a AnnAt1 da planta *Arabidopsis thaliana* em estudos os quais estabeleciam a potencialidade do papel redox desta proteína durante o stress oxidativo ^{78,79}.

A característica que distingue as anexinas de outras proteínas que se ligam de forma dependente de cálcio é o seu domínio cálcio-dependente que se liga de forma reversível a membranas celulares carregadas negativamente ⁷⁶.

1.9.1 Anexina A2 (ANXA2)

A anexina A2 (também referida como p36, ANXA2, calpactina I, lipocortina II, cromobindina VIII ou proteína anticoagulante IV de placenta), é uma proteína com 36 kDa cujo gene se localiza no cromossoma 15q22.2 ⁸⁰. Inserida na família das anexinas dos vertebrados, foi inicialmente identificada em células de aves e mamíferos como substrato da proteína tirosina cinase (PTK) pp60src, produto da infeção pelo vírus do sarcoma de Rous que promove a transformação celular. A ANXA2 está presente em vários tipos celulares como, monócitos, macrófagos, células endoteliais, células mononucleares e numa grande diversidade de células tumorais onde se encontra maioritariamente distribuída no citoplasma, membrana plasmática e uma pequena fração localizada no núcleo ^{74,80}.

A ANXA2 possui um lado côncavo e outro convexo: o lado côncavo contém a região N e C terminal e o convexo contém os domínios de ligação a Ca^{2+} e fosfolípidos. O domínio N-terminal contém a região de ligação a S100A10, um resíduo de cisteína reativo (Cys-8), uma região de fosforilação reconhecida pela pp60src e um domínio de exportação nuclear (nuclear export sequence, NES). Na região C-terminal encontra-se outro resíduo de cisteína reativo (Cys-334) e domínios de ligação para F-actina, fibrina, RNA, heparina e fosfolípidos de carga negativa – ver figura 1.8 ^{36,74}. A ligação da ANXA2 à membrana é feita pelo lado convexo enquanto que o lado côncavo fica virado para o citosol ou para o meio extracelular ⁷⁴.

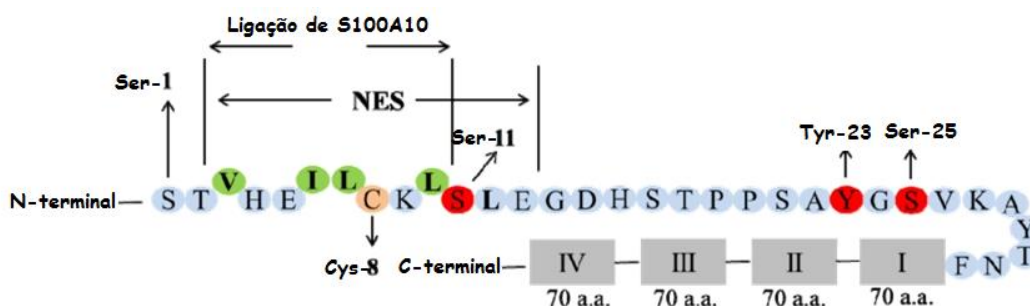


Figure 1.8. Estrutura da proteína ANXA2. A ANXA2 possui duas extremidades: amina (N) e carboxílica (C). A extremidade amina é a zona de ligação de modificações pós translacionais (acetilação (Ser-1) e fosforilação (Ser-11, Tyr-23 e Ser-25)). Também se pode encontrar o domínio de ligação de S100A10, uma zona de sinal de exportação nuclear (NES) e um resíduo de cisteína reativo (Cys-8), associado às funções redox da ANXA2. No domínio C-terminal encontram-se os locais de ligação a fosfolípidos de carga negativa, F-actina, fibrina, RNA e heparina. Adaptado de ⁷⁴.

A ANXA2 pode existir como monómero ou formar um complexo heterotetramérico com a proteína S100A10 (p11) (designado por AII_t) que atua como um receptor de plasminogénio, resultando na regulação da produção de plasmina à superfície celular, crucial para iniciar a fibrinólise e para a degradação da matriz extracelular, ou seja, a ANXA2 atua como recetor de p11 ancorando-o à membrana celular. A ANXA2 também protege o p11 de ser ubiquitinado e degradado via proteossoma. A ativação da plasmina é muito importante na progressão do cancro pois estas células, macrófagos associados ao tumor (TAM) e neutrófilos utilizam-na para processos de degradação de barreiras fisiológicas, favorecendo a invasão e metastização ⁷⁴. A forma monomérica é maioritariamente citosólica enquanto que a outra forma encontra-se predominantemente ligada à membrana e cada forma é responsável por diferentes funções. ^{74,81}. A acumulação nuclear da forma monomérica tem sido reportada com o papel de proteger o DNA de

danos causados por stress oxidativo induzido por agentes genotóxicos como a radiação UV, crómio VI e radiação gama.^{36,74,81,82}.

Recentemente foi descrito o papel redox de ANXA2 pela virtude desta conter um resíduo de cisteína reativo (Cys-8) na sua extremidade amina que em conjunto com a sua capacidade na redução de plasmina, levou Madureira *et al.*, 2011 a postular e confirmar o papel regulatório redox desta proteína. Esta capacidade redox surge graças à atividade da TRX que devolve o estado normal reduzido à ANXA2, pelo que neste sentido a ANXA2 pode ser considerada uma peroxidase de tiorredoxina. Como descrito anteriormente, o *stress* oxidativo aumenta os níveis de ERO intracelular. As cisteínas oxidadas atuam como um sensor redox que regula a estrutura e função da proteína e por sua vez a ativação de vias de sinalização por forma a atenuar os níveis de ERO; ex. estimulando a produção de antioxidantes^{42,74}.

Dados sugerem que a acumulação de ANXA2 no núcleo em resposta ao stress oxidativo deve-se à inativação do domínio NES ocorrendo de forma independente de Cys-8. Estes dados sugerem a forte possibilidade de ANXA2 estar envolvida na resistência a quimioterapêuticos, protegendo o DNA através da sua ação antioxidante^{42,82}. O H₂O₂ ataca a Cys-8, resultando na oxidação de ANXA2 e conversão de H₂O₂ a H₂O. A ANXA2 oxidada serve como substrato ao sistema da TRX que permite à ANXA2 ficar reduzida novamente, ou seja, uma molécula de ANXA2 consegue participar em vários ciclos redox. No mesmo estudo, Madureira *et al.*, 2011 propuseram um modelo mecanístico no qual descrevem a dismutação de H₂O₂ a H₂O descrito na figura 1.9 esta função faz da ANXA2 única entre as anexinas humanas^{36,42,82}.

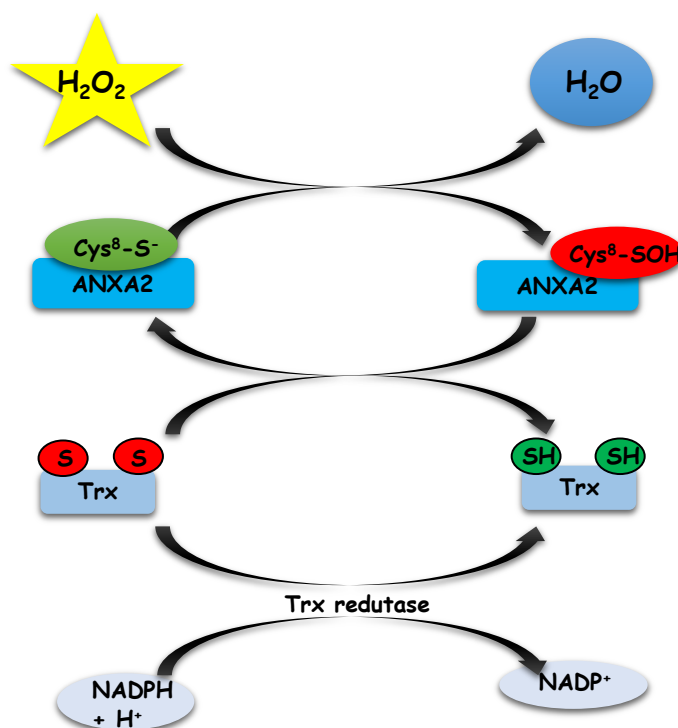


Figura 1.9. Mecanismo de regulação redox de ANXA2. A oxidação do resíduo Cys-8 pelo H_2O_2 leva à conversão de H_2O_2 a H_2O . A ANXA oxidada volta a ficar reduzida pelo sistema redox tioredoxina redutase. Uma única molécula de ANXA2 pode participar em vários ciclos oxidação-redução. Adaptado de ⁴².

No mesmo estudo, as células depletadas de ANXA2 apresentavam níveis mais elevados de ERO e um aumento da ativação de várias cinases pro-apoptóticas: p38, JNK e Akt comparativamente às células controle e consequentemente maior sensibilidade à morte por *stress* oxidativo. Para além disso, estas células eram significativamente mais sensíveis à morte por drogas quimioterapêuticas que produzem ERO, como parte do seu mecanismo de ação. As células pulmonares estão continuamente expostas a *stress* oxidativo devido às trocas gasosas entre os alvéolos e os eritrócitos. No entanto, estudos *in vivo* em ratinhos *knockout* (KO) para ANXA2, demonstraram não só um aumento da oxidação de proteínas em tecidos do fígado e do pulmão comparativamente a ratinhos WT como também que estas células estavam continuamente expostas a *stress* oxidativo. Mais estudos indicaram uma diminuição acentuada no crescimento de tumores resultantes da injeção subcutânea de linhas celulares cancerígenas depletadas de ANXA2 (HT1080 e A549) em ratinhos, comparativamente às células controle. A administração intraperitoneal de cisteína N-acetilo (antioxidante NAC) reverteu este efeito nos ratinhos durante o desenvolvimento tumoral ⁴². Estes resultados sugerem que esta capacidade antioxidante é importante para a manutenção do equilíbrio redox em células tumorais.

1.9.2 ANXA2 e o cancro

Está descrito na literatura que as anexinas estão significativamente sobre-expressas em neoplasias e associadas à tumorigénese e metastização. A ANXA2 é sobre-expressa numa grande variedade de cancros especificamente relacionada com o seu desenvolvimento, invasão, metastases e resistência a quimioterapêuticos. A sobre-expressão de ANXA2 foi reportada em carcinoma hepatocelular, cancro da mama, pâncreas, coloretal, carcinoma renal, ovário, fígado, gástrico, pulmão, leucemia e glioma, normalmente associados a um pior prognóstico ^{36,83,55}. Modelos depletados de ANXA2 revelam a sensibilidade celular para responder positivamente ao aumento intracelular de ERO induzido por quimioterapia. A expressão deste antioxidante está positivamente correlacionado com um aumento da resistência a este tratamento. Estudos *ex-vivo* feitos em amostras tumorais do cólon e pâncreas humanas revelaram níveis elevados de ANXA2 reduzida comparativamente às células normais do tecido adjacente enquanto que as amostras que não apresentavam elevados níveis da forma reduzida de ANXA2 mostravam níveis elevados de oxidação. Estes estudos sugerem que a função antioxidante da ANXA2 é importante para o equilíbrio redox de tumores (humanos). Em geral foi concluído que a perda ou depleção de ANXA2 resulta na perda da capacidade reguladora do equilíbrio redox e os tumores que não apresentam ANXA2 reduzida tendem a ter uma elevada quantidade de stress oxidativo em experiências *in vivo* e *ex vivo* ³⁶. A forma heterotetramérica (AII_t) também foi reportada em processos celulares tumorigénicos, em particular: na ativação da plasmina. A proteína S100A10 atua como receptor de plasminogénio enquanto que a ANXA2 atua como âncora do S100A10 à superfície da célula. Este mecanismo resulta na geração de plasmina que por sua vez leva à ativação das metaloproteases da matriz levando à remodelação da matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM). A remodelação da ECM é um passo essencial na mobilização de células tumorais permitindo às células invadirem a matriz e metastizarem ⁷⁴. A ECM é composta por aproximadamente 300 proteínas que regulam a homeostasia dos tecidos, órgãos, inflamação e doenças. Os maiores constituintes da matriz são proteínas fibrosas e proteoglicanos localmente secretados que formam uma rede estrutural organizada na maioria dos tecidos ¹¹.

A ativação de certas metaloproteases (ex: MMP-9 - collagenase) pode levar à liberação de VEGF sequestrado na matriz contribuindo para a angiogênese tumoral, essencial para o aparecimento de metástases – ver figura 1.10. Em suma, pode-se considerar a ANXA2 como um potencial marcador a ser considerado para diagnóstico/prognóstico da doença, recorrência metastática e sobrevivência do paciente

74.

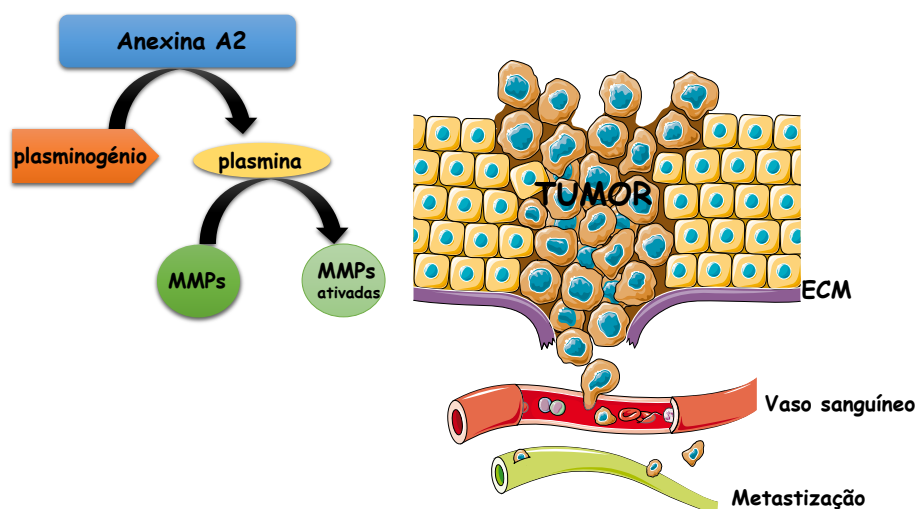


Figure 1.10. ANXA2 promove a tumorigênese e metástase. A ANXA2 catalisa a conversão do plasminogênio em proteases de plasmina. A plasmina ataca as metaloproteases (MMP) causando a degradação da matriz extra celular (ECM) promovendo a invasão e metástase. Adaptado de ¹¹².

A ANXA2 também está correlacionada com o aumento do recrutamento de células envolvidas em processos inflamatórios com elevada atividade neoangiogênica em pacientes com cancro da mama. Está potencialmente envolvida na resistência a drogas quimioterapêuticas como antraciclinas (impede sobretudo a síntese de DNA/RNA; inibe a topoisomerase II), e taxanos (disrupção dos microtúbulos) em células MCF-7 de cancro da mama pouco invasivo e MDA MB 231 muito invasivo. A invasão e a metástase são as maiores causas de mortalidade nos pacientes oncológicos. A ANXA2 é uma molécula importante com funções regulatórias redox, de adesão tumoral, proliferação, invasão, metástases, neoangiogênese pelo que o seu papel é crucial durante a tumorigênese. No entanto existem muitas lacunas para cobrir e são necessários mais estudos, sobretudo a nível bioquímico, vias de sinalização, que possam revelar os efeitos da ANXA2 no cancro. É necessário o desenvolvimento de terapias direcionadas e marcadores moleculares sendo que a ANXA2 poderá ser um marcador a investir pelas características

mencionadas acima pelo que é importante conhecer mais sobretudo os efeitos mediados na regulação de ERO e contribuir para a identificação de novas estratégias anticancerígenas.

1.10 Hipótese

Reunindo todo o conhecimento obtido no capítulo de Introdução desta tese, colocou-se a seguinte **hipótese**:

Se ERO levam à estabilização de HIF- α e ANXA2 é uma proteína antioxidante que inativa ERO, então, durante a hipóxia e ao retirar ANXA2 teremos mais ERO e consequentemente uma melhor estabilização de HIF- α e ativação de genes regulados por este factor de transcrição, ou seja:

ANXA2 diminui a estabilidade de HIF- α .

1.11 Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi investigar o papel da proteína antioxidante ANXA2 após e durante um estímulo hipóxico em células cancerígenas.

1.11.1 Objetivos específicos

De forma a atingir o principal objetivo foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- a) Analisar a ativação de vias de sinalização em células depletadas (*knockdown*) de ANXA2 *versus* células controlo (*scramble*) sob condições de hipóxia real (1% O₂) e química (200 μ M e 400 μ M de CoCl₂)
- b) Através dos resíduos de Cys reativos estudar a atividade de ANXA2 e de outras proteínas envolvidas na ativação de vias de sinalização durante um intervalo pré definido sujeito a condições de hipóxia.
- c) Analisar os níveis de expressão génica de genes que se sabe serem ativados sob condições de hipóxia em células depletadas de ANXA2 vs células controlo e perceber qual o papel de ANXA2 na expressão destes genes.
- d) Analisar os níveis de ERO em células depletadas de ANXA2 vs células controlo sob condições de hipóxia.

2. Material e Métodos

2.1. Linha celulares estabelecidas:

Tabela I: Lista de linhas celulares, identificação, descrição e origem. (Todas as linhas são humanas).

Identificação	Descrição	Origem
HT1080	Linha Celular humana de fibrossarcoma	ATCC®
HT1080 p36 KD 3	Células HT1080 com shRNA 3 para o p36, anexina A2	Nosso laboratório
HT1080 p36 KD 4	Células HT1080 com shRNA 4 para o p36, anexina A2	Nosso laboratório
HT1080 p36 <i>scramble</i>	Células HT1080 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>)	Nosso laboratório
MDA-MB 231	Linha celular humana de adenocarcinoma da mama	ATCC®
MDA-MB 231 p36 KD 3	Células MDA-MB 231 com shRNA 3 para o p36	Nosso laboratório
MDA-MB 231 p36 KD 4	Células MDA-MB 231 com shRNA 4 para o p36	Nosso laboratório
MDA-MB 231 p36 <i>scramble</i>	Células MDA-MB 231 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>)	Nosso laboratório
A549	Linha celular de adenocarcinoma epitelial do pulmão	ATCC®
A549 p36 KD 3	Células A549 com shRNA 3 para o p36	Nosso laboratório
A549 p36 KD 4	Células A549 com shRNA 4 para o p36	Nosso laboratório
A549 p36 <i>scramble</i>	Células A549 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>)	Nosso laboratório

2.2. Cultura de células

2.2.1. Descongelamento de células

As linhas celulares utilizadas neste trabalho encontravam-se congeladas a -150 °C em 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 90 % de soro fetal bovino (FBS -Fetal Bovine Serum; SIGMA®) – *Tabela I*. Estas células já continham o *knockdown* para a ANXA2 realizado pela Dra Patrícia Madureira. Para descongelá-las, os crio-tubos contendo as linhas celulares mencionadas foram colocados imediatamente em banho-maria a 37 °C.

