

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

**Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS GLICOBIOLOGICOS EM AMBIENTES  
HIPÓXICOS E/ OU PRIVADOS DE NUTRIENTES EM CÂNCER DE  
MAMA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICO E  
PROGNÓSTICO**

**Recife**

**2012**

**Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS GLICOBIOLOGICOS EM AMBIENTES  
HIPÓXICOS E/ OU PRIVADOS DE NUTRIENTES EM CÂNCER DE  
MAMA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICO E  
PROGNÓSTICO**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da  
Universidade Federal de Pernambuco, como  
requisito parcial para a obtenção do Título de  
Doutor em Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão - UFPE**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roger Chammas - FM/USP**

**Recife**

**2012**

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

## **Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

### **REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

### **VICE-REITOR(A)**

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

### **PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

### **DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Ângela Maria Isidro Farias

### **VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

### **COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra Suely Lins Galdino

### **VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome: RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo. Título: Avaliação de aspectos glicobiológicos em ambientes hipóxicos e/ou privados de nutrientes em câncer de mama e sua possível aplicação em diagnóstico e prognóstico.

Tese de doutorado apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 26/08/2011

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica-Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra Máira Galdino da Rocha Pitta

Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria do Socorro Mendonça de Cavalcanti

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco (UPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Departamento de Histologia – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

N244c Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo

Avaliação de aspectos glicobiológicos em ambientes hipóxicos e / ou privados de nutrientes em câncer de mama e sua possível aplicação em diagnóstico e prognóstico / Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo. – Recife: O Autor, 2012.

173 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientador: Roger Chammas

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia

1. Mamas – Câncer 2. Histoquímica 3. Lectinas I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Chammas, Roger (coorientador) Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-165

## DEDICATÓRIA

*À Deus e a meus pais Moacir Barreto de Melo Rêgo Junior e Fernanda Maria Vieira da Cunha de Melo Rêgo sem os quais nada na minha vida seria possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao amigo querido e Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pelos 7 anos de convivência e ensinamentos, não apenas os referentes a dosagem de moléculas mais principalmente a de atitudes. Obrigado por tudo! Os passos, que dei em minha vida científica, devo todos a você. Se você ainda tiver paciência comigo gostaria muito que esses anos de convivência se multiplicassem mais e mais.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas por ter me aceitado em seu laboratório de braços abertos por todos os momentos de discussão que tivemos e pelo crescimento incalculável que obtive nesse período que passei no LIM24 – USP-SP.

A Prof. Dra. Suely Lins Galdino, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) grande incentivadora, exemplo de trabalho árduo, obrigado por confiar tanto em mim e me mostrar que ciência é muito mais que as quatro paredes que delimitam um laboratório.

A todos os colegas de trabalho e amigos que fazem parte do grupo de pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) o qual eu tenho orgulho de fazer parte: Juliana G, Juliana XG, Diego, Arthur, Marina, Renato W, Carlos, Ana Rosa, Elizabete, Eduardo, João, Bruno, Renato B, Gilberto, Henrique, Antônio, Paulinha e também aos nossos queridos agregados do IMOBIL: Luiza, Synara, Lúcia, Matheus e Mariana Cabreira.

A Carmel, pela preocupação e pela ajuda em todos os momentos, pelas risadas no laboratório e pelas conversas sérias e descontraídas um beijo enorme!

Os amigos do GACC (USP-SP) que me ensinaram tantas técnicas e que compartilharam de tantos bons momentos e tantos cafés: Lú, Andréia, Rafael, Renata, Silvina, Rodrigo, Tharcísio, Camila, Peki, Guilherme e Karina.

A todos os amigos PPGITEANOS pelos inesquecíveis bons momentos de convívio. Quero em nome de Michel Barboza, que se tornou um grande amigo nessa jornada, agradecer a todos.

A todos da minha família Éssa, Xanda, Caio, Bia, meus padrinhos Fátima e Eduardo, tia Jeane e tia Mana, minhas avôs queridas, Ezinha e Inha, e a minha família de escolha, Victor, Clevinho, Gabi, Petra, Carol, Mirella, Netinho, Cleferson, Amanda, amo vocês.

A Xela e Dôra, me sinto muito orgulhoso em fazer parte dessa família linda, que tanto me ajudou e me deu forças entre um café e outro, amo vocês.

A André Fantini pelas palavras que precisava na hora que precisava, por estar do meu lado nos momentos bons, mas principalmente nos ruins, pela paciência e principalmente pelas risadas, aqui meu muito obrigado.

A Ana, Rose e Maria José, funcionárias da Universidade de São Paulo que tanto contribuíram para o andamento desse trabalho.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, sempre atencioso e disposto a ajudar os alunos.

Aos amigos paulistanos, Leo, Mari, Tati e Daniel, por tudo que fizeram por mim durante minha estada em São Paulo, muito obrigado.

Ao programa institucional de bolsas REUNI de assistência ao ensino da UFPE, a CAPES pela bolsa concedida durante os três anos do doutorado e pela FACEPE pelo auxílio a mobilidade discente que permitiu o desenvolvimento dos experimentos e interação com a USP em São Paulo.

## RESUMO

Rêgo, M. Avaliação de aspectos glicobiológicos em ambientes hipóxicos e /ou privados de nutrientes em câncer de mama e sua possível aplicação em diagnóstico e prognóstico. 2011. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Este trabalho objetivou analisar a expressão de Galectina-1(Gal-1), Galectina-3 (Gal-3) e ligantes de lectinas em ambientes hipóxicos e/ou privados de nutrientes em célula de câncer de mama e em biópsias tumorais. Para modelar o evento *in vitro* a linhagem celular de câncer de mama T47D foi submetida à hipóxia em câmara de hipóxia durante 24, 48 e 72h com ou sem privação de nutrientes. Os grupos controles (normóxia com ou sem nutrientes) foram mantidos em estufa de CO<sub>2</sub>. As biópsias tumorais de carcinoma ductal invasivo (CDI) foram divididas em dois grupos: um positivo e outro negativo para o marcador de hipóxia (CA IX) assim como as biópsias de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) foram divididas em comedônicas/hipóxicas e não-comedônicas/controle, para posterior comparação quanto aos parâmetros clínicos, histopatológicos e glicobiológicos. Os experimentos com T47D mostraram que a expressão de Gal-3 aumenta progressivamente quando submetida à hipóxia e privação de nutrientes durante 24, 48, 72h. As biópsias de CDI positivas para CA IX apresentaram uma marcação nuclear mais intensa que o grupo negativo e características tumorais mais agressivas como invasão linfonodal e ausência de Receptor de estrógeno. Gal-1 não foi expressa pelas células neoplásicas no modelo *in vitro* bem como nas biópsias, onde foi possível detectar positividade nas células do estroma associadas ao tumor. Quanto ao papel da Gal-3 na proteção a morte celular, utilizando-se citometria de fluxo, observou-se que não houve correlação entre a inibição do domínio de reconhecimento a carboidratos da proteína e o aumento de morte celular. Entretanto, foi observada indução a morte para o anticorpo monoclonal M338, específico para o N-terminal de Gal-3, sendo esta marcação aumentada em até três vezes durante o aumento de morte celular em 48h e 72h de hipóxia e privação de nutrientes. A histoquímica com lectinas foi utilizada em amostras de CDIS com Con A, WGA e UEA-I e de CDI com L-PHA e SNA. Nos casos de CDIS as lectinas utilizadas reconheceram mais casos do grupo comedônico (hipóxico) que o não-comedônico. Ao passo que nas biópsias de CDI foi observado um aumento na sialilação assim como nas células T47D (*in vitro*) onde se pode avaliar que esta glicosilação não é de responsabilidade exclusiva de ST6GALNac. Nossos resultados indicam que ocorre uma glicosilação aberrante no ambiente hipóxico *in vitro* e *in vivo* associada a um fenótipo tumoral mais agressivo bem como sugere que Gal-3 participa da proteção contra morte celular e informativa para diagnóstico e prognóstico.