No interior de uma câmara de fluxo laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Telstar) as células foram seguidamente transferidas para um tubo cónico tipo *falcon* de 15 mL (VWR®) contendo 9 mL de meio de cultura – DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ; SIGMA®) com 10 % de soro FBS, glutamina a 20 mM; penicilina a 100 U/L e streptomocina a 200 U/L, também pré-aquecidos a 37 °C. Em seguida centrifugou-se durante 5 minutos a 1000 g e aspirou-se o sobrenadante (as células encontram-se no precipitado/ *pellet*). Esta descongelação é rápida de forma a retirar o mais rapidamente possível o DMSO que se pode tornar tóxico para as células. Ressuspendeu-se o *pellet* em 5 ou 15 mL de DMEM completo e transferiu-se para um *T-flask* de 25 cm² ou 75 cm² com tampa de filtro (VWR®), respetivamente. Nesta fase adicionou-se Puromicina (5mg/mL, SIGMA®) a cada cultura a uma concentração final entre 2-5 µg/mL consoante as linhas celulares, com o objetivo de selecionar os fenótipos desejados, manter uma pressão selectiva para que apenas sobrevivam as células que contêm DNA plasmídico que contém um gene de resistência a este antibiótico. Os *T-flasks* foram colocados numa incubadora com condições ótimas para o crescimento das linhas celulares utilizadas (37 °C, 21% O₂ e 5% de CO₂).

2.2.2. Manutenção, contagem e *stocks* das linhas celulares

Devido à atividade metabólica celular, o meio de cultura torna-se mais ácido o que se podia verificar ao longo dos dias por uma alteração de cor (vermelho/rosa para laranja/amarelo). Por este motivo as células foram observadas diariamente ao microscópio verificando a sua confluência (visível ao microscópio e a olho nu pela mudança de cor) e foi com base nestes dois critérios (confluência e mudança de pH), que se realizou a lavagem e troca de meio. Todas as manipulações foram realizadas no interior da câmara de fluxo laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Telstar) com o material previamente limpo com álcool a 70 % e pelo menos 1 ciclo de UV's durante 15 minutos de forma a eliminar qualquer meio de contaminação que pudesse ocorrer.

Começou-se por aspirar o meio antigo, e lavou-se com 1 ou 3 mL de tampão fosfato salino (DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline sem Ca²⁺ ou Mg²⁺, LONZA®) nos *T-flasks* de 25 cm² ou 75 cm², respetivamente, inclinando o *T-flask* de forma a lavar toda a sua superfície onde se encontravam as células. Retirou-se o PBS com um aspirador permitindo desta forma a remoção de todos os detritos celulares e o restante FBS presente no meio que inativa a tripsina. Após a lavagem colocou-se 1

mL nos *T-flasks* de 25 cm² ou 3 mL nos de 75 cm², de tripsina cuja função é a clivagem de integrinas e outras proteínas envolvidas na adesão das células à superfície, desagregando-as e soltando-as da superfície do *T-flask*. Incubou-se durante cerca de 5 min a 37 °C e observou-se no microscópio garantindo que todas as células se encontravam em suspensão.

Uma vez as células suspensas, na câmara de fluxo laminar retirou-se parte desta solução (com tripsina) perfazendo o restante volume com DMEM completo e adicionou-se 2-5 µg/mL de puromicina incubando-as novamente a 37 °C com 5 % CO₂. O restante volume foi descartado ou utilizado para fazer o *set up* de experiências.

Para preservar as linhas celulares com as características o mais semelhante possível à linha original foi necessário fazer stocks o mais cedo possível após o descongelamento das células. Em vez de se aspirar o meio antigo, este foi transferido para um tubo cónico, e após a tripsinização em vez de descartarmos a solução onde as células estão suspensas, estas foram adicionadas também ao tubo cónico juntamente com o meio antigo correspondente e procedeu-se a uma centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 1000 g. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado e adicionou-se 1 mL de solução criopreservante (90% FBS e 10% de DMSO) transferindo-as para um tubo criogénico para posterior congelação a – 80 °C durante a noite. No dia seguinte os criotubos contendo as células foram colocados a -150 °C até uma nova utilização. A congelação é feita desta forma (lenta) para evitar a formação de cristais pelo DMSO no interior das células e para permitir a desidratação das células por forma a não haver ruptura das mesmas durante o processo de congelação.

Para a contagem, após a centrifugação do passo descrito no parágrafo anterior, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em DMEM completo e pipetou-se 10 µL desta solução para a câmara de Neubauer de 0,0025 mm² procedendo à contagem das células no microscópio. A contagem foi feita em quatro quadrados de 1 mm² e determinou-se o número de células por mm³ desprezando 2 arestas de cada quadrado de forma a minimizar possíveis erros de contagem (figura 2.1). Para a obtenção do número de células por mililitro utilizou-se a seguinte fórmula:

Média do número de células por quadrado x fator de diluição x 10⁴ = número de células por mL

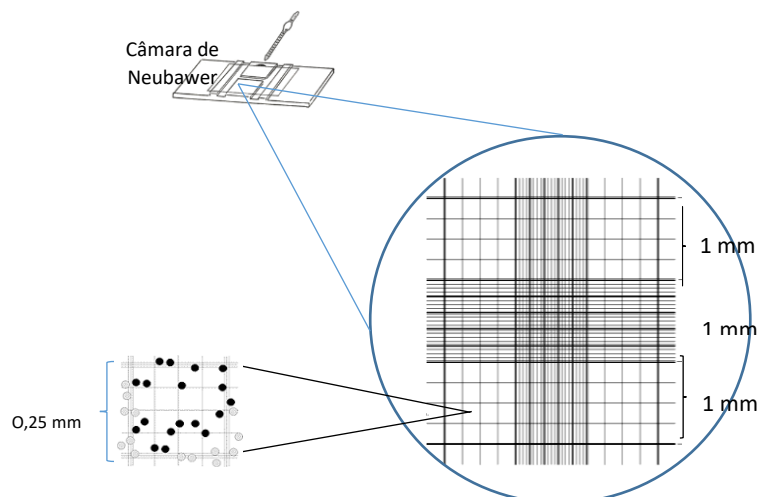


Figura 2.1. Contagem das células na câmara de Neubauer. A contagem foi feita contando 2 arestas e desprezando outras duas em cada quadrado de forma a evitar/minimizar artefactos da contagem manual como se vê na figura. No final a soma dos quadrados (A,B,C e D) deu uma média de $N \times 10^4$ células por mililitro. Este processo foi repetido a cada nova experiência.

2.2.3. Preparação de placas, lisados proteicos e quantificação

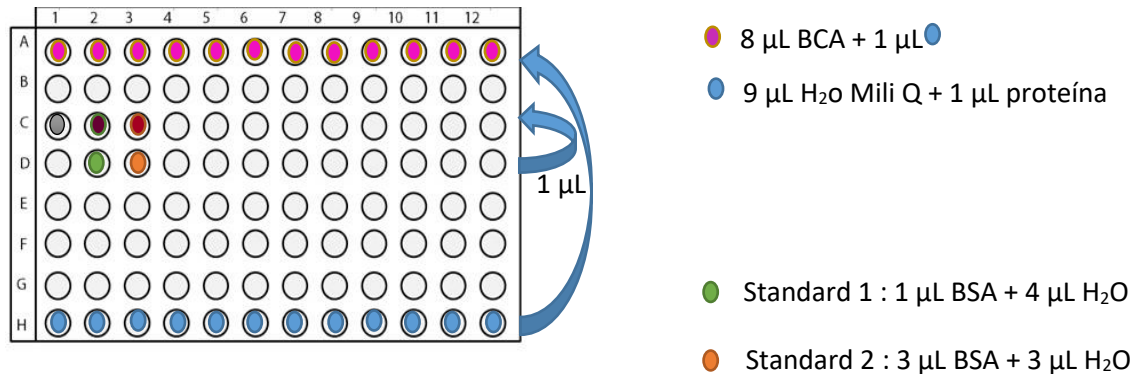
Para realizar os ensaios de hipóxia foram preparadas placas de Petri de 60 mm estéreis (VWR) cada uma com uma concentração celular de cerca de 5×10^5 cel/placa num volume final de 3 mL de DMEM completo. Este processo foi iniciado sempre com a contagem das células na câmara de Neubauer descrita anteriormente. Para o tratamento de hipóxia, as células plaqueadas foram incubadas a 37 °C com 5 % CO₂ até ficarem com 80 -90% de confluência (24 a 48h). Estas foram expostas a 1 % de O₂ e incubadas a 37 °C durante 1h, 3h, 16h, 24h, 48h ou NT (não tratadas – normóxia).

Para obter os lisados proteicos de todas as células tratadas e não-tratadas preparou-se um tampão de lise descrito no anexo II. O meio das células que se pretendeu lisar foi retirado e lavou-se com 2 mL de PBS contendo Ca²⁺. Depois de lavadas e de certificar que o PBS foi todo retirado, adicionou-se entre 100-200 µL (conforme a confluência das células) de tampão de lise. Raspou-se com um raspador toda a superfície da placa e o lisado resultante foi pipetado para um tubo *Eppendorf* e colocado no gelo durante 15 minutos. Após este intervalo de tempo, os tubos foram centrifugados numa centrífuga refrigerada (HeraeusTM Fresco 17 Centrifuge [Thermo - Scientific]) a uma velocidade máxima de 17 000 g durante 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, pipetou-se o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf* e guardou-se a -80 °C. Todos os

procedimentos foram realizados no gelo assim como foram utilizados inibidores químicos de forma a minimizar a atividade das proteases e outras enzimas que possam modificar composição da amostra através da degradação proteica.

Antes de correr as proteínas nos géis de poliacrilamida, foi determinada a concentração proteica de cada amostra com o kit *BCA Protein Assay* (Pierce®) de acordo com as instruções do fabricante. Este é um ensaio colorimétrico e altamente sensível e seletivo que consiste na redução do Cu^{2+} em Cu^+ , em meio alcalino, pela solução do reagente bincinconínico (BCA). Duas moléculas quelantes de BCA por cada íon Cu^+ combinam-se e formam um complexo molecular que exibe uma forte absorvância a 562 nm que é diretamente proporcional à concentração proteica da solução e que se observa também por uma mudança de cor azul esverdeada para violeta.

A solução 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 e pipetou-se 8 μL desta solução para uma placa de 96 poços. Foi estabelecida uma curva de calibração para uma gama de concentrações de interesse (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) utilizando albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumine* - BSA), fornecida também pelo fabricante de forma a manter as concentrações dentro da margem de calibração. Fez-se também uma solução de referência (“zero”) com água Mili-Q de forma a manter qualidade do ensaio. Por fim adicionou-se 1 μL de cada amostra (previamente diluída em água [1:10]) aos 8 μL de solução BCA (ver figura 2.2).



Curva de calibração:

- Referência : 1 µL H₂O + 8 µL BCA
- 1 µL de S1 + 8 µL BCA
- 1 µL de S2 + 8 µL BCA

Figura 2.2. Preparação da placa com o kit BCA Protein assay. A placa foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Este processo foi necessário para determinar a quantidade de amostra a ser utilizada para carregar o gel de poliacrilamida e repetido a cada experiência – *western blotting*.

Preparada, a placa foi incubada a 37 °C durante 30 minutos e a quantificação foi realizada no *Nanodrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo-Scientific) a 562 nm. Este processo foi necessariamente importante para determinar a quantidade de amostra a ser utilizada para a eletroforese em gel de poliacrilamida. Preparação da curva de calibração:

2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western blotting*

Western blotting é uma técnica que visa identificar proteínas específicas após a separação das mesmas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi então preparada segundo um protocolo previamente estabelecido no laboratório. Desta forma foram utilizados tampão Tris 1 M a pH = 8,8, solução stock de acrilamida a 40% (acrilamida:bis-acrilamida (29:1) (AppliChem), SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10 % que rompe as ligações não-covalentes entre as proteínas alterando a sua conformação nativa e fazendo com que estas adquiram carga negativa ajudando assim a separação proteica em resposta ao impulso elétrico (eletroforese), H₂O Mili-Q, APS (persulfato de amônia) a 25 % um agente oxidante que inicia a polimerização da poliacrilamida e bis-acrilamida juntamente com o TEMED (AppliChem®), um catalisador da reação,

permitindo desta forma a solidificação de um gel poroso que permite a separação de proteínas de acordo com o seu peso molecular – anexo I. Para o *stacking gel* a receita foi a mesma apenas diferiu no Tris, desta vez a pH = 6,8. Esta diferença de pH é importante pois permite aos aniões de glicina (*trailing ions*) e os aniões cloreto (*leading ions*) empacotarem as proteínas numa espécie de sanduíche fazendo com que as proteínas se juntem antes de entrar no gel de corrida e iniciem a ‘corrida’ ao mesmo tempo. Os géis foram feitos com uma percentagem de acrilamida adequada a cada peso molecular (entre 10 e 12%). Os géis ficaram aproximadamente 30 minutos a polimerizar num suporte *Mini-Protean* (Bio-Rad). O *stacking* foi colocado por cima do gel de corrida e preparou-se o restante equipamento de eletroforese com os géis submersos em tampão de eletroforese a 1x.

As amostras quantificadas anteriormente foram preparadas para o carregamento do gel. A concentração de proteínas por poço foi de 1 µg/µL com *loading buffer* a 2x correspondendo a $\frac{1}{2}$ do volume total e o restante volume continha a diferença entre a concentração desejada e a resultante da quantificação realizada no *Nanodrop*. O restante volume foi perfazido com H₂O Mili-Q. Preparadas, as amostras foram fervidas a 99 °C durante 5 minutos para desnaturar seguidamente carregadas no gel. O primeiro poço de cada gel foi sempre primeiramente carregado com 2µL do marcador *NZYColour Protein Marker II* (NZYTECH) seguido de 20 µL de cada amostra.

Para a eletroforese aplicou-se uma corrente de 105 V (0.05 e 0.08 A) para permitir a migração das amostras no gel até que entrassem no gel de corrida. Após isto a voltagem foi aumentada para 120-130 V. O tempo total de corrida foi de 80 -90 min .

Terminada a corrida as proteínas, agora separadas por peso molecular foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (BioiTrace™) NT [Pall Corporation] onde permanecem imobilizadas e representam uma réplica do gel. O gel de poliacrilamida foi colocado junto à membrana, envolvidos por papel de filtro e esponjas (método “sanduíche”) – figura 2.3 e uma placa de gelo. Aplicou-se uma voltagem de 100 V durante 70 minutos.

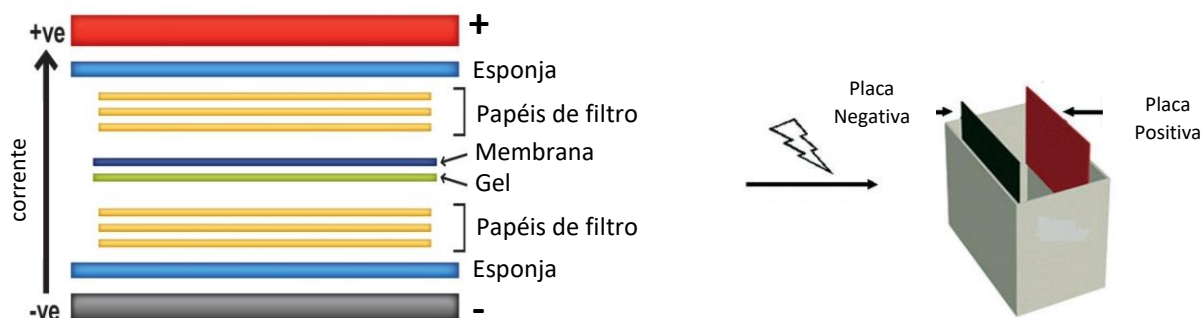


Figura 2.3. Esquemática do método de 'sanduíche' na técnica de western blot. A transferência é feita com o material indicado na figura pela mesma ordem. É aplicada uma corrente de 100 V durante 1 hora e 10 minutos pelo que as proteínas migram para o cátodo (+) e para a membrana de nitrocelulose.

Feita a transferência, a membrana foi incubada com leite magro em pó a 5 %, sem caseína, dissolvido em tampão salino-*Tween* 20 (TBS-T) durante 30 minutos com agitação e à temperatura ambiente de modo a impedir interações inespecíficas de outras proteínas com o nosso anticorpo de interesse. As membranas foram então incubadas a 4 °C com o anticorpo primário (diluído em TBS-T com BSA, ou leite e azida a 0,05% de forma a evitar contaminações) até o dia seguinte – *Tabela II*. Após este intervalo de tempo, fizeram-se 5 lavagens de 5 minutos cada com TBS-T até cobrir a membrana e adicionou-se o anticorpo secundário (1:5000 em TBS-T) específico para a espécie animal onde o anticorpo primário foi produzido e conjugado com a enzima HRP (*horseradish peroxidase*). Incubou-se 1h à temperatura ambiente e fizeram-se mais 5 lavagens como descrito acima.

Tabela II: Lista de Anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.

Anticorpos Primários		
Anticorpo	Descrição e referência	Fornecedor
p36 (anexina A2)	Ratinho IgG	Nosso laboratório
p-AKT	Coelho IgG; sc-7985	Santa Cruz Biotechnology
AKT	Cabra IgG; sc-1618	Santa Cruz Biotechnology
p-ERK	Cabra IgG; sc-16982	Santa Cruz Biotechnology
ERK	Rato IgG; sc-135900	Santa Cruz Biotechnology
PTEN	Rato IgG; sc-7974	Santa Cruz Biotechnology

PRDX II	Cabra IgG; sc-23967	Santa Cruz Biotechnology
Actina	Cabra IgG; sc-1615	Santa Cruz Biotechnology
GADPH	Coelho IgG; sc-25778	Santa Cruz Biotechnology
HIF 1- α	Coelho IgG; sc-10790	Santa Cruz Biotechnology
HIF 2- α	Ratinho IgG; sc-46691	Santa Cruz Biotechnology
Pp38	Coelho IgG; sc-17852	Santa Cruz Biotechnology
p38	Coelho IgG; sc-535	Santa Cruz Biotechnology
VEGF-D	Coelho IgG; sc-13085	Santa Cruz Biotechnology
VEGF	Coelho IgG; sc-152	Santa Cruz Biotechnology
p-JNK	Cabra; IgG; sc-12882	Santa Cruz Biotechnology
JNK	Coelho; IgG; 9252	<i>Cell Signaling</i>
Anticorpos secundários		
Anti-rato	Burro IgG-HRP; sc-2314	Santa Cruz Biotechnology
Anti-cabra	Bovino IgG-HRP; sc-2384	Santa Cruz Biotechnology
Anti-coelho	Cabra IgG-HRP; sc-2004	Santa Cruz Biotechnology

As bandas resultantes foram visualizadas utilizando uma solução de quimiluminescência (*enhanced chemiluminescence* – ECL) – **Anexo III** - numa diluição de 1:1 e as imagens foram obtidas através do sistema de imagem *ChemiDoc™ XRS System* (BioRad).

2.4DCF-DA - Determinação dos níveis intracelulares de ERO

Para determinar os níveis de espécies reativas de oxigénio (ERO) em condições de hipóxia vs normóxia, utilizou-se o reagente 2',7' – diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), de acordo com as instruções do fabricante. O DCFH-DA, não fluorescente, difunde-se através das membranas das células e é deacetilado pelas esterasas intracelulares que o transformam num composto capaz de ser oxidado por ERRO intracelulares (H_2O_2) convertendo-o em DCF (fluorescente)⁸⁴. A deteção dos níveis de ERO é feita pela leitura da fluorescência com um espectro máximo de excitação a 492 nm e emissão a 530 nm e a leitura é diretamente proporcional à concentração de ERO, ou seja, quanto mais forte o sinal, maior a concentração de ROS intracelular. Para o ensaio preparou-se uma placa de 96 poços com 2×10^4 células/poço em DMEM completo. Incubou-se a placa durante 24 h a 37°C, 5% CO_2 em atmosfera húmida e no dia seguinte

atribuiu-se um tratamento de 1 % de O₂ ou 200 μM de CoCl₂ conforme os gráficos. Após este intervalo de tempo retirou-se o meio DMEM e lavaram-se as células com 100 μl de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺. Adicionou-se novamente 100 μl de PBS Ca²⁺ e Mg²⁺ em cada poço contendo DCF-DA a 200 μM. Incubou-se durante 30 minutos a 37°C em atmosfera húmida com 1% O₂ e 5% de CO₂ ou 200 μM de CoCl₂ e mediu-se a fluorescência recorrendo a um espectrofotómetro leitor de placas (TECAN – Infinite M200).

2.5 Extração de RNA

De forma a analisar a expressão génica de alguns genes potencialmente envolvidos na atividade redox ou potenciais alvos de proteínas redox, iniciou-se a extração de RNA das células MDA MB 231, HT1080 e A549 com os shRNA 3, 4 e *scramble* previamente cultivadas em placas de 60 mm. Para a extração do RNA começou-se por retirar o meio e lavar com 2 mL de PBS Ca²⁺. Removeu-se o PBS e adicionou-se 500 μL de *TRI Reagent* por placa e transferiu-se o lisado para um tubo *eppendorf*. Adicionou-se 100 μL de clorofórmio seguida de uma homogeneização no vórtex durante 15 segundos. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugaram-se as amostras a 12 000 g durante 15 minutos a 4 °C que auxilia na separação das fases aquosa (RNA), interfase vermelha (DNA) e fase orgânica (proteína). Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo *eppendorf* com 250 μL de isopropanol. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente centrifugou-se a 12 000 g durante 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 μL de etanol a 75 %. Centrifugou-se a 12 000 g durante 5 minutos a 4 °C e descartou-se o sobrenadante novamente. Deixou-se secar o *pellet* durante 10 minutos e finalmente, ressuspendeu-se o *pellet* em 30 μL de H₂O Mili-Q.

2.6 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis KIT*, *NZYTECH* de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi realizada num tubo *eppendorf* sem nucleases, a 4 °C. Para a reação de emparelhamento utilizou-se 2 μg de RNA, 0.5 μL de *primers oligo dT*, 0.5 μL de 10 x de *Annealing buffer*

e H₂O até perfazer um volume final de 4 µL. Homogeneizou-se e incubou-se a 65 °C durante 5 minutos. Realizou-se um choque térmico de 1 minuto no gelo e fez-se uma centrifugação breve. Para a reação de transcriptase reversa adicionou-se 5 µL de *sNZYRT 2x Master Mix*, 1µL de *NZYM-MuLV RT Enzyme Mix* num volume final de 10 µL. Homogeneizou-se e incubou-se a 25 °C durante 10 minutos seguida de outra incubação a 37 °C durante 50 minutos.

Para inativar a reação, os tubos foram incubados a 85 °C durante 5 minutos, e colocados novamente no gelo. Adicionou-se a cada tubo 0.5 µL de *NZY RNase H (E.coli)* e incubou-se novamente a 37 °C durante 20 minutos. Por fim adicionou-se 5 µL de H₂O.

2.7 Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR

O *RT-PCR* quantitativo em tempo real (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) é uma técnica altamente sensível que foi utilizada neste trabalho para detetar mudanças na expressão génica em células MDA MB 231 com shRNA 3 e 4 para a ANXA2 e respetivas células controlo (*scramble*). Foi seguido o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se como *housekeeping gene* o *GADPH*, para normalização do qRT-PCR. Em cada experiência analisamos triplicados de cada amostra. As reações de qRT-PCR com um volume total de 10 µL por reação foram preparadas com Master Mix NZYRT, 300 µM de cada primer, 1 µL de cDNA e H₂O *DEPC-treated* até perfazer um volume total de 10 µL por reação.

A reação foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 10 segundos e um passo final de elongação a 65 °C durante 5 segundos (termociclador C1000TM BIO-RAD). A amplificação exponencial foi registada através da ligação do SYBR Green que apenas se liga às cadeias duplas emitindo fluorescência - figura 2.4 -detetada por um laser e cuja fluorescência é proporcional à amplificação do gene, ou seja, quanto maior a fluorescência do SYBR Green mais DNA.

Para o tratamento de dados fez-se a média dos triplicados e calculou-se o número de ciclos, caracterizado pelo algoritmo ΔCt . O valor Ct diz-nos o ciclo a partir do qual começa a amplificação do nosso gene de interesse. O valor deste algoritmo é inversamente proporcional ao número de vezes que o nosso gene está transcrito, ou seja,

quanto menor o valor de Ct, mais cedo começa a amplificação, maior é a expressão do gene. Este valor é então normalizado com o nosso transcrito de referência (GAPDH) para obter o valor de ΔCt . Após a normalização foram feitos os cálculos analisando cada gene individualmente com o seu controlo *scramble* ($\Delta\Delta Ct$). Para a interpretação dos resultados utilizou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁸⁵ obtendo assim o número de vezes que o gene está amplificado relativamente ao controlo (*fold change*). Os *primers* utilizados neste trabalho podem ser consultados na tabela que se segue - *Tabela III*.

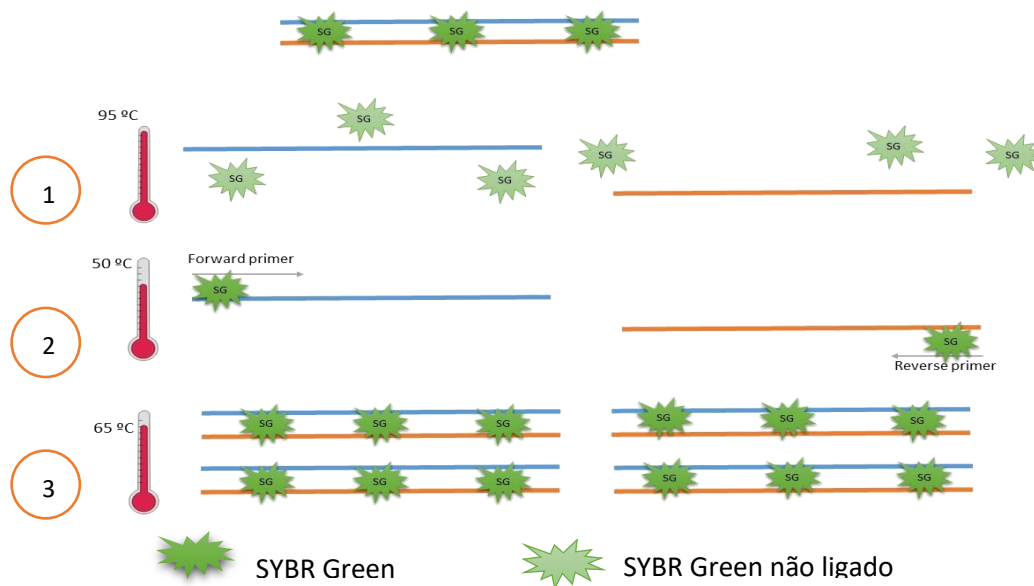


Figura 2.4. Medição dos níveis de expressão génica por qRT-PCR utilizando *SYBR Green*. A amplificação dos genes é registada através da ligação do *SYBR Green* que apenas se liga às cadeias duplas emitindo fluorescência que é posteriormente detetada por um laser. A fluorescência detetada é proporcional à amplificação do gene - quanto maior a fluorescência do *SYBR Green* mais DNA tem na nossa amostra.

Tabela III: Lista de primers utilizados no qRT-PCR.

Primer	Sentido	Sequência dos Oligos 5' -> 3'	Tamanho (pares de bases)
ANXA2	Direto	CTCTACACCCCCAAGTGCAT	20
	Inverso	TCAGTGCTGATGCAAGTTCC	20
GAPDH	Direto	CAATGACCCCTTCATTGACC	20
	Inverso	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	20
Nrf2	Direto	TCATGATGGACTTGGAGCTG	20
	Inverso	CATACTCTTTCCGTCGCTGA	20
LDHA	Direto	GCTGGTCATTATCACGGCTG	19
	Inverso	AGCAACTTGCAGTTCGGGCTG	20
GLUT1	Direto	CTCCTGCCCTGTTGTGTATAG	20
	Inverso	CAGGAGTGAGGTGGTGTATTT	20
MMP2	Direto	CGTCTGTCCCAGGATGACATC	19

	Inverso	ATGTCAGGAGAGGCCCCATA	20
HIF 2- α	Direto	GTGCCATGACAAACATCTTCCAG	22
	Inverso	CTCGGGCTCTGTCTTCTTGCT	20

2.8 Ensaio de Iodoacetamida Biotinilada (BIAM)

Os ensaios de Iodoacetamida biotinilada são utilizados para determinar a oxidação/redução proteica. O BIAM baseia-se num método indireto de detecção de grupos tiol ($-SH$) reduzidos em cisteínas reativas. Os aniões tiolato são muito mais reativos e sensíveis à oxidação por ERO pelo que a iodoacetamida sendo um agente de alquilação específico para tióis, liga-se preferencialmente a aniões tiolato do que grupos tiol livres a pH fisiológico – figura 2.5 ⁸⁶.

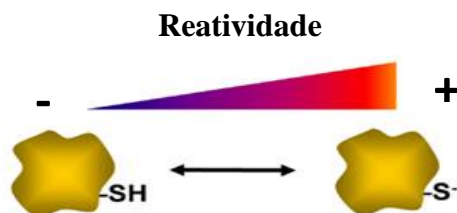


Figura 2.5. Reatividade dos Tióis. Apesar da reatividade de ambos, os aniões tiolato são muito mais sensíveis do que os grupos de tiol livres. grupos tiol (esquerda) e aniões tiolato (direita). Adaptado de (Wall, Oh, Diers, & Landar, 2012)

A iodoacetamida biotinilada reage com aniões tiolato por substituição nucleofílica (SN_2) formando uma ligação covalente e o sinal da biotina é subsequentemente medido por *western blotting* com streptavidina conjugada-HRP ⁸⁶. A perda ou ausência do sinal da marcação por BIAM é proporcional ao grau de oxidação dos tióis que se deve a uma menor substituição nucleofílica dos átomos de enxofre pelo BIAM, ou seja maior é a oxidação – figura 2.6 ⁸⁷.

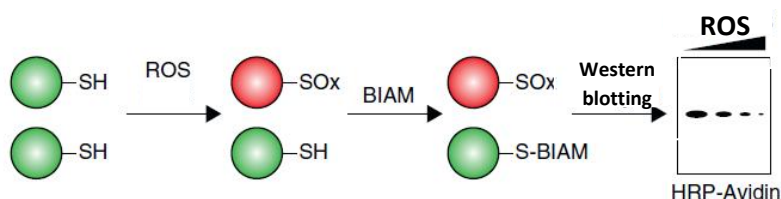


Figura 2.6. Esquema de funcionamento do BIAM. A iodoacetamida liga-se aos tióis não-oxidados de cisteínas reativas. O sinal da é captado por imunoprecipitação em *western blotting* e a sua intensidade deve-se ao nível de oxidação (menos sinal) ou redução (mais sinal) das proteínas após um tratamento. Adaptado de (Leonard & Carroll, 2011).

As células foram expostas a 1 % O₂ durante 15', 30', 1h, 1h30, 2h ou não tratadas, após o qual fez-se a lise celular e extração de proteínas. O tampão de lise foi desgaseificado durante 2h, tempo após o qual foram transferidos 1.5 mL para um tubo *ependorf* com BIAM a uma concentração final de 200 µM. O lisado foi pipetado para um novo tubo *ependorf* seguida de uma incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 15 minutos a 13.800 g, 4 °C e transferiu-se o sobrenadante para os concentradores com o objetivo de descartar o BIAM em excesso que não se ligou às proteínas. Centrifugou-se novamente a 13.800 g durante 8 minutos a 4 °C. Adicionou-se 200 µL de tampão de lise com iodoacetamida (sem biotina) a uma concentração final de 2 mM de forma a parar a reação e proteger as cisteínas que já foram biotiniladas seguida de uma centrifugação durante 8 minutos a 13.8000 g, 4 °C de forma a retirar o excesso de BIAM que não se ligou às proteínas do lisado. Este passo foi repetido por mais duas vezes. O lisado foi transferido para um tubo *ependorf* novo e quantificado. Para a visualização dos resultados foram utilizados 25 µg de cada lisado proteico para eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % e posterior *Western blotting* com streptavidina conjugada com HRP.

Paralelamente ao passo anterior foi realizado um *pull-down* de cada lisado proteico de forma a ter só e apenas as proteínas que se ligaram ao BIAM e observar o estado redox de várias proteínas em comparação com os extratos totais realizados no *western blotting* anterior. Foram utilizados 200 µg de cada lisado proteico em 200 µL de tampão de lise e adicionou-se 40 µL de streptavidina conjugada com *beads* de agarose a cada lisado. Incubou-se 15 min à temperatura ambiente com rotação seguido de 1h15 min a 4 °C com rotação.

Centrifugou-se à velocidade máxima de 17 000 g, durante 3 min a 4 °C e descartou-se o sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se 200 µL de tampão de lise sem BIAM

invertendo várias vezes até ficar homogéneo. Este passo de lavagem foi repetido mais 3 vezes. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 20 µL de tampão de lise 2X. Incubou-se 10 minutos a 98 °C, centrifugaram-se e armazenaram-se os lisados a -20 °C. No dia seguinte foi corrido um gel de poliacrilamida com os extratos totais dos lisados e o *pull down* que contém apenas as proteínas reduzidas. Foram então observados o estado redox de: ANXA2, PRDX I, PTEN, AKT, Caspase 3e actina.

Este ensaio não revela a natureza da oxidação, no entanto, aplicado um tratamento pode-se observar/monitorizar o estado de oxidação intracelular das proteínas que queremos estudar ⁸⁶.

3. Resultados

3.1 Estabelecimento das linhas celulares

Para iniciar o estudo proposto, foi necessário estabelecer as linhas celulares, pelo que foi necessário recorrer ao *stock* existente no laboratório. Foi retirada então uma amostra de várias linhas e verificou-se quais teriam de facto uma elevada expressão de ANXA2, a proteína em estudo –figura 3.1.

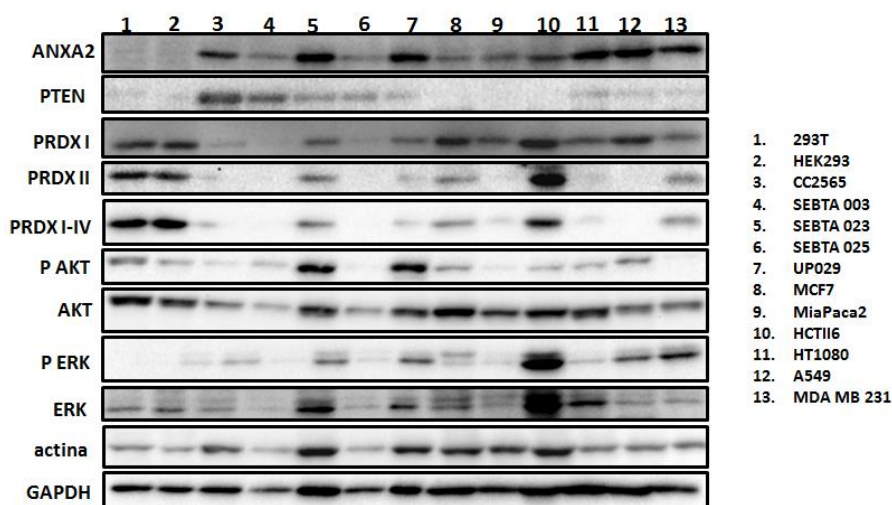


Figura 3.1. Estabelecimento das linhas celulares. As células foram incubadas numa atmosfera húmida de 37°C, 5% de CO₂ até ficarem confluentes e sem qualquer tipo de tratamento. Foi feita a lise para extração do conteúdo proteico e análise por *western blot* – 20 µg lisado.

A numeração indica o tipo de linha celular, são elas: 1-293T e 2- HEK 293 (Rim, linha embrionária); 3- CC2565 (astrócitos normais); 4-SEBTA003, 5-SEBTA023, 6- SEBTA 025, 7-UP029 (linhas de cânceros cerebrais); 8-MCF7 (linha de cancro da mama); 9-MiaPaca2 (linha de cancro do pâncreas); 10 HCT116 (linha de cancro do cólon); 11-HT1080 (fibrossarcoma); 12-A549 (linha de cancro do pulmão); 13 . MDA MB 231 (linha de cancro da mama). Todas estas linhas provêm de células humanas. N=2.

Foram consideradas então as linhas celulares de fibrossarcoma, HT1080 (11), carcinoma do pulmão, A549 (12) e carcinoma da mama, MDA MB 231 (13) que expressam níveis elevados de ANXA2 para realizar o estudo proposto para esta tese – figura 1.

Analisou-se também a expressão de peroxirredoxinas, proteínas antioxidantes que inativam H₂O₂ (tal como a ANXA2) nestas linhas celulares. Foi interessante observar uma relação inversa na expressão de ANXA2 e PRDX II. Ou seja, nas linhas celulares com uma elevada expressão de ANXA2 observou-se uma baixa expressão ou mesmo ausência de PRDX II e vice-versa.

Não se observou no entanto qualquer tipo de correlação entre a atividade das vias de transdução de sinal de sobrevivência (PI3K/Akt), ou do seu inibidor (PTEN) e da via de sinalização de proliferação (ERK 1/2) com os níveis de expressão de ANXA2 a nível endógeno (sem sofrerem qualquer tipo de tratamento) no painel de células cancerígenas analisadas.

Para investigar se a ANXA2 desempenha um papel importante na regulação de vias de sinalização de proliferação e sobrevivência (referido anteriormente) potencialmente ativadas por condições de hipóxia, utilizei as linhas celulares descritas acima. Nestas experiências foram utilizadas células com depleção (shRNA3 e shRNA4) da ANXA2 *versus* controlo (shRNA *scramble*).

3.2 Hipóxia Química

A presença e quantidade de O₂ disponível, é fundamental para o funcionamento das hidroxilases de prolina PHD e FIH. A regulação das PHDs e FIH, importantes reguladores de estabilização de HIF- α (ver secção *Hipóxia – Introdução*) é mediada de forma dependente de 2-oxoglutarato e de íão de Ferro (II) para exercerem a sua função corretamente induzindo HIF α à degradação⁸⁸.

A importância da existência de um íão de Fe (II) para a sua atividade já foi comprovada através da inibição, por exemplo, por íões de cobalto [Co(II)], Níquel [Ni(II)] que são metais capazes de induzir hipóxia e por isso este tipo de hipóxia é designado por hipóxia química⁸⁹. Contudo a exposição das células à hipóxia química, induzida através da adição de metais leva a um aumento de ERO, e como tal, estimulam a expressão génica subjacente⁹⁰. Durante este trabalho foram realizados ensaios de hipóxia química nos quais se utilizou o CoCl₂ para induzir hipóxia. Aqui, os íões Co(II) competem com os íões Fe(II) pelo acesso ao sítio onde o Fe(II) se liga às PHD e FIH, alterando a conformação do grupo *heme*, sensor de O₂ das PHDs e FIH, impedindo que estas exerçam a sua função: marcar HIF- α para degradação^{91,92}. Foram então utilizadas concentrações de 200 μ M de CoCl₂ para as células MDA MB 231 e HT1080, e 400 μ M para a linha A546 as quais foram submetidas a intervalos de tempo de hipóxia diferentes com posterior lise e extração do conteúdo proteico e análise das proteínas por *western blot*. Paralelamente a estas experiências foram realizadas extrações de mRNA com o objetivo

de estudar mecanismos transcricionais de genes que codificam para proteínas que possam estar envolvidas na resposta hipóxica.