**Palavras-chave:** Galectinas. Glicosilação. Histoquímica com lectinas.

## ABSTRACT

Rêgo, Moacyr. Evaluation of glycobiology aspects in hypoxic environment starved or not of nutrients in breast cancer and its possible application in diagnosis and prognosis. 2011. Thesis (Ph.D.). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

This study aimed to analyze the expression of Galectin-1, Galectin-3 and lectin ligands in hypoxic environments starved or not of nutrients in breast cancer cells and in tumour biopsies. *In vitro* experiments in T47D breast cancer cells were subjected to hypoxia in hypoxia chamber for 24, 48 and 72h with or without nutrients; control groups (in normoxia and nutrients supplied) were kept in CO<sub>2</sub> incubator. Invasive ductal carcinoma (IDC) biopsies were divided into two groups: one positive and one negative for hypoxia marker Carbonic Anhydrase (CA IX); and Ductal Carcinoma *in situ* (DCIS) samples were divided in comedonecrosis/hypoxic or non-comedonecrosis/control groups, and then they were compared to clinical, histopathological and glycobiology aspects. Confocal microscopy, real-time PCR and western blotting showed that Galectin-3 expression was predominantly nuclear and increased progressively when subjected to hypoxia for 24, 48, 72h and nutrient starvation. CDI samples positive for hypoxia marker CA IX presented an intense nuclear staining in comparison to control group besides more aggressive tumour features as node positivines and absence of ER staining. Gal-1 was not expressed by neoplastic cells in cell model and biopsies, where it was possible to detect positivity in tumour-associated stroma. The evaluation of Gal-3 role in cell death protection using flow cytometry showed that there was no correlation between inhibition of Gal-3 carbohydrate recognition domain and the increase in cell death rate. However, it was observed that monoclonal antibody M338, specific to Gal-3 N-terminal, positivity increased with the increasing of dead cells after 48h and 72h under hypoxia and starvation. Lectin histochemistry for Gal-3 ligands or Gal-3-ligant complex preventing carbohydrates were investigated using Con A, WGA, PNA and UEA-I for DCIS and L-PHA, SNA and VVA for CDI. Results indicated that in DCIS the lectins used recognized more intensely the comedogenic/hypoxic group while in CDI samples were observed an increase in sialylation as well as in T47D cells indicating that ST6GALNac is not the only responsible for this event. Our results indicate that aberrant glycosylation occurs in hypoxic environments associated with a high aggressive tumour phenotype providing information of diagnostic and prognostic value. Results also suggest that Gal-3 participates in the protection of cell death by N-terminal and that sialylation in hypoxic environment is not mainly caused by N-glycosylation.

**Key- words:** Galectins. Glycosylation. Lectin Histochemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### *Ilustrações da revisão da literatura*

Figura 01: Processo morfológico da carcinogênese mamária baseado no acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Adaptado de Robbins (2007). 28

Figura 02: Estruturas glicídicas importantes no processo carcinogênico (Figura elaborada pelo autor da tese) 42

### *Ilustrações do artigo 02*

Figura 01: Lectins staining pattern in hypoxic breast DCIS. A) ConA cytoplasmatic, 100x. B) WGA cytoplasmatic, 100x. C) WGA membrane staining in non-hypoxic lesion, 400x D) UEA-I, 100x, staining hypoxic DCIS but not no-hypoxic below (arrow). E) PNA staining in perinecrotic cell of hypoxic DCIS, 100x. F). Gal-3 expression in hypoxic group, arrow indicates absence of staining in a no-hypoxic lesion area. 79

Figura 02: Positive and Negative lesion of DCIS in hypoxic and non-hypoxic group. \*\*  $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  80

### *Ilustrações do artigo 03*

Figura 01: Marcação membranar de CAIX (seta) com N indicando o núcleo necrótico. aumento de 100x 90

Figura 02 Marcação das lectinas e anticorpos utilizados no estudo. A) Marcação de Galectina-1 nas células do estroma associadas ao tumor (setas). B) Anti-gal-3 reconhece intensamente citoplasma e núcleo as setas indicam a marcação nuclear. C) Positividade citoplasmática para lectina SNA. D) L-PHA reconhece membrana(seta) e citoplasma. Figuras A, B e D apresentam um aumento de 100x e figura C: 200x.: 92

Figura 03: Marcadores glicobiologicos no CDI em relação aos grupos de estudo. SNA L-PHA anti-Gal-3 M338 SNA: Aglutinina da *Sambucro nigra*; L-PHA lectina fitoemaglutinina. M338: nome dado ao hibridoma produtor de anticorpo anti-N-terminal de Gal-3 92

#### *Ilustrações do artigo 04*

Figura 01: Análise da expressão e localização celular de Gal-3 por microscopia confocal. As colunas representam as condições de disponibilidade de O<sub>2</sub> e as linhas a privação ou não de nutrientes. No canto superior esquerdo de cada figura está escrito a condição de estudo que a figura representa. Coluna da direita representa 24h da imposição das condições, a coluna central 48h e a da esquerda 72h das mesmas condições. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes. 113

Figura02: Análise da expressão protéica de Gal-3 em hipóxia e privação de nutrientes nos intervalos de 24 e 48h. Em (A) controle para  $\beta$ -actina (B) Aumento da expressão de Gal-3, proporcionalmente em relação à condição de normóxia sendo mais expressa em 48H1. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes. 114

Figura 03: Análise da expressão de transcritos de Gal-3 em hipóxia e privação de nutrientes nos intervalos de 24 e 48h. \*\*  $p < 0.001$  \*\*\*  $p < 0.0001$ . 114

Figura 04: Perfil de sialilação das células T47D submetidas as condições do estudo. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes 115

Figura 05: Análise da expressão dos transcritos de ST6Gal1 em Hipóxia e normóxia combinadas ou não com privação de nutrientes. 117

Figura 06: Ensaio de avaliação de morte celular por incorporação de iodeto de propídio pelas células T47D submetidas a hipóxia e privação de nutrientes nos períodos de 24h e 48h. N: normóxia, H: Hipóxia, LAC: Lactose, SAC: Sacarose, M338: anticorpo monoclonal anti-Gal-3. 118

## LISTA DE TABELAS

### *Tabela da revisão da literatura*

Tabela 01: Parâmetros e significados da classificação TNM em câncer de mama.	30
--	----

### *Tabela do artigo 03:*

Tabela 01: Parâmetros de uso dos anticorpos na Imunohistoquímica	87
--	----

Tabela 02: Características clínico-histopatológicas dos grupos positivos negativos para marcadores de hipóxia	89
---	----

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACAT	Antígenos de Carboidratos Associados a Tumor
APS	Persulfato de amônio, do inglês ammonium persulfate
APB	Tampão fosfato alcalino, do inglês <i>Alkaline Phosphate Buffer</i>
BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i>
CA IX	Anidrase carbônica IX, do inglês <i>Carbonic Anhydrase IX</i>
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
cDNA	DNA complementar
CK	Citoqueratina, do inglês cytokeratin
CRD	Domínio de Ligação a Carboidratos, do inglês <i>Carbohydrate recognition domain</i>
CISH	Hiridização <i>in situ</i> cromógena
Con A	Concanavalina A
DAB	Diaminobezidina
DAPI	Diamino fenil-indol, do inglês <i>Diamidine Phenyl Indole</i>
DBA	Lectna <i>Dolichos biflorus</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal, do inglês <i>Epidermal Growth factor receptor</i>

FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente, do inglês <i>fluorescent in situ hybridization</i>
Gal-1	Galectina 1
Gal-3	Galectina 3
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-glicosamina
GLUT	Transportador de Glicose, do inglês <i>Glucose transporter</i>
HER-2	Receptor de Crescimento Epidermal-2, do inglês <i>Human epidermal receptor-2</i>
HEPES	Ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico do inglês <i>Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid</i>
HIF	Fator Induzido por Hipóxia, do inglês <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HRE	Elementos responsivos a hipóxia, <i>Hypoxic responsible elements</i>
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LacNac	N-acetil-lactosamina
LAMP	Proteína Associada à Membrana Lisossomal
L-PHA	Do inglês, Phytohemagglutinin-L
MHC	Complexo Principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility complex</i>
MMP	Metaloproteinases de Matriz, do inglês <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MUC2	Mucina do tipo 2
NK	Matadoras naturais do inglês <i>Natural Killers</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>

PHD	Prolil-hidroxilase
PI	Iodeto de propídeo
PMSF	Fenil metilsulfonil fluorido, do inglês <i>phenylmethyldulfonyl fluoride</i>
PNA	( <i>Peanut Agglutinin</i> ) lectina de amendoim
PVDF	Polivinil difluorido
RT-PCR	PCR em Tempo Real
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Meio de cultura Rose Park Memorial Institute
RP	Receptor de Progesterona
SDS-PAGE	Eletroforese por gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
shRNA	Short harping RNA
SNA	Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i>
ST6Gal1	$\beta$ -galactosideo $\alpha$ -2,6-sialiltransferase 1
ST6GalNac	$\alpha$ -N-acetilgalactosamina $\alpha$ -2,6-sialiltransferase
T	Antígeno T, do inglês, Thomsen- Friedenreich Antigen
TBE	Solução de Tris-Ácido Bórico e EDTA
TBS	Tampão Tris-salino
TEMED	Tetra metileno diamina
TMA	Microarranjo de tecido
Tn	Antígeno T sem a galactose apenas a N-acetilgalactosamina
TNM	Classificação de acordo com Tamanho, estatus Nodal e Metástase do tumor
TTF-1	Fator de Transcrição da Tireóide

VEGF	Fator de Crescimento Epidermal Vascular, do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
UEA-I	lectina <i>Ulex europaeus</i> I
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer
5-FLU	5-Fluoruracil
WGA	(Wheat Germ Agglutinin) Lectina de gérmen de trigo

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
2	<b>OBJETIVOS</b>	22
2.1	<b>Geral</b>	22
2.2	<b>Específicos</b>	22
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	23
3.1	<b>Considerações gerais sobre câncer</b>	23
3.2	<b>A mama e o câncer de mama</b>	26
3.3	<b>A Hipóxia e suas implicações no comportamento tumoral</b>	32
3.4	<b>Glicosilação alterada no câncer</b>	35
3.4.1	<i>O-glicosilação e formação de antígenos truncados</i>	36
3.4.2	<i>N-glicosilação e glicosilação aberrante</i>	38
3.4.3	<i>Antígenos Carboidratos associados a tumor</i>	41
3.5	<b>Galectinas</b>	43
3.5.1	<i>Considerações sobre galectinas e aspectos neoplásicos</i>	43
3.5.2	<i>Galectina 3</i>	46
3.5.3	<i>Galectina 1</i>	49
3.6	<b>Lectinas em Histoquímica</b>	51
4	<b>RESULTADOS</b>	54
4.1	<b>Hypoxic regions on breast cancer diagnosis: How to evaluate these areas to improve therapeutic conduct?</b>	54
4.2	<b>Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma <i>in situ</i></b>	64
4.3	<b>Glycobiologic profile is altered in breast cancer patients with hypoxic regions: implications in diagnosis, prognosis and tumor behavior</b>	81

<b>4.4</b>	<b>Avaliação de aspectos glicobiológicos no microambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes do câncer de mama em um modelo in vitro</b>	<b>102</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>130</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer, também denominado como neoplasia ou tumor maligno, é uma doença que pode acometer virtualmente qualquer tecido, levando ao crescimento celular, invasão e destruição de tecidos adjacentes, com possível migração das células transformadas para diferentes tecidos do organismo (metástase). Nesse contexto o câncer de mama recebe destaque, sendo a neoplasia que apresenta as maiores taxas de morbi/mortalidade de mulheres no Brasil (INCA, 2010) e no mundo (WHO, 2010).

Como na maioria dos tumores sólidos, as neoplasias mamárias possuem regiões centrais que não são irrigadas adequadamente e eventualmente formam núcleos necróticos. O fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é o principal modulador dessa condição e é descrito como uma proteína produzida constitutivamente e cujo acúmulo é estimulado pela baixa disponibilidade de oxigênio, que ocorre normalmente há uma distância maior que 180 $\mu$ m do vaso sanguíneo (RUAN *et al*, 2008).

HIF-1 $\alpha$  está relacionada à progressão tumoral e angiogênese, participando do controle da expressão de uma variedade de genes envolvidos na adaptação à deficiência de oxigênio e nutrientes que levam à sobrevivência celular, inibição da apoptose e indução de migração (POWIS & KIRKPATRICK 2004; SEMENZA 2003). Entre eles estão VEGF (*vascular endothelial growth factor* – fator de crescimento endotelial vascular), CAIX (Carbonic Anhydrase IX – Anidrase Carbônica – IX) e GLUT1 (Glucose Transporter 1 – Transportador de Glicose 1). Estes genes são cruciais no processo de adaptação celular que ocorre pela alteração do metabolismo

energético destas células, as quais passam a apresentar altas taxas de glicólise anaeróbica (CHEN *et al*, 2010).

Essa mudança no perfil metabólico é acompanhada não apenas da expressão alterada das enzimas envolvidas na glicólise aeróbica e anaeróbica, mas também na síntese de açúcares-nucleotídeo e transportadores de carboidratos (SHIRATO *et al*, 2010). Essas alterações aumentam o número de moléculas desviadas da via glicolítica para via das hexoaminas e ciclo da N-acetil-glucosamina alterando componentes chaves da glicosilação celular como, por exemplo, a disponibilidade de substrato para as glicosiltransferases (TANIGUSHI, 2009).

A hipóxia, além de induzir a expressão de moléculas de adaptação e alterar o comportamento celular, também está relacionada com a expressão de outra proteína intrigante e de múltiplos papéis, a Galectina-3 (Gal-3) que parece ter um papel pró-neoplásico nesse ambiente (OLBRYT *et al*, 2006; ZENG *et al*, 2007). Já a Galectina-1 (Gal-1) é expressa principalmente nas células do estroma associadas ao tumor e seu principal papel é promover um privilégio imune tumoral bloqueando a atividade citotóxica mediada por células T (LE *et al*, 2005). As Galectinas 1 e 3 reconhecem resíduos de N-acetil-lactosamina que se encontram alterados durante a carcinogênese (CUMMINGS & LIU *et al*, 2009).

Nos processos neoplásicos tanto a N- quanto a O-glicosilação encontram-se diferencialmente reguladas. No primeiro processo ocorre glicosilação aberrante associada ao aumento dos resíduos de N-acetil-lactosamina que podem, posteriormente, ser fucosilados e/ou sialilados (KIM & VARKI, 1997). Já na O-glicosilação ocorre a formação de antígenos truncados, pois há uma diminuição na atividade das enzimas envolvidas nesse tipo de glicosilação (VARKI *et al*, 2009). A

formação de antígenos truncados e a glicosilação aberrante estão associados à progressão tumoral, facilitando a não adesão e migração celular bem como metástase e angiogênese (DENNIS *et al*, 1999; VARKI *et al*, 2009). Contudo, esse perfil alterado de carboidratos revela informações importantes do comportamento tumoral, capazes de serem utilizadas na avaliação diagnóstica e prognóstica do paciente.

Lectinas exógenas, assim como as galectinas, possuem sítios de reconhecimento a carboidratos e quando conjugadas a peroxidase, biotina, éster de acridina tornam-se sondas reveladoras dessa glicosilação alterada no câncer fornecendo dados de valor diagnóstico e prognóstico (CAMPOS *et al*, 2006). Esse papel biotecnológico das lectinas já foi explorado em diversos tipos de tumores em tecidos humanos de mama (BELTRÃO *et al* 2003, RÊGO *et al*, 2010) de próstata (LIMA *et al*, 2010) entr outros (SOBRAL *et al*, 2010).

Todavia, muito pouco se sabe sobre os aspectos glicobiológicos no ambiente hipóxico do câncer de mama. Desta forma a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a expressão de Gal-1 e Gal-3 bem como o perfil de carboidratos no ambiente hipóxico do câncer de mama, para melhor avaliar a importância dessas moléculas para o tumor nesse ambiente frequentemente indutivo de químico e rádio resistência. Outro objetivo foi avaliar o valor diagnóstico e prognóstico da marcação de Gal-1, Gal-3 e do perfil de carboidratos nas áreas hipóxicas de biópsias de carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma ductal *in situ* (CDIS) de mama.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar glicobiologicamente o ambiente hipóxico do câncer de mama através da análise de expressão de Gal-3 e Gal-1 e seus ligantes *in vitro* bem como avaliar a aplicação diagnóstica e prognóstica das moléculas envolvidas nesses ambientes em amostras tumorais.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de Gal-1, Gal-3 e ST6Gal1 e o perfil de carboidratos em linhagem celular de câncer submetida a hipóxia e/ou privação de nutrientes;
- Analisar *in vitro* o padrão de compartimentalização intracelular de Gal-1 e Gal-3 em ambientes hipóxicos e/ou privados de nutrientes;
- Analisar nas células T47D a morte celular induzida por Gal-3 em ambiente hipóxicos e/ou privado de nutrientes;
- Examinar a expressão de Gal-1, Gal-3 e ligantes de lectinas em amostras de Carcinoma Ductal *In situ* comparando os com necrose central e sem necrose central;
- Avaliar o valor diagnóstico e prognósticos de Gal-1, Gal-3 e ligantes de lectinas no ambiente hipóxico em amostras de pacientes portadoras de Carcinoma Ductal Invasivo.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Considerações Gerais sobre câncer

O câncer é definido como um grupo de doenças caracterizado por um crescimento descontrolado de células anormais (INCA, 2010). No mundo desenvolvido, o câncer é uma das principais causas de morte, geralmente excedido apenas por doença cardiovascular (De Meija *et al*, 2003). Segundo a União Internacional de Combate ao Câncer (UICC), em 2020, o câncer será a doença que matará mais pessoas no mundo sendo 3 milhões no primeiro mundo e 7 nos países de terceiro mundo (UICC, 2005). Como o número de pessoas diagnosticadas com câncer, dentro dos próximos 30 anos, é esperado dobrar, a necessidade de terapias médicas inovadoras e mais eficientes torna-se cada vez mais proeminentes.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer (INCA, 2010). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão no sexo masculino, os cânceres de próstata e de pulmão, e no sexo feminino, os cânceres de mama e de colo do útero, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2010). No mundo, em 2011, serão dignosticados 12.7 milhões de novos casos de câncer e 7.6 milhões de mortes, sendo o câncer de mama mais freqüente entre as mulheres e o de pulmão nos homens (FERLAY *et al*, 2010)

A carcinogênese inicia-se à partir de uma alteração do DNA celular ou da atividade anormal de genes presentes em células sadias, como os que coordenam a proliferação, a diferenciação, a morte celular por apoptose e outras funções

primordiais para a célula (CONDE *et al*, 2005). Essa alteração no DNA leva a mudanças na expressão de proteínas celulares causando alterações nas vias de sinalização, induzindo, frequentemente, mudanças no microambiente tumoral, como inflamação, o que resulta em mudanças no perfil das proteínas teciduais que podem ser secretadas (KOPF & ZHARHARY, 2007).