3.2.1 Análise das vias de sinalização ativadas em resposta à hipóxia induzida por CoCl_2 (hipóxia química)

Os ensaios de hipóxia química foram realizados com o objetivo de obter uma primeira análise de simulação de hipóxia. São ensaios de custo relativamente baixo e de fácil manipulação que permitem obter resultados preliminares e delinear futuros ensaios. Estes ensaios centraram-se no objetivo de estabilizar o fator HIF- α , através da inibição das PHD e FIH por competição do ião Co(II) do cloreto de cobalto pelo centro ativo de ferro (Fe[II]).

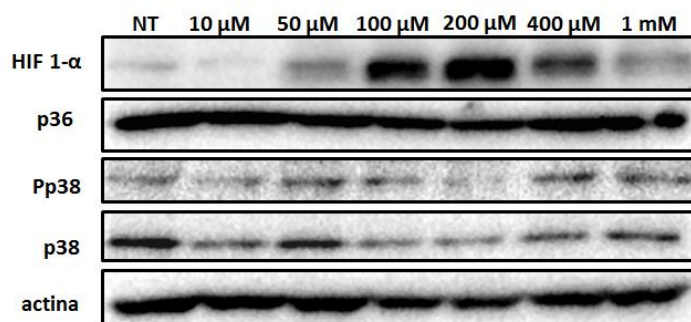


Figura 3.2. Estabelecimento da concentração de CoCl_2 a ser utilizada nos ensaios de hipóxia química. As células HT1080 WT foram incubadas com diferentes concentrações de CoCl_2 durante 2h numa atmosfera húmida de 37°C , 5% de CO_2 . Foi feita a lise para extração do conteúdo proteico e análise por *western blot* – 20 μg lisado. N=2.

Comecei então por estabelecer quais as concentrações mais indicadas para ensaios de hipóxia química, utilizando diferentes concentrações de CoCl_2 . Para tal, utilizei as células HT1080 *wild type* (WT) que foram submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de CoCl_2 durante 2 horas com posterior lise para extração do conteúdo proteico e análise por *western blot* com anticorpos para as proteínas de interesse- Figura 3.2. Para as experiências de hipóxia química escolheu-se uma concentração suficientemente forte para induzir uma boa estabilização de HIF 1- α (marcador de hipóxia). Assim sendo, a concentração de 200 μM de CoCl_2 foi a escolhida para as experiências subsequentes. Foi interessante observar que concentrações mais elevadas (400 μM e 1 mM de CoCl_2) não induziram uma estabilização eficiente de HIF 1- α comparativamente com o tratamento com 200 μM de CoCl_2 . Isto pode dever-se a um efeito citotóxico devido a elevadas concentrações de CoCl_2 . Verificou-se alguma ativação

da via apoptótica p38 (aumento de fosfo (P)-p38 comparativamente a células não tratadas) ao final das 2 horas de tratamento nas células tratadas com 400 μM e 1 mM de CoCl_2 que vai de encontro ao facto do CoCl_2 ser naturalmente tóxico para as células. Foram realizados *western blots* para a caspase 3, uma proteína de 40 kDa, marcador apoptótico que após a clivagem dá origem a subunidades de 17 kDa ou 11 kDa. No entanto não se observou a clivagem desta proteína (*data not shown*). Os níveis de ANXA2 (p36) também não pareceram mudar após tratamento das células com 200 μM de CoCl_2 durante 2 horas.

Definida a concentração de CoCl_2 , procedeu-se aos ensaios de hipóxia química e decidiu-se aplicar a mesma concentração de CoCl_2 (200 μM) à linha celular MDA MB 231, previamente testada por outros autores⁹³. Quanto à linha A549, estas células pulmonares estão geneticamente preparadas para efetuar trocas de oxigénio entre os alvéolos e outras células. A distribuição de O_2 não é homogénea pelo que de certa forma, estas células estão preparadas para alterações no fornecimento de O_2 até certos níveis⁹⁴. Para além disso estudos feitos previamente no laboratório estabeleceram que a concentração óptima de CoCl_2 para os estudos de hipóxia química usando as células A549 seria de 400 μM (o dobro) da concentração de CoCl_2 utilizada para as restantes linhas celulares. Para cada experiência foram efetuados tratamentos com a mesma concentração de CoCl_2 e vários intervalos de tempo (*time courses*).

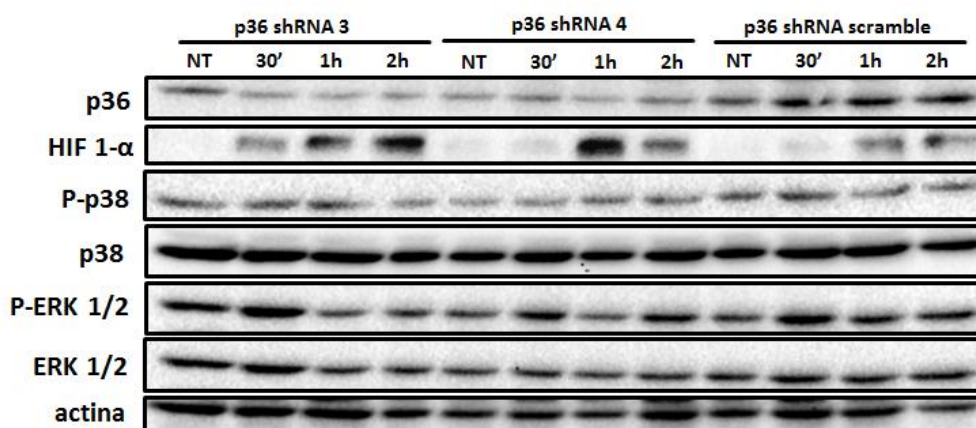


Figura 3.3 Células HT1080 depletadas em ANXA2 expostas a 200 μM de CoCl_2 estabilizam HIF-1 alfa. ANXA2 p36 shRNA3 – lado esquerdo, ANXA2 p36 shRNA4 – centro, ANXA2 p36 shRNA *scramble* – lado direito. As células foram cultivadas em placas de 60 mm e expostas a 200 μM de CoCl_2 nos intervalos de tempo identificados. Depois da lise seguiu-se a análise por *western blotting* – 20 μg de lisado em cada poço- incubação com os anticorpos indicados na figura. N=2.

Os resultados obtidos indicaram que as células HT1080 depletadas de ANXA2 estabilizam mais eficazmente HIF 1- α em resposta a hipóxia química (200 μM de CoCl_2) comparativamente com as células controlo (*scramble*). Relativamente a ERK 1/2 e p38

envolvidos em vias de sinalização de proliferação e pró-apoptóticas respetivamente, não foram registadas diferenças significativas entre as células depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo (figura 3.3).

A mesma experiência foi feita para a linha celular MDA MB 231. Os resultados mostraram que estas células, tratadas ou não tratadas, apresentavam níveis elevados de PRDXII em resposta à depleção da ANXA2, comparativamente com as células controlo (*scramble*). A hipóxia química favoreceu a estabilização de HIF 1- α que se verifica às 2h de tratamento com CoCl₂ e os níveis de HIF 1- α foram significativamente mais elevados em células depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo. Foi curioso observar, alguma ativação da via (PI3K/) AKT principalmente nas células depletadas de ANXA2, no entanto estas não se verifica na via ERK 1/2, envolvidas na ativação de vias de sobrevivência e proliferação (figura 3.4).

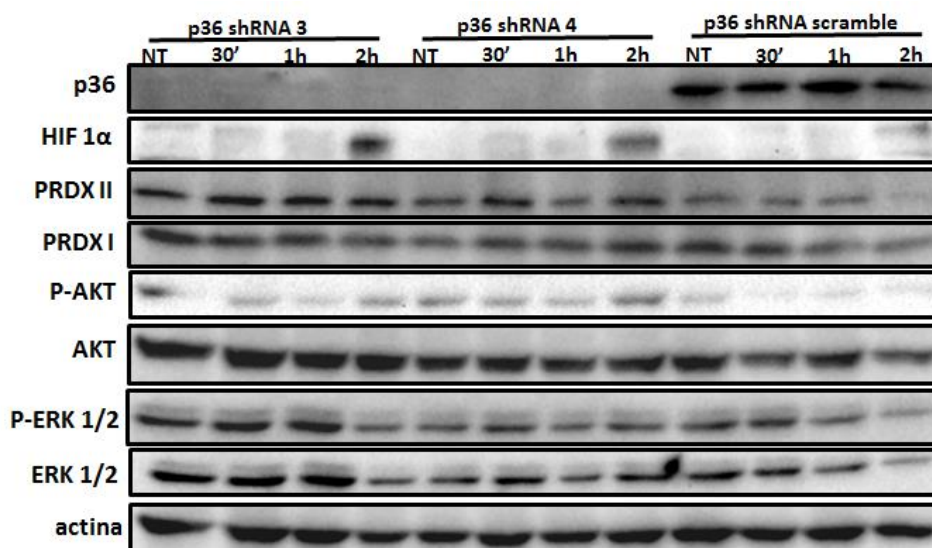


Figura 3.4. Células MDA MB231 depletadas em ANXA2 aumentam a PRDXII e estabilizam HIF 1- α após a exposição a 200 μ M de CoCl₂. ANXA2 p36 shRNA3 – lado esquerdo, ANXA2 p36 shRNA4 – centro, ANXA2 p36 shRNA *scramble* – lado direito. As células foram cultivadas em placas de 60 mm e expostas a 200 μ M de CoCl₂ nos intervalos de tempo identificados. Depois da lise seguiu-se a análise por *western blotting* – 20 μ g de lisado em cada poço- incubação com os devidos anticorpos. N=3.

As células A549 foram sujeitas a um tratamento de hipóxia longo – figura 3.5. Em ambos os controlo e *knockdown* para ANXA2 verifica-se a acumulação de HIF-1 α sensivelmente a partir das 3h de hipóxia e essencialmente às 16h onde se verifica a sua acumulação máxima nesta experiência. Relativamente ao HIF 2- α observou-se a sua acumulação a partir das 3h de hipóxia apenas nas células depletadas de ANXA2 que se prolonga até às 48h. Nestas células, a via (PI3K/) AKT esteve significativamente ativada

em ambas a depleção e controlo, parecendo haver alguma diminuição às 48h que pode ser devido a alguma morte celular por exposição ao CoCl_2 , o que é consistente com a fosforilação da via Pp38 que se verifica na imagem, neste tempo. A ativação da via apoptótica (P-p38) ocorreu às 16h e às 48h em ambas as linhas celulares (shRNA3 vs controlo) pelo que não parece haver correlação entre ANXA2 e ativação dos mecanismos de apoptose. O *VEGF*, para além de ser o gene que mais responde à atividade transcricional de HIF- α , possui na sua constituição proteica um domínio de cisteína reativo existente na família de VEGFs e faz desta um alvo sensível a sistemas redox. Decidi portanto investigar, se se verificava a produção proteica de VEGFD, que se

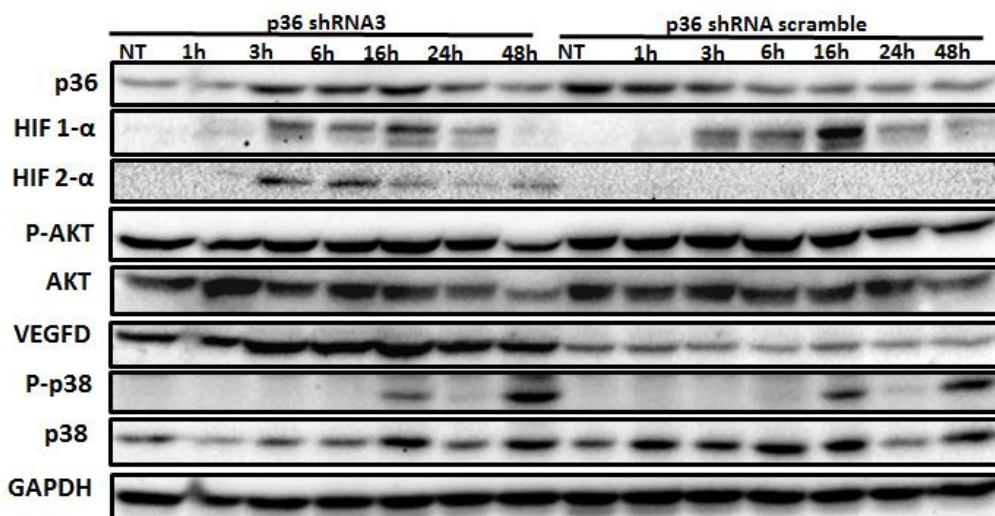


Figura 3.5. Células A549 depletadas em ANXA2 expostas a 400 uM de CoCl_2 estabilizam HIF 1- α . ANXA2 p36 shRNA3 – lado esquerdo, ANXA2 p36 shRNA4 – centro, ANXA2 p36 shRNA scramble – lado direito. As células foram cultivadas em placas de 60 mm e expostas a 400 uM de CoCl_2 nos intervalos de tempo identificados. Depois da lise seguiu-se a análise por *western blotting* – 40 ug de lisado em cada poço- incubação com os devidos anticorpos. N=3.

encontra expressa em vários tipos de células cancerígenas inclusive do pulmão^{95,96}. Curiosamente, verificou-se uma expressão significativamente mais elevada de VEGFD nas células A549 depletadas de ANXA2 (tratadas e não-tratadas), comparativamente com as células controlo.

Também se verificaram alterações nos níveis de ANXA2 em ambos os controlo e *knockdown*. Em p36 shRNA3 pode ver-se um aumento da ANXA2 a partir das 3h de hipóxia diminuindo a partir das 24h ao contrário das células controlo (*scramble*) cuja alteração se verifica por uma diminuição progressiva de ANXA2 a partir das 6h inclusivamente.

Após os ensaios de hipóxia química procedi a ensaios de hipóxia real. O mecanismo de estabilização de HIF- α afeta não só a atividade das PHD mas também de vários mecanismos celulares e outras proteínas sensíveis a variações de O_2 .

3.3 Hipóxia Real

Os mecanismos que atuam na hipóxia química (neste estudo induzida pelo CoCl_2) são diferentes dos mecanismos de hipóxia real, na qual as células foram incubadas numa incubadora programada para 1% O_2 . Enquanto que na hipóxia química estamos apenas a afetar um mecanismo específico (inibição das PHDs por competição do Co[II] pelo centro ativo onde se liga Fe[III]), a hipóxia real terá mais efeitos sobre toda a célula e em proteínas que são reguladas por O_2 , que não irão ser afetadas pela hipóxia química. No entanto, a um pH fisiológico também acontece a oxidação de iões de Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} importantes para mecanismos fisiológicos relacionados, por exemplo, com a homeostase sistémica intracelular, ligações DNA – proteína entre outros ⁵¹.

Tanto a hipóxia química com a real têm em comum a estabilização de HIF- α , e indução de espécies reativas de oxigénio (ERO), os dois focos deste trabalho. A hipóxia química é um método de fácil manipulação, barato e prático, que permitiu obter resultados preliminares como primeira análise de hipóxia. As experiências aqui realizadas foram posteriormente repetidas com ensaios de hipóxia real a 1% e 1.5 % de O_2 . Isto permitiu haver uma maior credibilidade e segurança dos resultados obtidos, assim como ter também como um controlo da experiência de forma ter certeza que as observações provinham dos fatores que ambos os métodos (hipóxia química e real) têm em comum: formação de ERO e estabilização de HIF- α .

3.3.1 Análise das vias de sinalização ativadas em resposta a condições de hipóxia real (1% de O_2)

As células MDA MB 231 e HT1080 (com ANXA2 shRNA3 e 4 ou shRNA *scramble*) foram expostas a 1% de O_2 (hipóxia), durante diferentes intervalos de tempos seguidos da lise celular para extração do conteúdo proteico destas células, e posterior análise por *western blot* para diferentes proteínas alvo de interesse – figura 3.6.

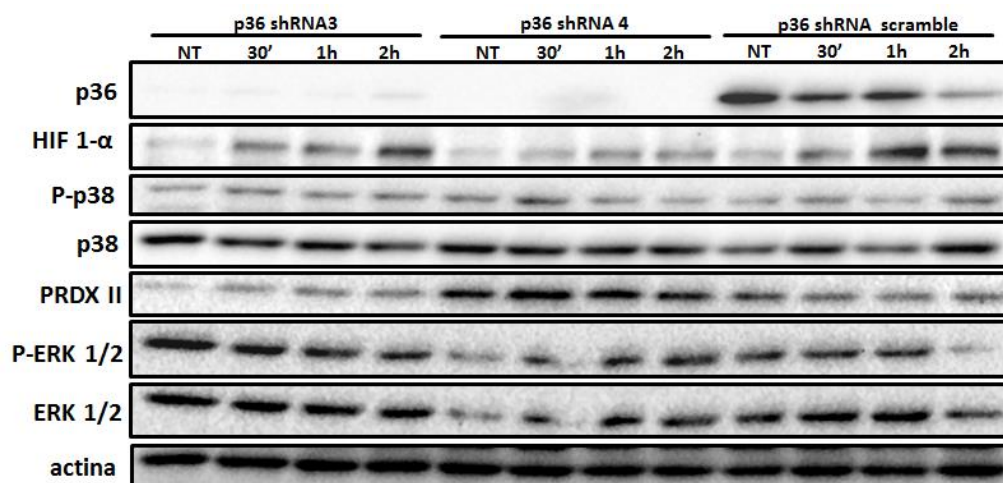


Figura 3.6. Células MDA MB 231 depletadas em ANXA2 mostram a indução de PRDX II em resposta afetando a expressão de HIF 1-alfa. Células MDA MB 231 (ANXA2 p36 shRNA3 – lado esquerdo, ANXA2 p36 shRNA4 – centro, ANXA2 p36 shRNA *scramble*) foram expostas a 1% de O₂ nos intervalos de tempo indicados seguido da análise por *western blot* (20 µg de lisado) e incubação com os anticorpos mencionados. N=3

Submetidas a 1% de O₂, as células MDA MB 231 p36 shRNA3 não parecem manifestar diferenças significativas a nível da estabilização de HIF-1α comparativamente com as células controlo. No entanto, nas células MDA MB 231 p36 shRNA4, verificaram-se níveis mais baixos de HIF-1α comparativamente com as células controlo durante o período de hipóxia investigado. Foi interessante observar um aumento da expressão da proteína antioxidante PRDXII nas células MDA MB 231 p36 shRNA4 (nas quais o silenciamento de ANXA2 é mais eficaz) tratadas e não tratadas comparativamente com as células MDA MB 231 p36 shRNA3 e controlo (*scramble*). Outro facto curioso foi observar nas células controlo (*scramble*), uma diminuição acentuada dos níveis de ANXA2 às 2h de hipóxia. São necessários mais estudos de exposição prolongada a condições de hipóxia para perceber durante quanto tempo esta diminuição ocorre e de que maneira poderá afetar os mecanismos celulares.

As células HT1080 foram expostas a 1% de O₂ durante um intervalo de tempo longo de hipóxia – figura 3.7. Os resultados indicam que as células depletadas de ANXA2 estabilizam o HIF-1 α por um período mais longo e mais eficazmente (às 24h o HIF 1- α continua estável) comparativamente ao controlo (*scramble*) que apresenta uma diminuição a partir das 16h. Às 6h de hipóxia verifica-se uma expressão mais forte de HIF 1- α em células depletadas de ANXA2, comparativamente ao controlo. Curiosamente, o HIF-2 α parece ser detetado principalmente às 6h de hipóxia nas células depletadas de ANXA2, o que não se verifica nas células controlo (*scramble*). Os

resultados mostram também que a via de sinalização PI3K/AKT está significativamente mais ativada nas células depletadas de ANXA2 às 16h e 24h comparativamente com as células controlo.