O desenvolvimento do câncer segue um processo de múltiplos estágios, a partir da célula normal e é caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e diferenciação celular, ou seja, células normais passam a serem hiperplásicas ou displásicas que podem se transformar em um câncer localizado e talvez, posteriormente, metastatizar (PETERSON *et al*, 2005). Inicialmente alterações nesses processos podem levar a formação de um tumor benigno ou maligno. O que leva a malignidade no câncer é sua habilidade em quebrar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras teciduais adjacentes e metastatizar para órgãos distantes (INGBER, 2008).

Células de um mesmo tumor tendem a ser heterogêneas com relação a sua capacidade proliferativa ou metastatizante, quantidade de receptores de superfície, sensibilidade à resposta imunológica ou tratamento e grau de autonomia do crescimento (HENG *et al*, 2009). Essa heterogeneidade genotípica e fenotípica são elementos-chave na progressão do tumor e sua resistência às drogas (HENG *et al*, 2009).

Há onze anos Hanahan e Weinberg (2000) propuseram seis características intrínsecas do câncer: 1- sustentação do sinal de proliferação; 2- fuga dos supressores de crescimento; 3- resistência à morte celular; 4- potencial replicativo ilimitado; 5- indução de angiogênese; 6- invasão e metástase. Juntas elas constituem

um princípio de organização que fornece uma estrutura lógica para compreender a diversidade de neoplasias.

Implícita nessa discussão estava a noção de como as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico. Elas adquirem uma sucessão dessas características dentro do processo de várias etapas de patogênese tumoral humana podendo ser racionalizada pela necessidade incipiente das células cancerosas de adquirirem as características que lhes permitam tornar-se tumorigênicas e, finalmente, malignas (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Porém após 10 anos de estudos em oncologia os mesmos autores em publicação recente (HANAHAN & WEINBERG, 2011) acrescentaram mais algumas características principalmente em relação ao microambiente que cerca o tumor e o papel das células não-neoplásicas na carcinogênese. Subjacente as características descritas há dez anos estão a instabilidade do genoma, o que gera a diversidade genética que acelera a aquisição do fenótipo tumoral, e inflamação, que promove múltiplas funções em todas as características anteriormente estabelecidas (HANAHAN & WEINBERG 2000).

O progresso conceitual da carcinogênese na última década acrescentou dois eventos emergentes, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imunológico. Além de células cancerosas, os tumores apresentam outra dimensão de complexidade: eles contém um repertório de células normais, recrutadas pelas células neoplásicas, que aparentemente contribuem para a aquisição das características tumorais, criando o microambiente favorável ao tumor (PIETRAS & OSTMAN, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

### 3.2 A mama e o Câncer de Mama

A glândula mamária é constituída por 6 a 10 sistemas ductais principais, cada um dos quais é subdividido em lóbulos (GURAY & SAHIN, 2006). Os lóbulos, dotados de células produtoras de leite, e os ductos, descritos como minúsculos tubos conectores que carregam o leite dos lóbulos até o mamilo, estão inseridos em tecidos adiposo e conectivo (estroma), altamente responsivo a hormônios, juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos (YODER, 2007).

Doenças na mama, tanto benignas como malignas, são comuns em mulheres. Dentre essas, tem destaque os tumores mamários que são definidos como uma massa anormal de tecido que surge de alteração ou dano genético na célula, deixando-a com potencial replicativo desregulado (NCI, 2011).

Os tumores podem ser classificados em benignos e malignos de acordo com o potencial de invasividade e de desenvolver metástase. Tumores benignos crescem como massas expansivas coesas que permanecem restritas ao local de origem e não tem capacidade de infiltração, invasão ou metástase (MEISNER; FEKRAZAD; ROYCE, 2008).

O câncer de tecido mamário é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A incidência de câncer no Brasil vem aumentando a cada ano, cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2010). Este câncer ocupa o primeiro lugar em incidência nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, na proporção de 22,84%, 24,14% e 23,83%, respectivamente (INCA, 2010). No Brasil, o número de novos casos esperado em 2010 e 2011 é de 49.240 (cada ano), com um risco estimado de 49 casos a cada

100 mil mulheres (INCA, 2010). Parte desse aumento na incidência deve-se a métodos mais sensíveis de avaliação/diagnóstico como a mamografia digital e a ressonância magnética de imagem as quais tem proporcionado um aumento progressivo no diagnóstico de carcinomas ductais *in situ* e invasivos, contudo as descobertas ou estabelecimento de novos tratamentos não acompanham esse aumento de incidência (GREENWALD, 2007).

Calcula-se que no ano de 1997 surgiram quase 250 mil novos casos de câncer e cerca de 100 mil pessoas morreram naquele ano, vitimadas por esta doença (INCA, 2009). Apesar do aumento da incidência no Brasil e em outros países, os grandes estudos internacionais mostram que a maior eficiência nos programas de rastreamento, a melhor definição das imagens ao diagnóstico e o uso adequado de terapias medicamentosas adjuvantes, vem melhorando a sobrevida das pacientes nas últimas décadas (SMIGAL *et al*, 2006).

Dentre os tumores malignos de mama, o carcinoma ductal invasivo representa o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários (YODER *et al*, 2007). O quadro morfológico desse carcinoma é bastante heterogêneo, tendo sido caracterizadas algumas variáveis como fatores histológicos e nucleares que podem ser originados dos dois prováveis tipos de carcinogênese mamária. Um desses modelos baseia-se nas células tronco multipotentes que podem progredir para um fenótipo agressivo sem passar por estágios intermediários (MELCHOR & BENITZ, 2008). Já o segundo baseia-se no acúmulo de mutações que geram hiperplasias atípicas, carcinomas *in situ* e então carcinoma invasivo (Figura 01).

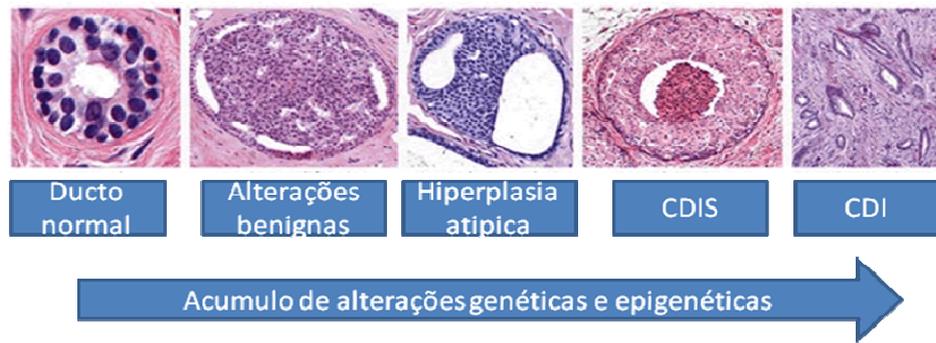


Figura 01: Processo morfológico de carcinogênese mamária baseado no acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Adaptado de Robbins (2007).

Essa heterogeneidade torna-se explícita quando indivíduos com o mesmo estágio da doença e diagnósticos semelhantes podem ter cursos clínicos muito diferentes (Lajos, 2008) mesmo quando submetidos ao mesmo tratamento. Na tentativa de criar grupos clínicos mais homogêneos a União Internacional de Combate ao câncer (UICC), junto com as agências de saúde de vários países estabeleceram uma classificação internacional denominada TNM (GREENE *et al*, 2002; INCA, 2010).

A classificação TNM objetiva ajudar o médico no planejamento do tratamento; dar alguma indicação do prognóstico; ajudar na avaliação dos resultados de tratamento; facilitar a troca de informações entre os centros de tratamento e contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer humano (GREENE *et al*, 2002; INCA, 2010). O Sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença tem por base a avaliação de três componentes: T - a extensão do tumor primário, N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, M - a ausência ou presença de metástase à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna, assim tem-se: T0, T1, T2, T3,

T4 N0, N1, N2, N3, M0 e M1. Quando a classificação TNM é baseada em achados histopatológicos então é chamada de pTNM (GREENE *et al*, 2002; INCA, 2010). Cada tumor maligno possui particularidades em sua classificação, sendo as das neoplasias mamárias resumidas na tabela 01.

Entretanto, com a evolução da identificação de biomarcadores preditivos de tratamento e de valor diagnóstico e prognóstico, associados ao câncer de mama, surgiu a necessidade de criar grupos clínicos mais homogêneos para padronização de protocolo terapêutico baseado nesses marcadores. Com esse intuito, Perou e colaboradores (2000) utilizando a técnica de expressão gênica de microarranjos de DNA complementar (cDNA), representando 8.102 genes humanos demonstraram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama estava associada a uma diversidade na expressão gênica que poderia ser agrupada em subtipos clínicos (PEROU *et al*, 2000).

Com base nesse estudo, pesquisadores do mesmo grupo definiram a classificação molecular do carcinoma de mama, dividindo os tipos em cinco grandes grupos baseados na expressão gênica (SORLIE *et al*, 2001). Mais importante do que isto foi que esta classificação se mostrou de valor prognóstico e validava comportamentos clínicos bem conhecidos. Estes tipos foram chamados de Luminais (A e B), super-expressores de HER-2 (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal 2), subtipo-Basal (*basal-like*) e triplo Negativo.

Tabela 01: Parâmetros e significados da classificação TNM em câncer de mama.

Parâmetro	Significado
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão. T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (por exemplo, por terem sido previamente removidos)
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)
N3	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s)
MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

T: extensão do tumor primário; N: ausência ou presença e extensão de metástase em linfonodos regionais; M: ausência ou presença de metástase à distância. \*cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia). Fonte: INCA

Os tumores luminais representam 45% dos tumores de mama e menos de 20% deles apresentam a proteína p53 mutada (SOTIRIOU *et al*, 2003). Os luminais A apresentam, além da expressão de Receptor de Estrógeno (RE), podem ou não apresentar positividade do Receptor de Progesterona (RP), expressam as

citoqueratinas (CK) e têm expressão negativa para HER-2 (NIELSEN *et al*, 2004). São tumores que costumam apresentar baixa expressão de Ki-67 e um baixo índice mitótico. São tumores usualmente de baixo grau histológico, bem diferenciados e com poucas mitoses.

O grupo luminal B tem também o mesmo padrão de expressão de RE, RP, CK, mas co-expressam os genes ligados à proliferação celular, podendo apresentar alta expressão de Ki-67 e alto índice mitótico. Podem apresentar a expressão de HER-2, embora ocorram casos com expressão negativa (BRENTON *et al*, 2005).

Os tumores super-expressores de HER-2 são aqueles que invariavelmente têm a reação imunohistoquímica (IHQ) positiva para HER-2 e que, ao ter seu estado gênico avaliado por testes de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ou cromogênica (CISH) apresentam amplificação do número de cópias deste gene e apresentam expressão negativa do RE e do RP (BRENTON *et al*, 2005). Correspondem a cerca de 20-25% dos carcinomas de mama. Não há associação entre este subtipo com idade, raça ou outros fatores de risco (CAREY *et al*, 2006).

Os carcinomas mamários que super-expressam HER-2 têm um comportamento biológico agressivo, o que resulta em uma taxa de recorrência após o tratamento inicial, uma sobrevida livre de doença curta e um pior prognóstico, além disso, este grupo de tumores costuma apresentar maior probabilidade de metástase cerebral (BRENTON *et al*, 2005).

O subtipo basal representa 15% dos tumores de mama. Não expressa ou tem baixa expressão de receptores hormonais (RE/RP) e HER-2 e expressa proteínas comumente presentes nas células progenitoras ou células basais/luminais. Embora

apresente negatividade para os três marcadores, há tipos histológicos que são triplo-negativos, mas não são basais (HAUPT *et al.*, 2010).

O câncer de mama triplo-negativo apresenta características patológicas e moleculares únicas. Este termo refere-se à classificação IHQ dos tumores de mama aonde não se observa a expressão de RE, RP e HER-2 (NIELSEN *et al.*, 2004). A maioria dos estudos publicados mostra, além dos dados acima, que este grupo de tumores apresenta expressão negativa de p-caderina e de p63, expressão positiva de HER-1, expressão positiva das CK, expressão positiva de c-kit e da vimentina (RAKHA *et al.*, 2009). Carey e colaboradores (2006) mostraram que os tumores triplo-negativos se associam a um perfil tumoral mais agressivo.

### **3.3 A Hipóxia e suas Implicações no Comportamento Tumoral**

A hipóxia através do fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é reconhecido como uma das mais importantes influências do microambiente no comportamento tumoral fazendo com que as células tumorais adquiram um fenótipo mais agressivo e se tornem resistentes à quimioterapia e radioterapia (RUAN *et al.*, 2009). HIF-1 $\alpha$  é transcrito continuamente, em níveis normais de oxigênio, contudo é mantido em níveis muito baixos por uma rápida degradação via sistema ubiquitina-proteossoma. Em sua via de degradação induzida por concentrações normais de oxigênio, a proteína HIF-1 $\alpha$  é hidroxilada em dois resíduos específicos de prolina (Pro402 e Pro564) na região amino do domínio de ativação da transcrição por uma prolil-4-hidroxilase (PHD-1, 2 e 3) dependente de oxigênio, 2-oxoglutarato e ascorbato, por isso não há seu acúmulo em condições normais de oxigênio nas células (PUGH *et*

*al*, 2001). Esta sinalização promove reconhecimento pela proteína de von Hippel-Lindau, que se liga diretamente ao HIF-1 $\alpha$ , recrutando o complexo ubiquitinante para degradação da proteína pela via do proteossomo 26S (MAXWELL *et al*, 2001).

Um segundo mecanismo regulatório envolve a hidroxilação da asparagina 803 por uma asparaginil hidroxilase dependente de oxigênio que impede a interação entre HIF-1 $\alpha$  e seus co-ativadores (LANDO *et al*, 2002). Em hipóxia HIF-1 $\alpha$  não é modificado o que resulta em sua estabilização e translocação para o núcleo, onde ocorre a dimerização com HIF-1 $\beta$  formando o fator de transcrição ativo capaz de ligar a HRE (*hypoxia responsive elements* - elementos de resposta a hipóxia) presente na região promotora de genes alvo (MAXWELL *et al*, 2001).

A geração do ambiente hipóxico intratumoral promove adaptações pelas células neoplásicas que alteram seu perfil de transcrição e expressão gênicas para adaptar-se ao ambiente mais hostil tornando-as mais agressivas (RUAN *et al*, 2009). Estudos recentes descrevem alguns problemas causados pela hipóxia, tais como o comprometimento da entrega das drogas principalmente na imunoterapia que utiliza moléculas grandes (LEE & TANNOC, 2010) e um defeito na captação da droga pela célula causada por uma acidez tumoral associada à hipóxia (COSSE & MICHIELS, 2008).

Em outros casos o papel de HIF-1 $\alpha$  é determinante e alguns desses mecanismos foram desvendados, como por exemplo, o *knockdown* de HIF-1 $\alpha$  nas células MCF-7 de câncer de mama mostrou tornar essas células consideravelmente mais sensíveis ao tratamento com Metotrexato (LI *et al*, 2006) e o silenciamento estável de HIF-1 $\alpha$  reverte a proteção induzida por hipóxia contra a apoptose

induzida por Paclitaxel nas células MDA-MB-231 (LIONEL *et al*, 2010). Hipóxia também pode induzir resistência à radioterapia pela necessidade da presença de oxigênio e quimioterapia por modificação de expressão gênica (RUAN *et al*, 2009).

Por HIF-1 $\alpha$  ter uma expressão constitutiva, as moléculas que modulam a expressão dele adquirem um papel central no fornecimento de informações diagnósticas, prognósticas e preditivas. Em estudo recente, Fox e colaboradores (2011) analisaram a expressão das 3-prolil hidroxilases em 211 pacientes através de microarranjos de tecidos e correlacionaram com marcadores de hipóxia HIF, VEGF, CA IX onde foi observado que todas as enzimas foram mais expressas no tratamento com Epirrubicina e Tamoxifeno, mas não tiveram associação com resposta ao tratamento e sobrevida (FOX *et al*, 2011).

A hipóxia pode também induzir as células de câncer de mama a adquirir um fenótipo tipo basal e induzir a transição epitélio-mesenquímica ambos associados à um pior prognóstico (CANNITO *et al*, 2008). Alguns pacientes de câncer de mama que recebem tratamento anti-angiogênico com inibidores de VEGF apresentam aumento na metástase, possivelmente como um resultado da indução de hipóxia (LOGES *et al*, 2009; VOSS *et al*, 2011).

Em estudo recente Voss e colaboradores (2011) comprovaram que citocinas e quimiocinas também estão envolvidas nesse processo através de um padrão diferenciado de expressão dessas moléculas em tumores luminais e não-luminais. Através da observação que o meio condicionado das células hipóxicas induz migração de células em normóxia envolvendo a liberação e ação autócrina de mediadores solúveis, os autores concluem que esse mecanismo pode explicar

porque o tratamento anti-angiogênico pode piorar o curso clínico de alguns pacientes.