A sinalização apoptótica (P-p38) foi ativada às 16h e 24h em ambas as amostras (*knockdown* e controlo). Não se verificaram diferenças significativas nas vias mediadas por ERK 1/2 ou JNK, proliferação e pró-apoptóticas respetivamente. Verificaram-se diferenças na expressão de VEGF pelas células HT1080 depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo à semelhança do resultado obtido com as células A549, registaram-se níveis relativamente mais elevados nas células depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo.

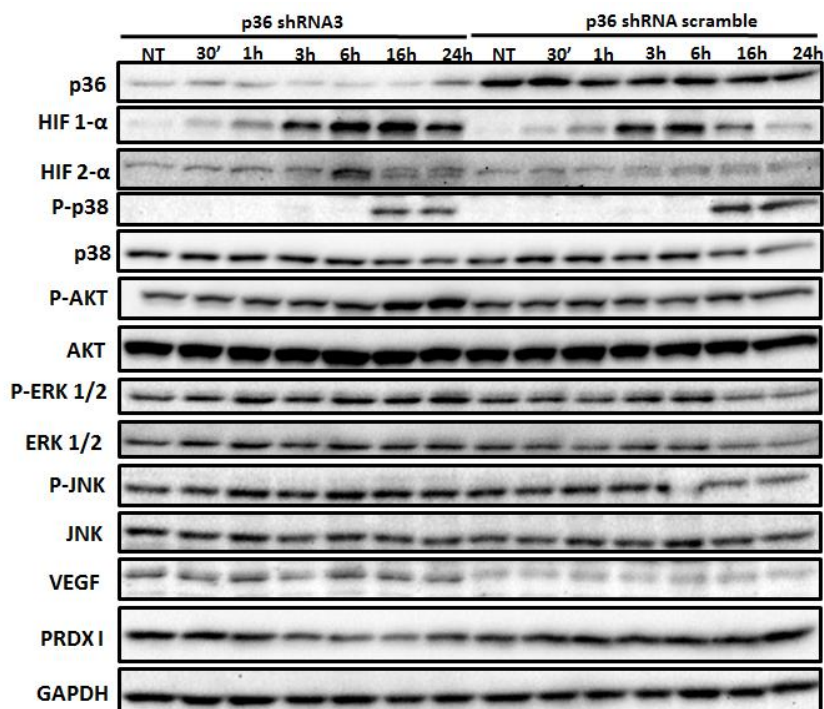


Figura 3.7. Células depletadas em ANXA2 estabilizam HIF-1 e 2 alfa e ativação da via PI3K/AKT em resposta a um tratamento de hipóxia comparadas às células controlo Células HT1080 (ANXA2 p36 shRNA3 – lado esquerdo, ANXA2 p36 shRNA4 – centro, ANXA2 p36 shRNA *scramble*) foram expostas a 1% de O₂ nos intervalos de tempo indicados seguido da análise por *western blot* (20 µg de lisado) e incubação com os anticorpos mencionados. N=4.

Após os resultados obtidos nas experiências anteriores nas quais se verificou o aumento de proteínas como PRDXII e VEGF mesmo em células não tratadas, resolvi comparar entre linhas se o mesmo acontecia ou se poderia ser um mecanismo específico para cada linha individual.

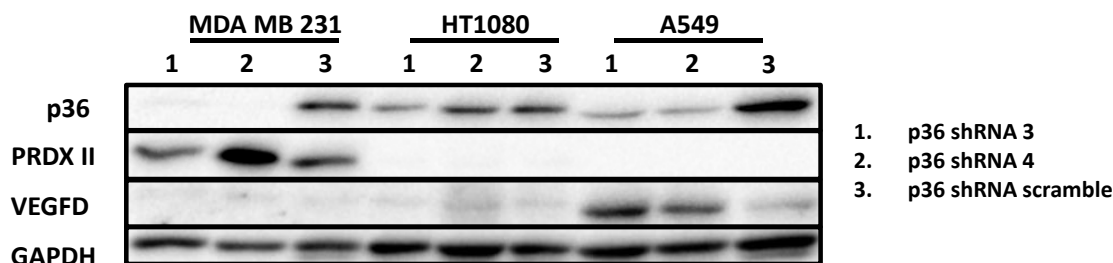


Figura 3.8. Depleção de ANXA2 aumenta os níveis de PRDXII em células MDA MB231 e VEGFD em células A549. As células MDA MB 231, HT1080 e A549 foram cultivadas em placas de 60 mm sem qualquer tratamento. Após a lise para extração do conteúdo proteico procedeu-se à análise por *western blotting* com 20 ug de lisado. N=1.

Desta forma analisei por *western blot* os níveis de PRDX II e VEGFD nas células A549, HT1080 e MDA MB 231 depletadas de ANXA2 e respetivos controlos – Figura 3.8. Os resultados revelaram uma expressão significativamente elevada de PRDX II nas células MDA MB 231 depletadas de ANXA2 comparadas ao controlo principalmente num dos shRNAs utilizados para depletar ANXA2 – shRNA4, confirmando os resultados obtidos anteriormente. O shRNA4 é mais eficaz no silenciamento da expressão de ANXA2. O mesmo acontece com VEGFD, cuja diminuição de ANXA2 parece levar ao aumento dos níveis basais de VEGFD com ou sem tratamento, mas apenas nas células A549; enquanto que nas células MDA MB 231 e HT1080 os níveis endógenos de VEGFD não são detectáveis ou são muito baixos, respetivamente

3.4 Análise da oxidação de resíduos de cisteína (Cys) reativos presentes em proteínas com capacidade redox após tratamento de hipóxia - BIAM

Os ensaios de BIAM foram realizados com o objetivo de investigar o estado redox de proteínas, mediado por EROs produzidas sob um estímulo hipóxico. Com este ensaio, não só nos propusemos a estudar o estado de oxidação de ANXA2 durante a hipóxia e confirmar se de facto esta proteína está a ser reciclada, assim como o estado de oxidação/redução de outras proteínas envolvidas em vias de sinalização potencialmente

afetadas por um estímulo hipóxico e perceber se há correlação entre estas alterações e a atividade oxidante de ANXA2. Esta reação de oxidação/redução é detetada pela sensibilidade dos resíduos de cisteína presentes nas proteínas sensíveis às ERO intracelulares que são detetadas pelo BIAM. Por outras palavras, a iodoacetamida biotinilada reage com aniões tiolato (S-) formando uma ligação covalente. A perda ou ausência do sinal da marcação por BIAM é proporcional ao grau de oxidação dos tióis, ou seja, quanto menor for o sinal, maior é o estado de oxidação e vice-versa. Desta forma, as células foram expostas a 1% O₂ durante um determinado período de tempo após o qual seguiu-se a lise das células e incubação com BIAM (200 µM) (procedimento descrito em *Materiais e Métodos*). As amostras foram no dia seguinte carregadas num gel de poliacrilamida para posterior deteção das proteínas-alvo com os anticorpos correspondentes. A deteção das proteínas marcadas por BIAM foi realizado através de uma nova incubação com streptavidina conjugada - HRP, uma proteína com elevada afinidade para a biotina, cuja ligação, uma vez formada é muito forte e difícil de quebrar, o que faz desta proteína um bom método de deteção, auxiliando desta forma a deteção do sinal marcado por BIAM.

Como referido anteriormente, uma diminuição na marcação por BIAM revela um aumento da oxidação dos resíduos de Cys por ERO. – Figura 8. O painel da esquerda representa a quantidade total de proteína existente em cada lisado. O lado direito representa as proteínas que se ligaram ao BIAM por estarem na sua forma reduzida. Olhando para o lado direito da figura 3.9, os resultados indicam que a ANXA2 apresenta um perfil redox variável ao longo do tempo de exposição à hipóxia, notável principalmente aos 15 minutos, 1h e 2h na qual se apresenta mais oxidada (menos

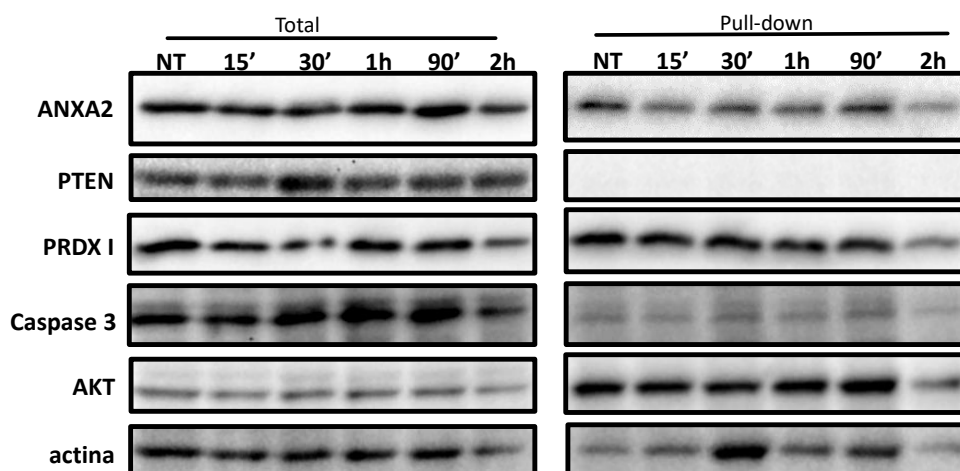


Figura 3.9. Células HT1080 WT revelam estado oxidação-redução após serem submetidas a condições de hipóxia (1% O₂). As células foram expostas a 1% de O₂ no intervalo de tempo indicado seguido da marcação por BIAM (200 µM) e análise por *western blot*. N=2.

marcação por BIAM) comparativamente ao seu estado não tratado. É possível verificar que algumas proteínas apresentam –se maioritariamente sob a forma oxidada como PTEN e caspase 3. Foi curioso também verificar o estado reduzido dominante de PRDX I e AKT que parece se alterar apenas após as primeiras 2h de hipóxia. É possível ver também que a actina, uma proteína importante para componentes como o citoesqueleto, é sensível a oxidação durante a hipóxia, sendo visível uma alteração do seu estado redox mais oxidado (NT-15 minutos) a mais reduzida aos 30 minutos de hipóxia, voltando a ficar oxidada e reduzida, possivelmente devido a fatores que possam estar a ser ativados para uma reorganização do citoesqueleto para que as células se consigam adaptar às condições de hipóxia – figura 3.9.

3.5 Análise da expressão relativa dos níveis de mRNA de genes regulados por HIF

Após a análise por *western blot* para verificar a ativação de vias que contribuem para a proliferação (P-ERK1/2), sobrevivência (P-AKT)), regulação da transcrição de genes (HIF-1 α , HIF-2 α), proteínas antioxidantes (PRDXI, PRDXII) e vias apoptóticas (JNK, P-p38, caspase3) em resposta à depleção de ANXA2 com e sem estímulo hipóxico, decidi então avaliar se a transcrição dos genes que codificam para proteínas reguladas pelo principal fator de transcrição envolvido na resposta hipóxica, HIF, seria também afetada em células depletadas da proteína em estudo.

Foram realizados PCRs quantitativos em tempo real (qRT-PCR) após uma investigação na literatura de potenciais alvos sensíveis à hipóxia por forma a perceber de que forma a depleção de ANXA2 poderia afetar a sua expressão génica.

Os resultados obtidos por *western blot* de experiências realizadas com as células MDA MB 231 (figuras 3.4 e 3.6) revelou haver de facto um aumento de PRDX II na depleção de ANXA2 sugerindo que o sucedido parece estar a ser um mecanismo de compensação por parte destas células que não se verificou nas outras linhas (figura 3.8.. Experiências realizadas anteriormente pelo nosso laboratório revelaram não haver diferenças entre a depleção de ANXA2 e os níveis proteicos de PRDX I, pelo que considerou-se este ser um bom controlo negativo para esta experiência. Utilizou-se então *primers* correspondentes a *PRDX I* e *PRDX II* e fomos investigar se este mecanismo de compensação também acontecia a nível da transcrição.

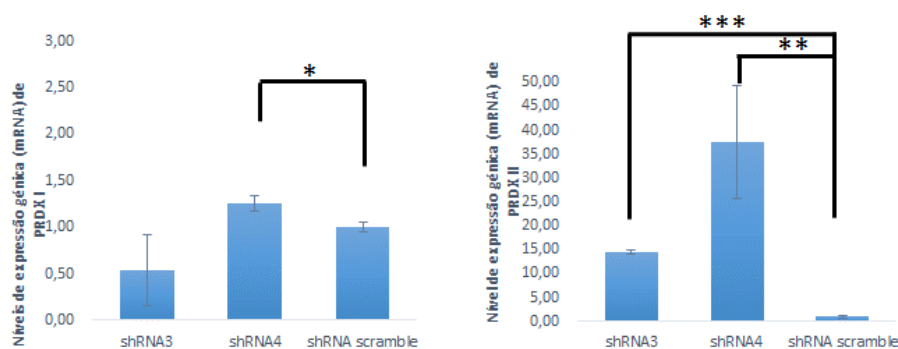


Figura 3.101. Expressão relativa dos mRNAs correspondentes ao gene da Peroxirredoxina I (PRDX I) e Peroxirredoxina II (PRDX II) em células MDA MB 231 não tratadas. As células MDA MB 231 com a depleção de ANXA2 (shRNA3 e 4) versus controlo shRNA *scramble*) foram cultivadas em placas de 60 mm sem tratamento e extraiu-se o RNA para posterior análise por qRT-PCR. Os valores obtidos foram normalizados com o gene *housekeeping* GAPDH. Os P-values representam a diferença dos níveis de expressão génica entre a depleção de ANXA2 (shRNA) e controlo (*scramble*). Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão com N=3. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste t *Student*: *** P < 0,001.

Os resultados obtidos por qRT-PCR revelaram que a transcrição de *PRDX I* não parece ser alterada nas células depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo (*scramble*), o que seria esperado. No entanto, os resultados revelaram que o gene para a *PRDX II*, que codifica para uma proteína antioxidante que atua sob um mecanismo semelhante à ANXA2, mostrou níveis de transcrição mais elevados em células depletadas de ANXA2 comparativamente às células MDA MB 231 controlo – figura 3.10. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos a nível das proteínas por análise por *western blot* – figuras 3.4 e 3.6. As células HT1080 e A549 foram expostas a intervalos de tempo de hipóxia real (1.5% O₂) e química (400 μM), respetivamente. As células HT1080 WT foram NT ou expostas a intervalos de tempo de 3h e 6h com 1.5% O₂ e foram analisados genes como *HIF-1α*, *HIF-2α*, os quais se destacaram nas análises por *western blot* anteriormente. Investiguei ainda genes que são alvos destes fatores de transcrição como *GLUT1* – um dos ativadores do mecanismo glicolítico, *NRF2* – fator de transcrição que ativa a expressão de antioxidantes, e *MMP2* – colagenase importante para a degradação da ECM, cujas atividades estão potencialmente envolvidas durante a resposta hipóxica - figura 3.11.

Os resultados sugerem que a transcrição de *HIF 1-α* diminui com a exposição a níveis baixos de O₂. Curiosamente, a expressão de *HIF 2-α* parece aumentar a partir das 6h inclusive comparativamente aos níveis do controlo. Não se verificaram diferenças significativas nos níveis de expressão de *NRF2* e *MMP2*, no entanto, verificou-se um aumento significativo de *GLUT1* ao longo do tempo de hipóxia.

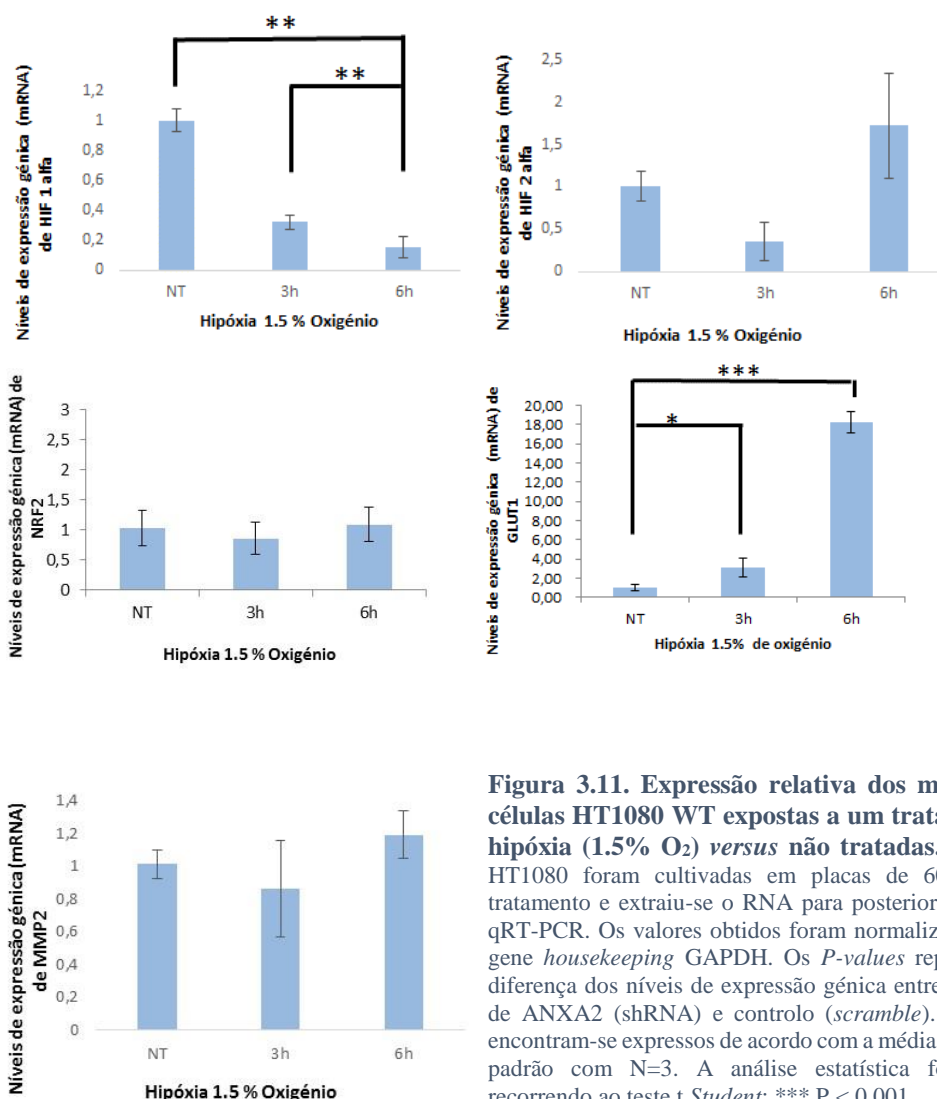


Figura 3.11. Expressão relativa dos mRNAs em células HT1080 WT expostas a um tratamento de hipóxia (1.5% O₂) versus não tratadas. As células HT1080 foram cultivadas em placas de 60 mm sem tratamento e extraiu-se o RNA para posterior análise por qRT-PCR. Os valores obtidos foram normalizados com o gene *housekeeping* GAPDH. Os *P-values* representam a diferença dos níveis de expressão génica entre a depleção de ANXA2 (shRNA) e controlo (*scramble*). Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão com N=3. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste t *Student*: *** P < 0,001.