HIF-1 $\alpha$  influencia também um dos principais fatores diagnóstico e terapêuticos do câncer de mama o Receptor de Estrógeno (RE) induzindo sua degradação em hipóxia via proteossomo, bem como diminuindo sua transcrição, por diminuir o recrutamento da RNAPol II na região promotora do loco ESR1 (RYU *et al*, 2011). Esse mecanismo pode facilitar a insensibilidade ao hormônio no microambiente tumoral.

HIF-1 $\alpha$  possui diferentes variantes de mRNA produzidos por *splicing* alternativo e uma variante, a HIF-1 $\alpha$  TAG, possui valor diagnóstico e prognóstico em câncer de mama associada com linfonodo positivo, grau histológico elevado, receptores hormonais negativos assim como baixo tempo livre de metástase (DALE *et al*, 2010). Apesar do papel central da hipóxia na modulação do comportamento tumoral, muito pouco se sabe dos aspectos glicobiológicos, incluindo o papel da glicosilação e das galectinas envolvidos nesse processo (SHIRATO *et al*, 2010).

### **3.4 Glicosilação Alterada no Câncer**

A glicosilação é uma modificação pós-traducional bastante comum e corresponde a uma ligação covalente de um carboidrato a um lipídeo ou proteína catalisada por glicosiltransferases utilizando doadores de açúcares específicos como substratos. Alterações nesse processo estão associadas com muitos eventos normais e patológicos, tais como interação parasita-hospedeiro, diferenciação,

migração, tráfego celular, sinalização, invasão e metástase (VARKI & SHARON, 2009).

Glicosilação aberrante é um fenômeno universal das células cancerosas e pode ser alterada de várias maneiras gerando estruturas de glicanos que funcionam como marcadores que podem ser utilizados para diagnóstico e tratamento (STANLEY *et al*, 2009). Perda ou expressão excessiva de certas estruturas, persistência de uma estrutura truncada ou incompleta, acúmulo de percussores, e menos comumente, o surgimento de novas estruturas, todas estas alterações são decorrentes da instalação do tumor, entretanto, apenas poucas alterações estão sabidamente envolvidas na transformação maligna e na progressão tumoral (VARKI *et al*, 2009).

Existem dois tipos mais importantes de glicosilação celular que respondem de maneiras diferentes ao processo carcinogênico. São elas a O- e N-glicosilação que frequentemente co-existem em proteínas de mesmas células (BROCKHAUSEN *et al*, 2009; STANLEY *et al*, 2009).

#### *3.4.1 O-Glicosilação e Formação de Antígenos Truncados*

A O-glicosilação é uma modificação covalente onde resíduos de carboidratos são ligados a uma hidroxila (-OH) de uma serina ou treonina via N-acetil-galactosamina de uma glicoproteína nascente (BROCKHAUSEN *et al*, 2009). As proteínas altamente O-glicosiladas são as mucinas ou proteínas tipo-mucinas (*mucine-like proteins*) onde os carboidratos podem corresponder a 80% de sua

massa molecular. Estas proteínas são amplamente encontradas na superfície de células, secreções mucosas e fluídos corporais (HATTRUP & GENDLER, 2008).

A síntese de O-glicanos envolve muitas glicosiltransferases, enzimas que adicionam carboidratos em lipídeos e proteínas, formando quatro estruturas principais que podem ramificar-se e serem modificadas por sialilação, adição de ácido siálico e/ou fucosilação, adição de fucose, apresentando açúcares ou grupo de açúcares antigênicos (HAGEN *et al*, 2003).

O O-glicano mais simples é representado por um resíduo de N-acetilgalactosamina ligado a uma serina ou treonina e é chamado de Tn que é frequentemente antigênico (VARKI *et al*, 2009). Entretanto, o mais comum é o Gal $\beta$ 1-3GalNac também chamado de antígeno T e na célula normal serve como precursor de estruturas mais longas e mais complexas (HAGEN *et al*, 2003). Fisiologicamente ambos os antígenos T e Tn encontram-se não disponíveis pela adição posterior de outros sacarídeos, mas são frequentemente encontrados em tumores principalmente nos de mama (HAGEN *et al*, 2003; VARKI *et al*, 2009; JU *et al*, 2011;).

As mucinas estão no epitélio normal polarizado e são expressas exclusivamente no domínio apical com mucinas solúveis sendo secretadas no lúmen. Contudo, com a perda da topologia nas células epiteliais malignas as mucinas passam a ser expressas em toda extensão celular. Nas neoplasias de origem epitelial como nos carcinomas mamário as mucinas parecem ser as principais carreadoras das alterações glicobiológicas e estão relacionadas a diagnóstico, prognóstico e resposta a tratamento (MUKHOPADHYAY *et al*, 2011). A estrutura em forma de bastão altamente carregada negativamente repele interações

intercelulares e estericamente previnem a ação de outras moléculas de adesão como caderinas e integrinas impedindo-as de exercerem sua função. Assim em algumas instâncias as mucinas atuam como anti-adesinas promovendo o desligamento da célula do tumor primário no início da metástase (KANNAGI *et al*, 2004).

Estudo recente também mostra que no câncer a O-glicosilação bloqueia fisicamente a interação das células do carcinoma com células citolíticas como as NK (matadoras naturais, do inglês, *Natural Killers*) e podem, também, mascarar a apresentação de antígenos ao MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) (CHEN *et al*, 2006). Além disso, estudos *in vitro* vêm demonstrando que alteração de o-glicosilação de receptores específicos pode regular a estabilidade bem como o nível de expressão desses receptores de membrana muitos dos quais envolvidos em processos carcinogênicos (VARKI *et al*, 2009 ).

#### 3.4.2 N-Glicosilação e Glicosilação Aberrante

N-glicanos são ligados a proteínas através da amina de um resíduo de asparagina ligado a um resíduo de aminoácido diferente de prolina seguido de uma serina ou treonina. O entendimento das vias de N-glicosilação é importante porque os N-glicanos afetam muitas das propriedades das glicoproteínas como conformação, solubilidade, antigenicidade e reconhecimento por proteínas reconhecedoras de carboidratos (STANLEY *et al*, 2009).

A biossíntese de N-glicanos começa com a transferência de um resíduo de N-Acetil-glicosamina de um UDP-GlcNAc para um dolicol formando o N-Acetil-glicosamina-pirofosfato, posteriormente, 14 resíduos de açúcar são adicionados ao dolicol antes do bloco inteiro de carboidratos serem adicionado à proteína nascente. Esse oligossacarídeo precursor pode formar três estruturas: uma rica em manose; uma híbrida e uma complexa com o grau de ramificações e heterogeneidade aumentados nesse sentido (LAU *et al*, 2007).

N-glicanos ligados às proteínas são posteriormente remodelados no Retículo Endoplasmático e no Complexo de Golgi por uma série de reações catalisadas por glicosidases, enzimas que removem resíduos de carboidratos, e glicosiltransferases que são sensíveis ao estado fisiológico e ao tipo celular (VARKI *et al*, 2009b; STANLEY *et al*, 2009).

As estruturas desses N-glicanos podem ser maturadas nas cisternas trans do Complexo de Golgi, após o precursor ter sido adicionado no Retículo Endoplasmático tornando-se mais complexas pela adição de sítios de poli-NAcLAc e por resíduos de L-fucose e ácido siálico entre outras modificações (SCHACHTER, 2000). N-glicanos se tornam mais ramificados com a aquisição do fenótipo canceroso facilitando assim a progressão tumoral pelo aumento de sítios que são reconhecidos por moléculas pró-tumorais, bem como, podem estar envolvidos com a resistência a drogas (KOBATA & AMANO, 2005; VARKI *et al*, 2009).

Uma das causas na alteração e ramificação dos N-glicanos, que ficam maiores e mais complexos, é o aumento da transcrição do gene *MGAT5* que catalisa adição de um resíduo de N-Acetil-glucosamina criando uma nova estrutura antenária passível de crescimento pela ação de outras glicosiltransferases (IHARA *et al*, 2004;

ZHAO *et al*, .2006, KUDO *et al*, 2007; WANG *et al*, 2007). Esta modificação estrutural está associada a uma ligação mais fraca da célula maligna à matriz extracelular, com o aumento da migração e invasão celulares, e conseqüentemente, com a metástase dos tumores (GUO *et al*. 2000).