As células A549 p36 shRNA3 e controlo foram expostas a um tratamento com 400 µM de CoCl₂ durante 3 horas e foram analisados genes como a ANXA2, de forma a verificar que as células continham a depleção da expressão génica como esperado, *HIF-2α* e *GLUT1* – figura 3.12. Os níveis de ANXA2 mantiveram-se baixos como seria de esperar. No entanto, verificou-se um aumento da transcrição de ANXA2 às 3h de hipóxia nas células controlo, sugerindo que a expressão que ANXA2 está a ser estimulada em condições de hipóxia. Comparando ambas as linhas (depleção de ANXA2 e controlo), verifica-se que as células A549 p36 shRNA3 não tratadas, exibem uma expressão de *HIF-2α* cerca de 3 vezes superior comparativamente ao controlo, sugerindo que a ANXA2

poderá estar a interferir com a expressão de *HIF 2- α* mesmo em condições de normóxia. No entanto, após o estímulo hipóxico esta diferença é quase nula (3h) entre as células depletadas de ANXA2 e controlo.

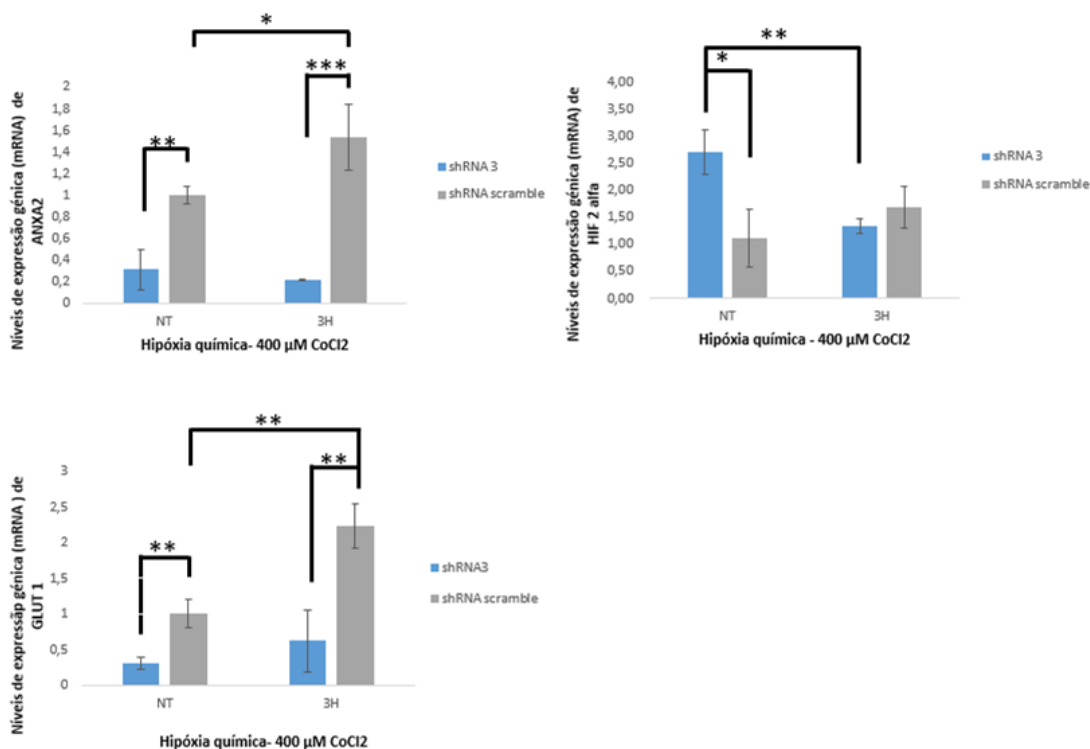


Figura 3.12. Expressão relativa dos mRNAs em células A549 depletadas em ANXA2 versus controlo expostas a um tratamento de hipóxia (1.5% O₂). As células A549 depletadas em ANXA2 (shRNA3 e 4) versus controlo sshRNA *scramble*) foram cultivadas em placas de 60 mm sem tratamento e extraiu-se o RNA para posterior análise por qRT-PCR. Os valores obtidos foram normalizados com o gene *housekeeping* GAPDH. Os *P-values* representam a diferença dos níveis de expressão génica entre a depleção de ANXA2 (shRNA) e controlo (*scramble*); tratadas e não tratadas (NT). Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão com N=3. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste t *Student*: *** P < 0,001.

Relativamente a *GLUT1*, a depleção de *ANXA2* parece afetar a sua transcrição durante a hipóxia, mantendo-a baixa pelo menos nas primeiras 3h de hipóxia. Apesar disso e à semelhança de resultados anteriores nas células HT1080 WT, verifica-se que nas células controlo (*scramble*) há um aumento acentuado da expressão de *GLUT1* em resposta a condições de hipóxia. Como tal estas experiências necessitam de ser repetidas com intervalos de tempo mais longos para investigar se esta alteração é exclusivamente devida à depleção de *ANXA2* que poderá estar a afetar um dos principais genes responsáveis pela ativação do mecanismo glicolítico.

Todos os qRT-PCR foram normalizados com o gene *housekeeping* GAPDH.

3.6 Análise dos níveis de ERO em células depletadas de ANXA2 versus controlo

De forma a investigar se a ANXA2 é importante na inativação de ERO em células cancerígenas durante a exposição a condições de hipóxia, foram analisados os níveis de ERO em células depletadas de ANXA2 e controlo – figura 3.13.. As células foram expostas a tempos diferentes de hipóxia e incubadas com diacetato de 2',7' diclorofluoresceína (DCFH-DA) [ver secção 2.4 de *Material e Métodos*].

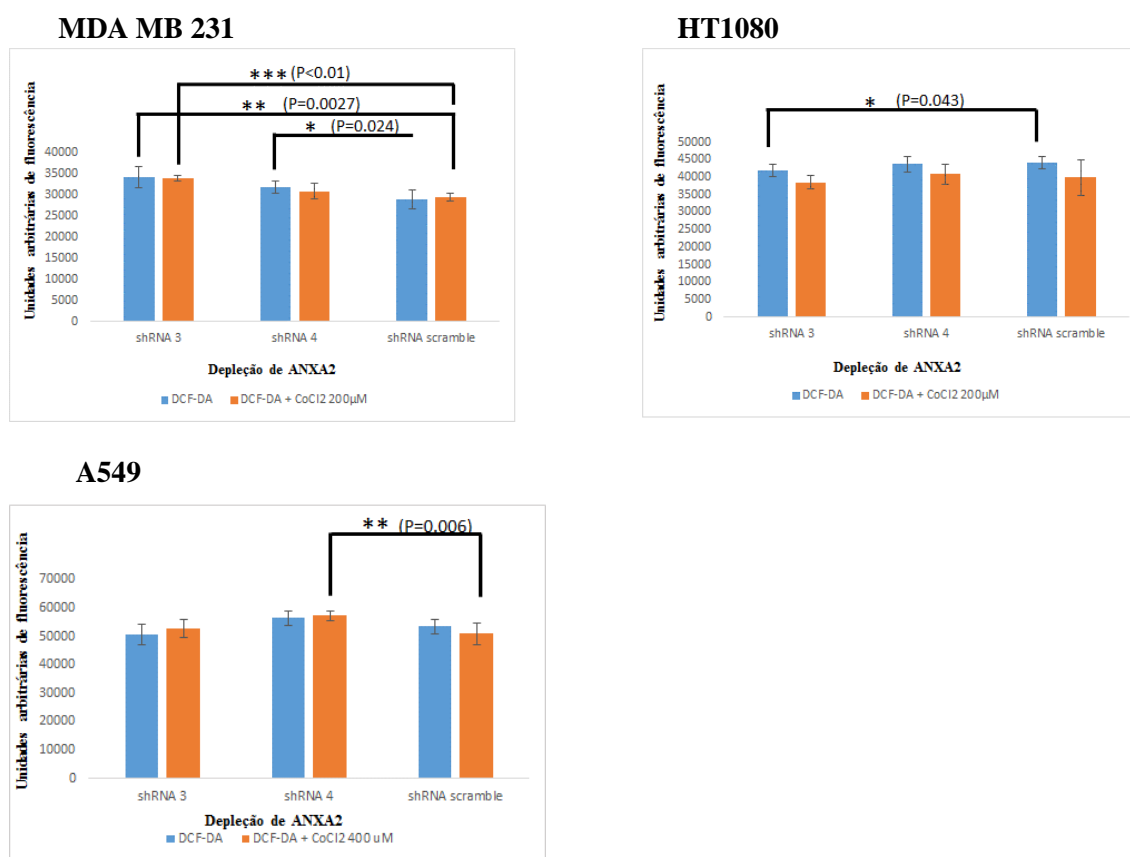


Figura 3.13. Medição da concentração de ERO pelo ensaio DCF-DA em células MDA MB 231, HT1080 e A549 com knockdown para a ANXA2 (shRNA3 e 4) e respetivo controlo (shRNA scramble) sob condições de hipóxia. O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços na qual metade foi utilizada para um tratamento de CoCl₂ a 200 µM (MDA MB 231 e HT1080) e 400 µM (A549) em cada poço incubação de 30 minutos para as células MDA MB 231 e HT1080 e 3 horas para as células A549. Para o ensaio DCF-DA foi inicialmente retirado o meio DMEM dos poços, lavaram-se as células com PBS e retirou-se novamente. Colocou-se 100 µL de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺ contendo 200 µM de DCF-DA em metade da placa, e a outra metade com 100 µL de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺ com 200 µM de DCF-DA e 200 µM de CoCl₂ (MDA MB 231 e HT1080) e 400 µM (A549). Incubou-se durante 30 minutos a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Por fim foram medidas as respetivas fluorescências num espectrofotómetro (excitação a 492 nm e emissão a 530 nm). Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão. Os P-values representam a diferença dos níveis de ERO entre tratadas com DCF-DA (azul) e tratadas com DCF-DA + CoCl₂ (laranja) com um nível de significância de 95 %. N=6.

Os resultados sugerem que, ao contrário do esperado, não se verificaram grandes diferenças na concentração de ERO entre células com e sem a depleção de ANXA2 não tratadas ou tratadas com CoCl_2 nas três linhas celulares estudadas. No entanto, nas células MDA MB 231 depletadas de ANXA2, verificaram-se níveis de ERO um pouco mais elevados comparativamente ao controlo (*scramble*).

4. Discussão e Perspetivas Futuras

Sabe-se que as células cancerígenas expressam tipicamente níveis mais elevados de ERO, o que lhes confere vantagem proliferativa e promove a progressão tumoral ⁹⁷. O nosso laboratório identificou recentemente a ANXA2 como uma nova proteína com propriedades reguladoras via oxidação-redução e cujo papel é extremamente importante durante o *stress* oxidativo, e de forma particular, na sinalização celular promovendo a tumorigénese ⁴². O seu resíduo reativo Cys-8 é oxidado por H₂O₂, sendo reduzido novamente pelo sistema da tioredoxina, o que permite que apenas uma molécula de ANXA2 inative várias moléculas de H₂O₂ participando desta forma em vários ciclos redox ³⁶.

Manter a homeostase, sobretudo no que toca aos níveis intracelulares de O₂, é importante para a sobrevivência da célula pelo que uma simples mudança na pressão de O₂ é o suficiente para que sejam ativados mecanismos que permitam que a célula se adapte a estas alterações. HIF tem um papel crucial nesta adaptação devido à sua capacidade transcricional que estimula a expressão de genes responsáveis por repor a homeostase através da vasodilatação, angiogénese, eritropoiese, invasão, bem como a ativação do mecanismo glicolítico ¹⁵.

Como referido anteriormente, as PHD, necessitam de O₂, 2-oxaglutarato e ferro (Fe II) para exercerem corretamente a sua função e levar HIF- α à degradação por via do proteossoma, o que faz com que estas proteínas sejam consideradas um dos maiores sensores de O₂ intracelular ⁴⁵. O aumento dos níveis de ERO intracelular pode levar à oxidação do ião Fe²⁺ a Fe³⁺ inibindo a ação das PHD e consequentemente, o HIF- α não é degradado o que pode justificar a estabilização de HIF- α que se verifica nas Figuras 3.2 a 3.7 da secção de Resultados ^{19,44,45}. Curiosamente, esta estabilização foi mais significativa em células que apresentam a depleção de ANXA2 comparativamente com as células controlo. Uma possível explicação para este resultado é o facto da depleção de uma proteína antioxidante, como é o caso da ANXA2, poder levar a uma maior acumulação de ERO nas células depletadas desta proteína durante a hipóxia. Madureira *et al.* provou que células sujeitas a *stress* oxidativo apresentam mais ERO quando depletadas de ANXA2. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não mostraram uma diferença significativa na concentração de ERO em células HT1080, MDA MB 231 ou A549 depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo durante a

hipóxia. Por outro lado não podemos descartar a possibilidade da ANXA2 atuar diretamente noutras proteínas antioxidantes como uma proteína redutora, por exemplo prevenindo a oxidação das PHDs e do HIF e assim contribuindo para a degradação de HIF- α . Curiosamente, estudos revelaram que HIF- α apresenta duas cisteínas reativas (Cys-800 e Cys-533). A primeira é sensível a modificações redox que em conjunto com outros aminoácidos (Leu-795, Leu-818 e Leu-822) ajudam na estabilização e interação com a proteína p300⁹⁸⁻¹⁰⁰. Alterações como estas foram significativamente atenuadas através de um tratamento com antioxidantes (como glutathione, vitamina C e E) em vários tipos de células¹⁵. Estudos demonstraram que a Cys-800 de HIF- α era crucial para a sua atividade transcricional cujas mutações nesta região impedia este fator de exercer a sua função¹⁰¹. O óxido nítrico, (*nitric oxide*, NO) é um regulador importante de proteínas que possuem cisteínas na sua constituição. Estudos revelaram que a Cys-533 de HIF- α está dependente da nitrosilação (adição de um grupo NO a tióis (ou metais)) para prevenir degradação deste fator sob condições de normóxia^{99,102}. Sendo que a ANXA2 também possui afinidade para interagir com cisteínas reativas coloca-se a seguinte hipótese:

A oxidação da cisteína (Cys-533) de HIF- α leva a uma alteração da conformação da sua estrutura impedindo a ligação das PHD e FIH aumentando a estabilidade deste fator, logo, a proteína ANXA2 ao reduzir HIF- α permite que as PHD e FIH possam ligar-se a HIF- α levando à sua degradação.

Serão necessários outros estudos para investigar esta hipótese, e se a mesma correlaciona com o aumento da estabilização de HIF- α na depleção da nossa proteína de interesse (ANXA2), por exemplo, através de um ensaio de BIAM podemos comparar os níveis de oxidação de HIF- α em células com depleção e níveis normais de ANXA2. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a presença de ANXA2 possui de facto um papel fundamental durante a hipóxia na regulação da degradação de HIF- α . Seria interessante investigar se existe, interação entre HIF- α e ANXA2 e perceber se o papel desta proteína antioxidante durante a hipóxia tumoral é de forma direta ou inversa com este fator de transcrição. Nas figuras 3.5 e 3.7 dos Resultados, experiências com as células A549 e HT1080 respetivamente mostram, pela primeira vez, a estabilização de HIF 2- α apenas em células depletadas de ANXA2. Foram realizadas incubações para HIF 2- α em células MDA MB 231, no entanto não se observou a estabilidade deste fator (*data not shown*). A maioria dos tumores sólidos apresentam regiões de hipóxia, devido à

deficiência da vasculatura tumoral, cujo alcance de nutrientes e O₂ é muito limitado. Nestes casos, os mediadores da resposta hipóxica (HIF – 1 α e HIF - 2 α) são fundamentais para a sobrevivência destas células ²².

HIF 1- α é responsável pela indução da primeira fase da resposta hipóxica (< 24h) e HIF 2- α é responsável pela segunda fase considerada resposta crónica (24h -72h) ²². Holmquist-Mengelbier *et al.* mostraram que existe uma diminuição da expressão de HIF 1- α em células de neuroblastoma após uma exposição prolongada a condições de hipóxia que leva a uma troca (*switch*) de HIFs que se verifica pelo aumento de expressão de HIF 2- α . Neste trabalho apenas observamos estabilização de HIF 2- α em células aonde houve depleção de ANXA2. De acordo com os resultados de Holmquist-Mengelbier *et al.* a estabilização de HIF 2- α ocorre de uma forma mais tardia comparativamente com HIF 1- α e prolonga-se por períodos mais longos de hipóxia, quando a expressão de HIF 1- α já não é detetável. O mesmo estudo de Holmquist-Mengelbier *et al.* provou, através da inserção de um siRNA contra HIF 2- α , em ratinhos *nude* para células de neuroblastoma, que o volume dos tumores eram significativamente menores comparados a experiências nas quais depletaram HIF 1- α que não afetou o crescimento tumoral.

Estudos de análise bioinformática verificaram que as proteínas HIF 1- α e HIF 2- α apresentam 48 % de homologia. Embora HIF 1- α e HIF 2- α tenham genes alvo em comum (como é o caso de *VEGF* e *GLUT1* importantes mediadores da ativação da angiogénese e mecanismo glicolítico, respectivamente), também existem genes únicos para cada HIF (por exemplo: HIF -1 α : *BNIP3* e *P53* (apoptose), *P21* e *P27* (paragem do ciclo celular); HIF 2- α : inibição de *P53*, ativação de *MYC* (proliferação), *CXCR4* (metastização) e *OCT3/4* (proliferação de células estaminais)) ^{22,103}. Isto faz de HIF 1- α o mestre da regulação da resposta hipóxica devido à sua capacidade de induzir uma resposta angiogénica numa primeira fase, ou mesmo ativar mecanismos apoptóticos variando de célula para célula e de acordo com as mutações que cada uma apresenta. HIF 2- α parece regular sobretudo uma resposta de adaptação e sobrevivência à hipóxia, conferindo o HIF 2- α um papel caracteristicamente oncogénico após longos períodos de exposição à hipóxia principalmente devido à forte expressão de VEGF associada à estabilização deste fator de transcrição em vários tipos de cancro particularmente em células de neuroblastoma ^{22,104}.

Relativamente ao padrão de expressão de mRNA, segundo a literatura este também varia de acordo com o tipo de célula, por exemplo: HIF 2- α é dominante (HIF 2-

$\alpha > \text{HIF } 1\text{-}\alpha$) no endotélio microvascular, fibroblastos de células pulmonares fetais, células de coriocarcinoma (que se forma durante a gestação, gravidez), hepatoma, carcinoma cervical e pouco expresso em outros tecidos como cérebro, pulmões, rins, pâncreas e intestino. O nível de expressão de mRNA do *HIF 1- α* apresenta-se sobretudo em células de fibrossarcoma, fibroblastos de células pulmonares de feto e um pouco distribuído por outros tecidos ¹⁰⁵.

Estudos revelaram também que os níveis de expressão de mRNA de *HIF 1- α* (mas não de *HIF 2- α*) diminuem com a exposição prolongada à hipóxia, o que foi consistente com os resultados de qRT-PCR realizados em células HT1080 - figura 3.11 ¹⁰⁶. Estes resultados – figura 3.11 – mostram não só uma diminuição gradual significativa de *HIF 1- α* mas também uma tendência para aumentar os níveis de *HIF 2- α* sugerindo uma espécie de troca de HIFs em resposta à hipóxia que se verifica também a nível da proteína na figura 3.7. No entanto, os mecanismos que controlam diminuição/aumento de *HIF 1- α* /*HIF 2- α* não são conhecidos. Não se verificaram alterações nos níveis de expressão de *NRF2* e *MMP2*. Uma possível explicação será devido ao tempo de hipóxia não ter sido suficiente para induzir a expressão destes genes. No entanto, estes resultados também revelam uma resposta rápida e significativa na transcrição de *GLUT1*, sugerindo que a ativação de um metabolismo glicolítico é uma das primeiras respostas das células cancerígenas ao *stress* hipóxico, como seria esperado. São necessários mais estudos sobretudo ao nível da proteína de forma a perceber se a estabilização de GLUT1 é um mecanismo necessário na ativação do mecanismo glicolítico numa fase precoce, ou tardia da resposta hipóxica, e repetir este ensaio com células depletadas de ANXA2 e perceber se esta está a interferir com a expressão destes genes (*GLUT1*, *Nrf2*, *MMP2*, *HIF 1 - α* *HIF 2 - α* ou mesmo *VEGF*).