Análises experimentais mostram que ocorre a aquisição de comportamento tumoral por células antes não-tumorigênicas quando são transfectadas com o gene da *MGAT5* e que células com aumento da expressão desse gene tinham maiores taxas de metástase e quando esse gene era silenciado a metástase diminuía (KANNAGI *et al*, 2004). Isso pode ocorrer devido o aumento dos sítios de polilactosaminas e por alteração na meia vida de receptores de fatores de crescimento que são freqüentemente N-glicosilados. O aumento do conteúdo de ácido siálico na superfície celular diminui a aderência das células tumorais à matriz e protege as células do reconhecimento por vias alternativas (DENNIS *et al*, 1999; KANNAGI *et al*, 2004)

Por exemplo, o aumento da atividade da enzima que transfere um resíduo de ácido siálico a um de galactose de um N-glicano aumenta a ação de  $\beta$ -1 Integrina conferindo um maior poder invasivo pela célula. Outras macromoléculas sofrem glicosilação alterada no câncer, como os glicosfingolípídeos, porem essas moléculas parecem desenvolver papeis centrais em outros tumores como, por exemplo, os melanomas (RONALD *et al*, 2009).

### 3.4.3 Antígenos Carboidráticos Associados a Tumores (ACAT)

A síntese de uma variedade de glicanos complexos pela célula normal é interrompida nas células tumorais levando a acúmulo de percussores menos complexos, conceito esse conhecido como síntese incompleta como é o caso da perda do sialil-6-sulfo Lewis<sup>x</sup>, dissialilado Lewis<sup>a</sup>, a antígenos normais AB são bons exemplos que suportam esse conceito e são gerados pela inativação de sulfotransferases e glicosiltransferases (HAKOMORI *et al*, 1999). Os ACATs podem ser utilizados para diagnóstico e prognóstico de muitas neoplasias e são gerados pela formação de estruturas truncadas geralmente fucosiladas e passíveis de sialilação (KOROURIAN *et al*, 2008; VARKI *et al*, 2009).

Um grupo de ACAT são relacionados aos antígenos de Lewis<sup>x</sup> e Lewis<sup>a</sup> (monofucosilados), Lewis<sup>y</sup> e Lewis<sup>b</sup> (difucosilados) (Figura 02) que podem estar em O-glicanos, N-glicanos e glicoesfingolipídeos e que foram identificados inicialmente como antígenos tumorais correlacionados com progressão tumoral, metástase e associados a um pobre prognóstico (KANNAGI, *et al* 2004b). Essas estruturas fucosiladas quando sialiladas funcionam como ligantes de selectinas conferindo vantagem ao tumor facilitando o processo de metástase razão pela qual o antígeno está associado com um baixo prognóstico (SALEAND & KOOYK, 2011). Outro exemplo é o acúmulo dos antígenos T, Tn e Sialil-Tn diminuindo a complexidade estrutural de O-glicanos na célula tumoral já previamente descritos nessa tese (JU *et al*, 2011).

Outro grupo de ACAT importante está relacionado aos antígenos sanguíneos. No fenótipo 0, o percussor dos antígenos A/B, conhecido como H, é transformado



### 3.5 Galectinas

#### 3.5.1 Considerações Gerais sobre Galectinas no Processo Neoplásico

Galectinas são proteínas ligadoras de glicoconjugados contendo  $\beta$ -galactose que compartilham homologia na estrutura primária no seu domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD – *carbohydrate recognition domain*) (LEFFLER, 2001). Inicialmente chamadas de S-lectinas, galectinas representam o grupo de proteínas mais comumente expressas dentre as lectinas em todos os organismos. As galectinas são provavelmente a mais antiga classe de proteínas ligadoras de glicanos conhecidas até hoje e são encontradas desde metazoas, esponjas, fungos até invertebrados e vertebrados (LEFFLER, 2001; RABINOVITCH *et al*, 2011).

Todas as galectinas possuem uma seqüência principal contendo 130 resíduos de aminoácidos e podem ser encontradas extracelularmente, na superfície das células, no citoplasma e no núcleo, embora não haja um peptídeo sinal secretório para sua inserção no retículo endoplasmático (COOPER & BARONDES, 1999), sendo esta secreção realizada por uma via de secreção não-clássica pouco conhecida.

Galectinas podem contribuir para modulação de funções celulares através de interações célula-célula e célula-matriz extracelular, possuem também ligantes intracelulares onde participam de regulações de atividades celulares, contribuindo com vias fundamentais como processamento do pré-mRNA (CUMMINGS & FU-TONG, 2009; HAUDEK *et al*, 2010).

Um total de 15 galectinas foi descrita em mamíferos, porém apenas 12 genes foram encontrados em humanos, incluindo 2 genes para Galectina 9. Essas foram

classificadas em três grupos principais: Prototípicas, Quimeras e de repetição em tandem (HIRABAYASHI *et al*, 1993; LIU *et al*, 2005; ELOLA *et al*, 2007).

As galectinas prototípicas, como a Galectina 1 (Gal-1), contêm apenas um CRD e formam homodímeros. Já as galectinas quiméricas, representada apenas pela Galectina-3 nos vertebrados, é caracterizada pela presença de apenas 1 CRD e um domínio amino-terminal grande rico em prolina, glicina e tirosina que podem contribuir para oligomerização. Além disso, seu terminal amino é sensível a metaloproteínases como MMP-2 e MMP-9 (OCHEIENG, 1998). Galectinas quiméricas são mais comuns em invertebrados. No terceiro grupo estão as galectinas de repetição em sequência (*tandem*) que tem ao menos dois CRDs ligados por um pequeno domínio peptídico variando de 5 a 50 aminoácidos (CUMMINGS & FU-TONG, 2009).

A interação das galectinas com seus ligantes é complexa e muitos fatores contribuem para uma maior afinidade, incluindo o estado natural de multivalência e oligomerização da galectina, a multivalência dos glicoconjugados ligantes, bem como, o modo de apresentação destes glicanos (RABINOVICH, 2011). A formação de complexos multivalentes por galectinas solúveis e receptores glicoprotéicos na membrana plasmática ajuda na organização da disposição do conteúdo glicídico nessa membrana e pode determinar um tempo maior de resistência a endocitose de alguns receptores glicoprotéicos modulando assim a magnitude e duração do sinal ainda na superfície celular (GARNER & BAUM, 2008)

Cada CRD de cada galectina reconhece diferentes tipos de glicanos e mostram afinidade aumenta por diferentes estruturas (BOSCHER *et al*, 2011). Por exemplo, a Galectina-3 liga-se fortemente com glicanos de repetições [-3Gal $\beta$ 1-

4GlcNAc $\beta$ 1-]n ou poli-N-Acetil-lactosamina (LacNAc) contendo de 3 a 4 repetições, independente da presença do resíduo de  $\beta$ -galactose terminal. Diferentemente, a Gal-1 humana, que também se liga a longas cadeias de poli-N-Acetil-lactosaminas, requer o resíduo de  $\beta$ -galactose terminal. Gal-3 liga-se fracamente a uma única unidade de LacNAc e a afinidade a essas unidades aumenta se o penúltimo resíduo de galactose for substituído por resíduos de Gal- $\beta$ 1-3, GalNAc- $\alpha$ 1-3, ou Fuc- $\alpha$ 1-2. Em contraste, essas mesmas substituições diminuem dramaticamente a ligação a Galectina-1 (LAHM *et al*, 2004).

Galectinas parecem ligar-se seletivamente a ligantes de superfície celular e matriz extracelular, entretanto, o papel fisiológico preciso dessas interações ainda não está completamente entendido. Ligantes de Galectina-1 e Galectina-3 incluem proteínas de membrana basal como laminina e fibronectina, receptores de membrana, como integrina  $\alpha$ 7 $\beta$ 1 e  $\alpha$ 1 $\beta$ 1, CD43, CD7, e CD45, proteínas associadas a membrana dos lisossomos como LAMP-1 e LAMP-2, vitronectina e fibronectina (LIU & RABINOVITCH, 2005). Já a Galectina-1 interage com glicoproteínas de célula T, CD43 e CD45. Entretanto a estrutura glicana precisa que são reconhecidas pelas galectinas não estão bem definidas (CUMMINGS & FU-TONG, 2009)

O aumento na expressão de galectinas vem sendo associado com progressão tumoral, principalmente Galectina-3 (BARROW, 2011). Essa significação molecular está associada à interação de galectinas com os sítios de LacNAc nas proteínas de matriz como laminina, que facilitam o processo de invasão celular. Essa interação molecular Gal3-Lactosamina, pode mediar adesão homotópica de células neoplásicas já que poli-N-Acetil-lactosaminas são expressas tanto nas mucinas das células tumorais quanto nas ramificações  $\beta$ 1-6 dos N-glicanos tumorais (VARKI *et al*,

2009). A interação dessas estruturas de LacNAc com as galectinas pode explicar como a reexpressão do transportador de galactose em tumores mutados para transportador de UDP-Gal, aumenta a metástase *in vivo* (KANNAGI, 2008).