Nas células A549, foi possível fazer esta comparação – figura 3.12. Procurámos sobretudo por diferenças de expressão em *HIF 2- α* como verificámos nas experiências de *western blotting*. Quanto à expressão génica de *HIF 2- α* , os resultados do qRT-PCR mostraram diferenças sobretudo nas amostras não tratadas e depletadas de ANXA2 comparativamente com as células controlo, aonde observamos uma expressão génica cerca de três vezes mais alta de *HIF-2- α* em células depletadas de ANXA2. Esta expressão parece diminuir às 3h de hipóxia, no entanto, as diferenças entre a depleção e o controlo de ANXA2 são quase nulas neste tempo de hipóxia. Tendo em conta que os resultados de qRT-PCR obtidos para as células HT1080 mostraram uma diminuição transiente da

expressão de *HIF-2- α* às 3h de hipóxia e uma tendência para o aumento de expressão deste gene às 6h, concluímos que será necessário analisar a expressão de *HIF-2- α* para períodos mais longos de hipóxia (6h-24h). Quanto à expressão de *GLUT1*, observamos um aumento significativo de expressão deste gene em células controlo, sugerindo que a ANXA2 pode estar a contribuir para a indução de *GLUT1*, no entanto, serão necessários mais estudos de hipóxia para perceber se este aumento é superior em períodos prolongados de hipóxia.

Como referido acima, *VEGF* e *GLUT1* são alvos comuns de *HIF-1- α* e *HIF-2- α* . O VEGF é a molécula mais importante que medeia a sinalização responsável pela formação da vasculatura tumoral ²² o que me levou a investigar se a nível proteico, os níveis de VEGF poderiam ser influenciados pela depleção de ANXA2, tendo em conta as alterações registadas nos HIFs- α . Curiosamente nas células HT1080 e A549 verificou-se uma maior expressão de VEGF em células depletadas de ANXA2 comparativamente ao controlo (*scramble*). Nas células A549, após a elaboração da técnica de *western blotting*, as membranas foram incubadas com um anticorpo específico para VEGFD, uma molécula que pertence à família dos VEGFs cuja atividade promove a vasculatura linfática e metastização presente em alguns tipos de cancros inclusive pulmão e colorectal, mas cuja função tem sido pouco estudada até agora ^{95,96}. Os resultados mostraram uma expressão de VEGFD significativamente mais elevada em células depletadas de ANXA2, tratadas e não tratadas, o que sugere evidentemente um papel da ANXA2 na regulação de VEGFD, sobretudo nas células A549 – figuras 3.5 e 3.8. Nas células HT1080, foi utilizado um anticorpo geral contra VEGF, pois VEGFD não foi detetado nestas células (figura 3.8), e verificou-se um resultado semelhante no qual a acumulação de VEGF foi mais visível em células depletadas em ANXA2 – figura 3.7. No entanto, anticorpos específicos contra as isoformas de VEGF (VEGF-A; B; C) são necessários para perceber qual é a isoforma cuja expressão está a ser aumentada nestas células (HT1080). Na literatura estão descritos 8 resíduos de cisteínas na estrutura das proteínas VEGF ^{96,107} pelo que se colocam as seguintes questões:

Será algum(s) deste(s) resíduo(s) sensível à oxidação por ERO? Terá a ANXA2 afinidade por este(s) resíduo(s) levando à sua redução? Estará esta modificação redox associada com a acumulação de VEGF?

Serão necessários mais ensaios de forma a perceber de que maneira ANXA2 poderá estar envolvida na acumulação de VEGF e por sua vez na angiogénese tumoral.

Ensaio de BIAM usando células knockdown para a ANXA2 e controlo submetidas a hipóxia, irão permitir investigar se a ANXA2 tem algum papel na regulação redox de VEGF.

Também seria interessante investigar se ANXA2 poderá estar relacionada com a ativação da angiogénese. Um ensaio interessante seria a angiogénese *in vitro*¹⁰⁸. Esta experiência tem como método o cultivo de células numa matrigel na qual verificaríamos após a adição ou repressão de um substrato (neste caso seria ANXA2) se verificaria a formação de uma estrutura tipo capilar e desta forma verificar se de facto ANXA2 é necessária para a angiogénese durante a hipóxia.

A PRDX II é expressa em vários tipos de células e encontra-se sobretudo no citosol tal como a ANXA2 como referido anteriormente^{42,109}. Para além disso estas duas proteínas ligam-se a membranas de forma dependente de cálcio, localizam-se em lipid raft (aonde ocorre transdução de sinal) e fazem translocação para o núcleo em resposta a stress oxidativo. Em ambas as figuras 3.4 e 3.6 as células depletadas de ANXA2 mostraram um aumento da PRDXII mesmo em amostras não tratadas. Acoplado a este aumento, também se verificaram alterações na estabilização de HIF 1- α quando surge este aumento da PRDXII, (p36 shRNA4) que parece estar a favorecer a degradação de HIF 1- α . Este aumento de PRDX II verifica-se não só a nível da proteína como também a nível de expressão de mRNA – figura 3.10. Os níveis de *PRDX I* não sofreram alterações nas células depletadas de ANXA2 ou controlo como seria esperado, uma vez que não se observou diferenças a nível de expressão proteica da PRDX I em células MDA MB 231 depletadas de ANXA2 comparativamente com células controlo (figura X) servindo de controlo negativo da experiência. No entanto, a expressão de mRNA de *PRDX II* aumenta significativamente em células depletadas de ANXA2. Estes resultados sugerem a possibilidade das células aumentarem a expressão da PRDXII para tentarem compensar a falta de ANXA2, possivelmente levando assim a um novo equilíbrio REDOX.

O estudo do papel antioxidante da ANXA2 durante a hipóxia, em células HT1080 *WT*, através do ensaio de marcação dos resíduos de cisteína reativos por BIAM revelaram de facto a alteração do estado redox de ANXA2 em exposição a condições de hipóxia (1 % O₂), apresentando-se inicialmente no seu estado reduzido em células não tratadas – figura 3.9. O padrão redox é visível durante a exposição à hipóxia sugerindo a reciclagem desta proteína durante a hipóxia. A análise dos níveis de ERO nas células MDA MB 231 depletadas de ANXA2 versus controlo revelou de facto haver uma diferença significativa na acumulação intracelular de ERO. No entanto não se verificaram diferenças entre

células não tratadas ou tratadas com CoCl_2 nas 3 linhas celulares estudadas, possivelmente devido à toxicidade do CoCl_2 que possa estar a causar alguma morte celular – figura 3.13. Estudos de viabilidade celular seriam esclarecedores para verificar a possível toxicidade do CoCl_2 .

Com o objetivo de validar os resultados acima descritos, são necessárias medidas futuras aplicadas a várias linhas cancerígenas de linhas comerciais ou mesmo em amostras clínicas.

Considerando que uma pequena fração de ANXA2 existe no núcleo é necessário investigar a interação entre ANXA2 e fatores de transcrição como HIF 1- α e HIF 2- α e seus alvos como VEGF e GLUT1 por exemplo, seria interessante através da co-imunoprecipitação (Co-IP) verificar estas possíveis interações.

Tendo em conta os resultados obtidos nas figuras 3.5 e 3.12 em células A549, seria curioso realizar novos qRT-PCRs com tempos de exposição à hipóxia mais prolongados e comparar com os níveis proteicos, de forma a perceber se a depleção de ANXA2 possa estar a afetar não só os níveis proteicos como também a nível transcricional genes como *HIF 2- α* e *GLUT1*. Estes resultados revelam que a hipóxia parece estar também a regular os níveis de ANXA2 pelo que seria necessário realizar, por exemplo, ensaios de ciclohexamida de forma a observar o tempo médio de vida da ANXA2 durante a hipóxia e de proteínas como HIF - α , GLUT1 e VEGF e perceber que ao eliminarmos a ANXA2 estamos a afetar a estabilidade de algumas destas proteínas e se existe alguma correlação com o tempo médio de vida de cada uma.

O consumo de glicose é um processo biológico imprescindível para a sinalização celular, metabolismo e produção de energia. Através da glicólise e do ciclo de *Krebs*, a glicose é oxidada, libertando CO_2 , H_2O e ATP. Este mecanismo é o principal mecanismo de obtenção de energia e compostos mantidos pelas células cancerígenas. Tendo em conta os resultados obtidos via qRT-PCR, seria curioso realizar ensaios de consumo de glicose e perceber se de facto a nossa proteína de interesse poderá estar a favorecer a glicólise. Um método muito simples de investigar o papel da proteína ANXA2 na glicólise seria, por exemplo, medir o consumo de glicose em células depletadas de ANXA2 vs controlo, após a adição de um substrato marcado, por exemplo, 2-deoxiglicose (2-DG), um composto estruturalmente muito similar à glicose, cujo importe para dentro da célula é reconhecido normalmente pelos transportadores de glicose (GLUT). Este composto é metabolizado em 2-DG-6-fosfato (2-DG6P) que se acumula nas células que pode ser

detetado a uma absorvância de 412 nm (*Glucose Uptake Assay Kit (Colorimetric)-abcam*).

Nos tempos de exposição à hipóxia investigados, verificou-se a acumulação de HIF 2- α nas células depletadas de ANXA2, mas não nas células controlo, pelo que seria interessante verificar se esta acumulação acontece num tempo de exposição mais longo (> 48h) nas células controlo e qual o seu efeito sob vias de proliferação e sobrevivência como PI3K/AKT, JNK e MAPK/ERK a longo termo.

Seria interessante também repetir novos ensaios de BIAM com células depletadas de ANXA2 e observar o estado de oxidação/redução de proteínas como HIF- α e VEGF ao longo da hipóxia e perceber se de facto estas proteínas podem ser alvo de ANXA2.

Para investigar o mecanismo compensatório de PRDXII em células depletadas de ANXA2, seria necessário por exemplo estabelecer várias linhas de cancro com a depleção de ANXA2, PRDXII ou ambas mediado pelo sistema de shRNA ou mesmo através da eliminação do gene (*knockout*) utilizando um sistema novo que utiliza a enzima cas-9 que cliva a cadeia dupla de DNA eliminando o gene designado por CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*). O aumento de PRDXII nas células MDA MB 231 é evidente na depleção de ANXA2. Nestes mesmos resultados, a acumulação de HIF 1- α diminui quando PRDXII aumenta em células depletadas de ANXA2. Estudar a possível interação entre ANXA2 e PRDXII é também importante, para perceber se estas interagem ou se ligam a alvos semelhantes através de Co-IPs.

5. Conclusão

Vários estudos têm demonstrado níveis elevados de ANXA2 em diversos tipos de cancro que estão positivamente relacionados com a progressão tumoral, resistência a radio e quimioterapia conferindo um mau prognóstico da doença. Contudo são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação de ANXA2 sobretudo o seu papel tumoral que até agora foi pouco estudado.

O crescimento descontrolado de células cancerígenas leva a um afastamento da vasculatura e limitação ao acesso de oxigénio e nutrientes. O stress hipóxico a que estas células estão sujeitas gera por sua vez uma disfunção mitocondrial que leva à produção de radicais livres (ERO). Estas espécies são por sua vez responsáveis pela estabilização do fator mais importante que medeia a resposta hipóxica –HIF.

A função antioxidante de ANXA2 recentemente descrita pelo nosso laboratório levou-nos a investigar o seu papel durante a hipóxia e nas vias de sinalização ativadas por ela, em células cancerígenas e relação com o fator de transcrição (HIF) principal responsável pela resposta hipóxica. Os resultados sugerem que durante a depleção de ANXA2, há uma acumulação mais significativa de HIF 1- α em células HT1080 e MDA MB 231 e de HIF 2- α em células A549.

Também se observou um aumento da expressão de PRDX II em células MDA MB 231 depletadas de ANXA2, no entanto este foi independente dos mecanismos de hipóxia. Um outro mecanismo alterado pela depleção de ANXA2, foi a produção de VEGFD em células A549, um dos principais alvos de HIF- α que conduziu a um resultado inesperado: a depleção de ANXA2 favoreceu a acumulação de VEGFD, mesmo em células não tratadas, comparativamente ao controlo.

Estes resultados demonstram que a hipótese foi comprovada e que as capacidades de ANXA2 vão muito além daquilo que sabemos, sugerindo que a ANXA2 poderá surpreendentemente ter um papel ambíguo atuando como oncogénica sob certas condições mas também supressora de algumas vias.

Os nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento da atividade redox de ANXA2 em células cancerígenas. O desenvolvimento de estratégias de investigação estão a decorrer para validar e desenvolver estes resultados como descrito acima.

O trabalho desenvolvido nesta tese contribuiu para o poster em *Anexo IV* que foi apresentado no segundo congresso internacional da Associação Portuguesa de Investigação em Cancro - ASPIC – IPO, Porto, Portugal a 28 e 29 de Abril de 2016.

“Cancer is only going to be a chapter in my life and not the whole story”

*Joe Wasser
Lymphoma Club*

6. Referências Bibliográficas

1. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* 1996;275(3):62-70. doi:10.1038/scientificamerican0996-62.
2. Weinberg RA. *Biology of the Cancer*. Vol XXXIII. Second Edi. New York and London: Garland Science; 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
3. American Cancer Society A, Society AC. Cancer Facts & Figures 2011. *Am Cancer Soc.* 2011;1(1):1-68. doi:10.3322/caac.20121.
4. Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *J Exp Clin Med.* 2013;5(6):203-209. doi:10.1016/j.jecm.2013.10.009.
5. Tanaka T. Chemoprevention of human cancer: biology and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1997;25(3):139-174. doi:10.1016/S1040-8428(97)00232-1.
6. Dunn BYB, Page S. Solving an age-old problem. *Nature.* 2012;483:6. doi:10.1038/483S2a.
7. David AR, Zimmerman MR. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer.* 2010;10(10):728-733. doi:10.1038/nrc2914.
8. Hejmadi M. *Introduction to Cancer Biology.*; 2006.
9. WHO. Portugal. 2014:2.
10. Liu J, Qu R, Ogura M, Shibata T, Harada H, Hiraoka M. Real-time imaging of hypoxia-inducible factor-1 activity in tumor xenografts. *J Radiat Res.* 2005;46(1):93-102. doi:10.1269/jrr.46.93.
11. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(6):430-439. doi:10.1038/nrc3726.
12. SCHULZ WA. *Molecular Biology of Human Oral Cancer*. Dordrecht: SPRINGER; 2005. <http://cro.sagepub.com/content/7/4/319.short>.
13. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(6):437-447. doi:10.1038/nrc1367.
14. Iyer N V, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998;12(2):149-162. doi:10.1101/gad.12.2.149.
15. Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem.* 2006;387(10-11):1337-1346. doi:10.1515/BC.2006.167.
16. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(14):4587-4602. doi:10.1093/nar/gkp425.
17. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J.* 2008;409(1):19-26. doi:10.1042/BJ20071249.
18. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996;271(45):C1172-C1180.
19. Buemi M, Nostro L, Romeo a, et al. From the oxygen to the organ protection: erythropoietin as protagonist in internal medicine. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2006;4(4):299-311. doi:10.2174/187152506778520754.
20. Semenza GL, Jiang B, Leung SW, et al. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1*. *J Biol Chem.* 1996;271(51):32529-32537.
21. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-732. doi:10.1038/nrc1187.

22. Koh MY, Powis G. Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(9):364-372. doi:10.1016/j.tibs.2012.06.004.
23. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol Cell.* 2010;40(2):294-309. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.022.
24. Lal A, Peters H, St B, et al. Transcriptional Response to Hypoxia in Human Tumors These observations raise the question : which cancer cells adapt to hypoxia and An initial molecular response to hyp- regions within solid tumors is associ- Serial Analysis of Gene Expression HIF-1 Trans. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(17):1337-1343.
25. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):85-95. doi:10.1038/nrc2981.
26. Niu G, Chen X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 2010;11(8):1000-1017. doi:10.2174/138945010791591395.
27. Simon MC. Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):148-150. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.006.
28. Fearon U, Canavan M, Biniecka M, Veale DJ. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):385-397. doi:10.1038/nrrheum.2016.69.
29. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):1171-1177. doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.011.
30. Falkowski PG, Katz ME, Milligan AJ, et al. The Rise of Oxygen over the Past 205 Million Years and the Evolution of Large Placental Mammals. *Science (80-).* 2005;309(5744):2202-2204. doi:10.1126/science.1116047.
31. Glasauer A, Chandel NS. Ros. *Curr Biol.* 2013;23(3):100-102. doi:10.1016/j.cub.2012.12.011.
32. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(6):411-421. doi:10.1038/nrm3801.
33. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):2-10. doi:10.1093/carcin/bgn250.
34. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.* 2003;17(10):1195-1214. doi:10.1096/fj.02-0752rev.
35. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
36. Madureira PA, Waisman DM. Annexin A2: The importance of being redox sensitive. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):3568-3594. doi:10.3390/ijms14023568.
37. L. B. Sullivan NSC. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Handb Free Radicals Form Types Eff.* 2010;2:99-116. doi:10.1186/2049-3002-2-17.
38. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci.* 1999;893:13-18. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x.
39. Ferreira ICFR, Abreu RM V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise.* 2007;2:32-39. https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/2711/1/Publica??o_Nacional_Sres

- s oxidativo.pdf.
40. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):5-23. doi:10.1038/cmi.2014.89.
 41. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479-496. doi:10.3109/10715761003667554.
 42. Madureira PA, Hill R, Miller VA, Giacomantonio C, Lee PWK, Waisman DM. Annexin A2 is a novel cellular redox regulatory protein involved in tumorigenesis. *Oncotarget*. 2011;2(12):1075-1093. doi:10.1002/elps.201100230.
 43. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Semenza GL, Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27975-27981. doi:10.1074/jbc.M204152200.
 44. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25130-25138. doi:10.1074/jbc.M001914200.
 45. Gerald D, Berra E, Frapart YM, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell*. 2004;118(6):781-794. doi:10.1016/j.cell.2004.08.025.
 46. Lara PC, Lloret M, Clavo B, et al. Severe hypoxia induces chemo-resistance in clinical cervical tumors through MVP over-expression. *Radiat Oncol*. 2009;4(29):5. doi:10.1186/1748-717X-4-29.
 47. Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, Eckschlager T. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap*. 2015;159(2):166-177.
 48. Brown JM. The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy - Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 1999;59(23):5863-5870.
 49. Madureira PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MAS, Miller VA, Waisman DM. The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood*. 2011;118(18):4789-4797. doi:10.1182/blood-2011-06-334672.
 50. Bertout JA, Majmundar AJ, Gordan JD, et al. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(34):14391-14396. doi:10.1073/pnas.0907357106.
 51. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. 2014;2(1):535-562. doi:10.1016/j.redox.2014.02.006.
 52. Wall SB, Oh J, Diers AR, Landar A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Front Physiol*. 2012;3(September):1-10. doi:10.3389/fphys.2012.00369.
 53. Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: Thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2004;287(2 56-2):C246-C256. doi:10.1152/ajpcell.00516.2003.
 54. Truong TH, Carroll KS. Redox regulation of epidermal growth factor receptor signaling through cysteine oxidation. *Biochemistry*. 2012;51(50):9954-9965. doi:10.1021/bi301441e.
 55. Castaldo S, Freitas J, Conchinha N, Madureira P. The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2016:17. doi:10.1155/2016/8413032.
 56. Surette AP, Madureira PA, Phipps KD, Miller VA, Svenningsson P, Waisman DM.

- Regulation of fibrinolysis by S100A10 in vivo. *Blood*. 2011;118(11):3172-3181. doi:10.1182/blood-2011-05-353482.
57. Sullivan L, Martinez-Garcia E, Nguyen H, et al. The Proto-oncometabolite Fumarate Binds Glutathione to Amplify ROS-dependent signaling. *Mol Cell*. 2013;51(2):236-248. doi:10.1016/j.molcel.2013.05.003.
 58. Khan MA, Tania M, Zhang DZ, Chen HC. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese J Cancer Res*. 2010;22(2):87-92. doi:10.1007/s11670-010-0087-7.
 59. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999;32(8):595-603. doi:10.1016/S0009-9120(99)00075-2.
 60. Kinnula VL, Pääkkö P, Soini Y. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEBS Lett*. 2004;569(1-3):1-6. doi:10.1016/j.febslet.2004.05.045.
 61. Jin D-Y, Chae HZ, Rhee SG, Jeang K-T. Regulatory Role for a Novel Human Thioredoxin Peroxidase in NF- B Activation. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30952-30961. doi:10.1074/jbc.272.49.30952.
 62. Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30615-30618. doi:10.1074/jbc.272.49.30615.
 63. Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker a F, Gallegos a, Powis G. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys*. 2001;392(1):103-109. doi:10.1006/abbi.2001.2435.
 64. Koo KH, Lee S, Jeong SY, et al. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):312-318. doi:10.1006/abbi.2001.2700.
 65. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:8-13. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.010.
 66. Tripathi BN, Bhatt I, Dietz KJ. Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*. 2009;235(1-4):3-15. doi:10.1007/s00709-009-0032-0.
 67. Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*. 2001;52(1-2):35-41. doi:10.1080/15216540252774748.
 68. Kropotov A, Usmanova N, Serikov V, Zhivotovsky B, Tomilin N. Mitochondrial targeting of human peroxiredoxin V protein and regulation of PRDX5 gene expression by nuclear transcription factors controlling biogenesis of mitochondria. *FEBS J*. 2007;274(22):5804-5814. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06103.x.
 69. McDonald C, Muhlbauer J, Perlmutter G, Taparra K, Phelan SA. Peroxiredoxin proteins protect MCF-7 breast cancer cells from doxorubicin-induced toxicity. *Int J Oncol*. 2014;45(1):219-226. doi:10.3892/ijo.2014.2398.
 70. Stresing V, Baltziskueta E, Rubio N, et al. Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene*. 2012;(February 2012):724-735. doi:10.1038/onc.2012.93.
 71. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.

72. Karimpour S, Lou J, Lin LL, et al. Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene*. 2002;21(41):6317-6327. doi:10.1038/sj.onc.1205749.
73. Moss SE, Morgan RO. Protein family review The annexins. 2004:1-8.
74. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. *Annexin A2 Heterotetramer: Structure and Function*. Vol 14.; 2013. doi:10.3390/ijms14036259.
75. Creutz CE, Pazoles CJ, Pollard HB. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem*. 1978;253(8):2858-2866.
76. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):449-461. doi:10.1038/nrm1661.
77. Gerke V, Moss SE. Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev*. 2002;82:331-371. doi:10.1152/physrev.00030.2001.
78. Gorecka KM, Konopka-Postupolska D, Hennig J, Buchet R, Pikula S. Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(3):868-875. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.181.
79. Gidrol X, Sabelli PA, Fern YS, Kusht AK. Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues AoxyR mutant of *Escherichia coli* from H2O2 stress. *October*. 1996;93(October):11268-11273. doi:10.1073/pnas.93.20.11268.
80. Wang C-Y, Lin C-F. Annexin A2: Its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers*. 2014;2014:10. doi:10.1155/2014/308976.
81. Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem*. 1995;149-150(1):301-322. doi:10.1007/BF01076592.
82. Madureira PA, Hill R, Lee PWK, Waisman DM. Genotoxic Agents Promote the Nuclear Accumulation of Annexin A2: Role of Annexin A2 in Mitigating DNA Damage. *PLoS One*. 2012;7(11). doi:10.1371/journal.pone.0050591.
83. Zhang X, Liu S, Guo C, Zong J, Sun MZ. The association of annexin A2 and cancers. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(9):634-640. doi:10.1007/s12094-012-0855-6.
84. Wang H, Joseph JA. Quantifying Cellular Oxidative Stress By. 1999;27(99):612-616.
85. Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R. ddCt method for qRT – PCR data analysis The ddCt Algorithm. 2014:1-8.
86. Leonard SE, Carroll KS. Chemical “ omics ” approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology. *Curr Opin Chem Biol*. 2011;15(1):88-102. doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.012.
87. Hill BG, Reily C, Oh J, Johnson MS, Landar A. Free Radical Biology & Medicine Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(6):675-683. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.012.
88. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):343-354. doi:10.1038/nrm1366.
89. Li Q, Chen H, Huang X, Costa M. Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1??) and HIF-regulated genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;213(3):245-255. doi:10.1016/j.taap.2005.11.006.
90. Salnikow K, Su W, Blagosklonny M V., Costa M. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res*. 2000;60(13):3375-3378.

- doi:10.1016/j.physe.2011.04.021.
91. Ho VT, Bunn HF. Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;223(1):175-180. doi:10.1006/bbrc.1996.0865.
 92. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11715-11720. doi:10.1073/pnas.95.20.11715.
 93. Li Z, Zhu Q, Hu L, Chen H, Wu Z, Li D. Anterior gradient 2 is a binding stabilizer of hypoxia inducible factor-1alpha that enhances CoCl₂ -induced doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2015;106(8):1041-1049. doi:10.1111/cas.12714.
 94. Galvin I, Drummond GB, Nirmalan M. Distribution of blood flow and ventilation in the lung: Gravity is not the only factor. *Br J Anaesth.* 2007;98(4):420-428. doi:10.1093/bja/aem036.
 95. Sato T, Paquet-Fifield S, Harris NC, et al. Vegf-D promotes pulmonary oedema in hyperoxic acute lung injury. *J Pathol.* 2016;35(5):751-760. doi:10.1002/path.4708.
 96. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031.
 97. Sztatowski T, Nathan C. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991;51(3):794-798. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1846317 \n<http://cancerres.aacrjournals.org/content/51/3/794.full.pdf>.
 98. Ruas JL, Lendahl U, Poellinger L. Modulation of vascular gene expression by hypoxia. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(5):508-514. doi:10.1097/MOL.0b013e3282efe49d.
 99. Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, et al. Regulation of HIF-1alpha Stability through S-Nitrosylation. *Mol Cell.* 2007;26(1):63-74. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.024.
 100. Yasinska IM, Sumbayev V V. S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1 alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2003;549(1-3):105-109. doi:10.1016/S0014-5793(03)00807-X.
 101. Gu J, Milligan J, Huang LE. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha-p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *J Biol Chem.* 2001;276(5):3550-3554. doi:10.1074/jbc.M009522200.
 102. Olson N, van der Vliet A. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide.* 2012;25(2):125-137. doi:10.1016/j.niox.2010.12.010.Interactions.
 103. Tian H, Mcknight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11:72-82. doi:10.1101/gad.11.1.72.
 104. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al. Recruitment of HIF-1 alpha and HIF-2 alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 2006;10(5):413-423. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.026.
 105. Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Induction of Endothelial PAS Domain Protein-1 by Hypoxia: Characterization and Comparison With Hypoxia-Inducible

- Factor-1 □. *Blood*. 1998;92(7):2260-2268.
106. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: Implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem*. 2004;279(15):14871-14878. doi:10.1074/jbc.M400461200.
 107. Iyer S, Acharya KR. Tying the knot: The cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. *FEBS J*. 2011;278(22):4304-4322. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08350.x.
 108. Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc*. 2010;5(4):628-635. doi:10.1038/nprot.2010.6.
 109. Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG. Inactivation of Peroxiredoxin I by Phosphorylation Allows Localized H₂O₂ Accumulation for Cell Signaling. *Cell*. 2010;140(4):517-528. doi:10.1016/j.cell.2010.01.009.
 110. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
 111. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51-56. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009.
 112. Xu XH, Pan W, Kang LH, Feng H, Song YQ. Association of Annexin A2 with cancer development (review). *Oncol Rep*. 2015;33(5):2121-2128. doi:10.3892/or.2015.3837.

Anexo I

Equipamentos

- Microscópio invertido *Primo Vert* (Zeiss)
- Câmara de Fluxo Laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Astec)
- Centrífuga *Himac CT6EL* (Hitachi)
- Centrífuga refrigerada *Heraeus™ Fresco 17 Centrifuge* (Thermo Scientific)
- Banho-maria *SHEL LAB Digital Water Bath* (Seldon MFG Inc.)
- Incubadora *Forma™ Series II Water-Jacketed CO2 Incubators* (Thermo Scientific)
- *Dry Block Thermostat Bio TDB-100* (Biosan)
- *Power Pac™* (Biorad)
- Incubadora *Forma™ Series II Water-Jacketed CO2 Incubators* (Thermo Scientific)
- Espectrofotómetro *NanoDrop2000c* (Thermo-Scientific)
- Agitador de placas VWR® *Mini Blot Mixer*
- Equipamento *ChemiDoc™ XRS* (BioRad)
- Microscópio eletrónico invertido com câmara incorporada *Axio vert 40 CFL* (Zeiss)
- Leitor de microplacas *Infinite® M200* (Tecan)
- Balança analítica *Acculab ALC 210.4* (Sartorius group)

Tabela I. Descrição/composição de géis para SDS-PAGE.

Gel de corrida			Stacking gel	
(acrilamida:bisacrilamida) %	10 %	12%	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)	2 mL	2,4 mL	40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1)	312,5 µl
Água destilada	2,9 mL	2,5 mL	Água destilada	1,8 mL
10 % de SDS	80 µL	80 µL	10 % de SDS	25 µL
25% de Persulfato de Amónia (APS)	32 µL	32 µL	25% de Persulfato de Amónia (APS)	5 µL

Anexo II

Soluções Tampão para SDS-PAGE

10 X Tampão de corrida (stock)

- 250 mM Tris base
- 2.5 M glicina
- 1 % SDS

(A corrida dos géis foi feita com 1x de tampão de corrida)

10 X Tampão de Transferência (stock - sem metanol)

- 250 mM Tris base
- 2 M glicina

(A transferência foi realizada utilizando o tampão mencionado acima a 1x com 20% de metanol por unidade de volume)

4 X loading buffer de proteínas

- 8 % SDS
- 120 mM Tris pH 6.8
- 20 % glicerol
- 0.02 % azul de bromofenol
- 20 % β -mercaptoetanol

20 X TBS

- 400 mM Tris pH7.5
- 2.4 M NaCl

(As soluções de trabalho de TBS-T a 1x (1x TBS + 0.1% tween 20) foram utilizadas para lavar as membranas de nitocelulose).

Tabela II. Descrição/composição dos tampões de lise.

Tampão de Lise	Tampão de Lise para BIAM
50 mM Tris pH 7.5	0.2% Triton X-100
150 mM NaCl,	0.1% Deoxicolato de Sódio
1% NP40	50 mM Tris pH 7.5
5 mM EGTA	150 mM NaCl
0.1% Deoxicolato de Sódio	2 mM EGTA
1:200 <i>cocktail</i> de inibidores de proteases (SIGMA, ref: P2714-1BTL)	1:200 <i>cocktail</i> de inibidores de proteases (SIGMA, ref: P2714-1BTL)
1 mM NaVO ₄	1 mM EDTA
10 mM NaF	10 mM NaF
	2.5 mM NaVO ₄

Anexo III

Composição da solução ECL (enhanced chemiluminescence)

Solução I:

- 20 ml 1 M Tris, pH 8.5 (100 mM Tris pH 8.5)
- 2 ml luminol (2.5 mM luminol)
- 889 µl ácido p-cumárico (360 µM ácido p-cumárico)
- 178 ml H₂O

Solução II:

- 20 ml 1 M Tris, pH 8.5 (100 mM Tris pH 8.5)
- 180 ml H₂O
- 123 µl 30% H₂O₂ (0.0185 % H₂O₂)

(As soluções de trabalho (ECL) foram preparadas com uma diluição de 1:1 das soluções I e II, na ausência de luz).

Soluções stock:


- 250 mM luminol em DMSO
- 90 mM ácido p-cumárico em DMSO
- conservar a 4°C

Químicos:

- p-Coumaric acid - Sigma C-9008
- 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidedione (3-aminophthalhydrazid) = Luminol - Sigma A-8511
- Peróxido de Hidrogénio - Sigma H-1009

Anexo IV

Poster apresentado no segundo congresso internacional da ASPIC – IPO Porto, Portugal, 28 e 29 de Abril de 2016




UAIG
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

The role of annexin A2 in cancer cells during hypoxia

L. Gisela Serrão¹, Fábio Anastácio¹, Patrícia Alexandra Madureira^{1,2}

¹Centre for Biomedical Research (CBMR), University of Algarve, 8005-139 Faro, Portugal
²Department of Biomedical Sciences and Medicine, University of Algarve, 8005-139 Faro, Portugal



CBMR
CENTRE FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Introduction

Solid tumors are often subjected to hypoxia (oxygen deprivation) during their progression, due to increased distance from the vasculature and deficient angiogenesis. Several studies revealed that hypoxic cancer cells typically exhibit increased levels of reactive oxygen species (ROS) compared to non-hypoxic cells. The ROS, H₂O₂ is an important second messenger in cell signaling transduction. Nevertheless excess ROS can cause DNA damage, protein oxidation and lipid peroxidation ultimately leading to cell death or senescence. For this reason REDOX regulation plays a crucial role for cell integrity. We have previously shown that annexin A2 interacts directly and reversibly with H₂O₂ leading to the inactivation of this ROS. We have also shown that annexin A2 antioxidant function plays a crucial role in supporting tumor growth and chemoresistance. With this work we further investigate if annexin A2 plays a role in the REDOX regulation of cancer cells during hypoxia.

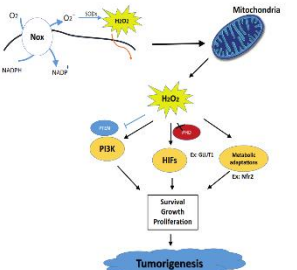


Figure 1. ROS play an important role in tumorigenesis. NADPH oxidases (Nox) and the mitochondria constitute the major sources of ROS in the cell. Intracellular H₂O₂ acts as a second messenger capable of activating a large number of cell signalling pathways that contribute to cancer cell survival, growth and proliferation.

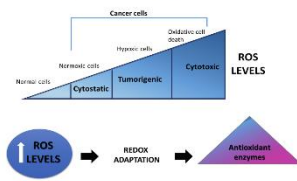


Figure 2. ROS levels within cells. Cancer cells typically have higher levels of ROS compared to normal cells, which can provide them some advantages through the activation of survival and proliferation signaling pathways. However cancer cells have to control oxidative stress otherwise excessive ROS can lead to the oxidation of major cellular components and consequently cause cell death or senescence. For this reason cancer cells undergo a REDOX adaptation by increasing antioxidant enzymes and activating other metabolic pathways in order to keep ROS in a tumorigenic level.

Materials and Methods

In order to achieve our goal we subjected annexin A2 shRNA and control (scramble shRNA) of different cancer cell lines to chemical hypoxia (200 μM CoCl₂) or real hypoxia (1% O₂) for different times and analyzed the activation of hypoxia induced signaling pathways by western blotting. We used 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) reagent to determine the intracellular levels of ROS in hypoxic annexin A2 depleted versus control cancer cells. To investigate the REDOX status of annexin A2 during hypoxia we performed BIAM (biotinylated iodoacetamide) assays. We performed qRT-PCR in MDA MB 231 cells in order to analyse gene expression levels of other antioxidant proteins.

Results

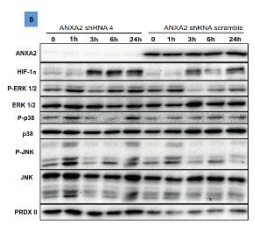


Figure 4. PRDX II gene expression is enhanced in MDA MB 231 cells depleted of annexin A2 compared to control cells. Gene expression levels of Peroxisomal (P) and II (B) in annexin A2 depleted cells (shRNA4) or control cells (shRNA scramble) were analyzed by qRT-PCR. Data is represented as fold change compared to control cells (2^{-ΔΔCT} method was used). 2 independent experiments done in triplicate.

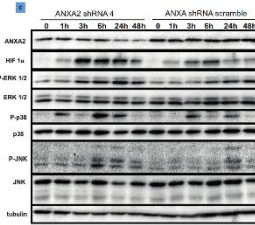


Figure 5. MDA MB 231 cells depleted of annexin A2 accumulate higher levels of ROS in response to chemical hypoxia compared to control cancer cells. Cells treated with MDA MB 231 annexin A2 knockdown (shRNA4) or control (shRNA3) cancer cells were incubated with 200 μM DCF-DA for 30 min and then treated with 200 μM or 400 μM CoCl₂ for 30 min. Fluorescence was measured using a fluorescence plate reader (Excitation: 485 nm; Emission: 520 nm).

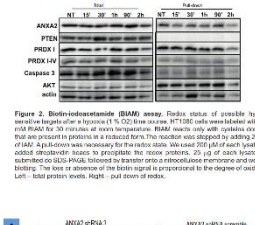


Figure 6. Annexin A2 knockdown cells accumulate higher levels of ROS compared to control cells. A HT1080 and D. A649 annexin A2 knockdown (KD) and control (control) cancer cells were treated with 200 μM or 400 μM CoCl₂ for 30 min. ROS levels were measured using the DCF-DA reagent for 30 min. Fluorescence was measured using a fluorescence plate reader. Exc. 485 nm; Em. 520 nm. Data was processed using the bio-labeled Scatchard tool and represented as $\frac{1}{1 + e^{-x}}$.

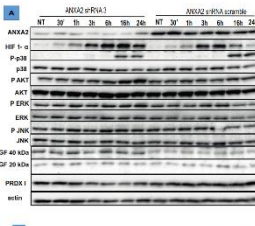




Figure 7. Real hypoxia induces HIF-1α stabilization in HT1080 Annexin A2 depleted cells but MDA MB 231 cells increase Peroxisomal II protein levels and HIF-1α stabilization is not affected. A HT1080 and B. MDA MB 231 cancer cells were treated with a hypoxia inducible (1% O₂) for different time points. (left column) as indicated. Phosphotyrosine were probed, 25 μg of each lysate was submitted to SDS-PAGE followed by transfer into a nitrocellulose membrane and western blotting for the proteins indicated. Left: total protein levels. Right: total protein levels.



UAIG
UNIVERSIDADE DO ALGARVE



CBMR
CENTRE FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Anexo V

Certificado de presença no segundo congresso internacional da ASPIC – IPO Porto, Portugal, 28 e 29 de Abril de 2016



Leonor David, MD, PhD

President of ASPIC