Muitos tipos de tumores incluindo melanomas, astrocitomas, ovarianos e sanguíneos super-expressam várias galectinas que em muitos casos está correlacionada com agressividade clínica e progressão a um fenótipo metastático. Nesse contexto 3 galectinas se destacam a Gal-1, Gal-3 e Gal-9 (LIU & RABNOVICH, 2005). A imunossupressão e o efeito apoptótico de Gal-1 contribuem para a sobrevivência tumoral como é mostrado por estudos de silenciamento gênico de Gal-1 que revelam diminuição da sobrevivência tumoral e rejeição tumoral mediada por células T. Além de revelar que a expressão de Gal-1 no endotélio é essencial para angiogênese (THIJSSSEN *et al*, 2007).

Assim as galectinas desempenham papéis importantes na progressão tumoral e metástase através de efeitos indiretos, regulando a resposta imune tumoral, e direta, estimulando angiogênese. Já a super-expressão de Gal-3 está correlacionada com transformação neoplásica e progressão tumoral até a metástase em alguns casos onde funciona como marcador tumoral (BARROW, 2011).

### 3.5.2 Galectina-3

A Galectina-3 pertence à família das galectinas, classificadas como lectinas com domínios ligantes a  $\beta$ -galactosídeos. Devido as possíveis diferentes localizações subcelulares e estrutura ímpar, a Galectina-3 apresenta múltiplas funções celulares dependentes de sua compartimentalização. No núcleo já foi

reportada sua participação na remodelação do pré-mRNA (DAGHER *et al*, 1995), expressão gênica (PARON *et al*, 2003; LIN *et al*, 2002) e como moduladora positiva da progressão tumoral induzindo a expressão de genes pró-neoplásicos como ciclina D1, Fator de Transcrição da Tireóide 1 (TTF-1), e Mucina 2 (MUC2) (NAKAHARA & RAZ 2007; PARON *et al*, 2003). Apesar de possuir diversas funções nucleares, seu transporte para o núcleo ainda não é bem esclarecido, porém evidências indicam ser através de transporte ativo e também difusão passiva (HAUDEK, 2009).

No citoplasma, Gal-3 pode atuar como inibidor apoptótico, impedindo a liberação do citocromo C (AKAHANI *et al*, 1997) e também como promotor tumoral, aumentando a capacidade de invasão, crescimento independente de ancoragem, crescimento tumoral *in vivo*, angiogênese e diminuição da indução da apoptose (RABINOVITCH *et al*, 2011).

Na superfície celular ou no meio extracelular pode atuar nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (KUKLINSK *et al*, 2003). É descrito ainda a possibilidade de indução de apoptose através da ligação da Gal-3 secretada com as  $\beta$ 1-integrinas em colonócitos da linhagem SW48. Esta morte programada induzida pode ser inibida através da adição de resíduos de ácido siálico de ligação  $\alpha$ 2-6 a  $\beta$ -galactosídeos na cadeia terminal destas integrinas, impedindo sua ligação a Gal-3 (ZHUO *et al*, 2008). Em células de linfoma, esta galectina atua na indução de apoptose pela ligação a resíduos de carboidratos na superfície celular, sendo esta aumentada após a ação de neuraminidases, indicando o papel do ácido siálico na proteção contra a morte celular (SUZUKI *et al*, 2008).

A Gal-3 também está relacionada ao aumento da mobilidade (DEBRAY *et al*, 2004) e adesão celular pela ligação com diversos componentes da matriz extracelular (OCHIENG *et al*, 1998), crescimento e diferenciação celular (BARONDES *et al*, 1994; NANGIA-MAKKER *et al*, 2000; YOSHII *et al*, 2002), promovendo às células resistência a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MOON *et al*, 2001).

Devido ao seu CRD a Gal-3 possui diversos ligantes biológicos, porém é visto que existe ligação preferencial a moléculas com resíduos de N-Acetil-lactosamina (LacNAc) (SATO *et al*, 1992; AGRWAL *et al*, 1993). Dumic e colaboradores (2006) descrevem estes ligantes como moléculas estrutural e funcionalmente variadas podendo a Gal-3 ser inibida por lactose. Porém nem todas as glicoproteínas com resíduos de LacNAc demonstram serem reconhecidas pela Gal-3, provavelmente devido a diferenças de afinidade de ligação como consequência de interferências estéricas por outras porções da cadeia de carboidratos ou por dobramentos protéicos específicos. Por outro lado, a especificidade da ligação da Gal-3 pode ser incrementada por uma seqüência particular de peptídeos em volta do resíduo de LacNAc (DUMIC *et al*, 2006).

Também é possível que alguns ligantes *in vitro* não sejam biologicamente relevantes devido a sua expressão em células e tecidos que não apresentem Gal-3 e vice-versa. Além destes fatos, a expressão de Gal-3 tem que ser coordenada temporalmente para que haja interação com seus ligantes. Deste modo, não só a afinidade de ligação da Gal-3 com seus ligantes e seus *status* de fosforilação são relevantes, mas também a coordenação de sua expressão espacial e temporal

contribuem para que haja a devida interação entre estas moléculas (IKEMORI, 2009).

Devido seu papel pró-tumoral, inibidores de galectinas vem sendo desenvolvidos mostrando resultados promissores por aumentar a sensibilidade a indução da apoptose por Plactaxel em células metastáticas de câncer de mama *in vitro* e *in vivo* (GLINSKY *et al*, 2009).

### 3.5.3 Galectina-1

A Galectina-1 é uma pequena proteína de 14Kd ligadora de  $\beta$ -galactosídeos que possui apenas um CRD é comumente encontrada em vários tecidos participando de processos chave como apoptose, regulação do ciclo celular, adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (CAMBY *et al*, 2006). Dentro do contexto apoptótico e de comunicação célula-matriz Galectina-1 sensibiliza células neoplásicas resistentes à morte por *anoikis* (deadesão) via o receptor de fibronectina  $\alpha(5)\beta(1)$  integrina promovendo apoptose por se ligar a ele, porém esse mecanismo pode ser desligado por uma sialilação  $\alpha 2,6$ . Desta forma a ligação Gal-1/ $\alpha(5)\beta(1)$  participa do controle da integridade epitelial e a sialilação da integrina pode tornar as células capazes de evadir-se desse mecanismo dependente de Gal-1 (SANCHEZ-RUDERISCH *et al*, 2011).

Galectina-1 apresenta-se superexpressa em muitos tumores como, por exemplo, de cérebro, tireóide e adenocarcinoma de útero (DEMYDENKO & BEREST, 2009). Além disso, em tumores sanguíneos altos níveis de mRNA de Gal-1 estão associados com altos graus tumorais. Por outro lado, em muitos tumores a

expressão de Gal-1 está localizada nas células estromais associadas ao tumor (VAN DEN BRULE *et al*, 2001).

Fibroblastos adjacentes a carcinomas prostáticos expressam altos níveis de Gal-1 que estão relacionados à agressividade do tumor, o mesmo fato é observado em adenocarcinomas de pâncreas (VAN DEN BRULE *et al*, 2001; BERBERAT *et al*, 2001). Na mucosa colo-retal Gal-1 é um produto predominantemente estromal relacionado com progressão (SANJUAN *et al*, 1997).

Nos câncer mamário o papel da Gal-1 parece estar associado também às células estromais. Jung e colaboradores (2007) realizaram análise proteômica por eletroforese bidimensional e MALD-TOF de 105 amostras tumorais de mama. Foi observado que dentre as proteínas superexpressas nos tumores se encontrava a Gal-1 quando na comparação ao tecido normal. Esses dados foram confirmados por imunohistoquímica (IHQ) e western blotting. Na análise IHQ houve uma forte correlação com a positividade de Gal-1 nas células estromais associadas ao tumor e invasão, classificação TNM e metástase linfonodal bem como uma relação negativa com o marcador de células T CD33 (LI *et al*, 2010). Essa diminuição da positividade de CD33 nas áreas positivas para Gal-1 suporta trabalhos recentes quanto ao papel de Gal-1 nas células estromais e quanto a um privilégio imune tumoral (LE *et al*, 2005; (WIEST *et al*, 2005). Apesar da existência de células imunes específicas para tumores, mecanismos para evitar esse ataque indicam o envolvimento da molécula de Gal-1 funcionando como reguladora negativa da ativação de células T e promovendo o papel-chave na fuga do sistema imunológico dessas células, conferindo este privilégio imunológico as células tumorais (NAJAR *et al*, 2010). O bloqueio da atividade de Gal-1 *in vivo* promove rejeição tumoral e estimula a

geração de resposta mediada por células T em modelo camundongo singênico (RUBINSTEIN *et al*, 2004).

Ademais, Gal-1 representa uma ligação entre privilégio imune tumoral e hipóxia em carcinoma de células escamosas porém essa ligação ainda não foi estabelecida em outros tumores (LE *et al*, 2005).

### **3.6 Lectinas em Histoquímica**

Além das lectinas endógenas que apresentam papéis fisiológicos primordiais e que estão envolvidas no processo carcinogênico, hoje na literatura a utilização de lectinas exógenas no diagnóstico, prognóstico e tratamento vem sendo cada vez mais explorada com o passar dos anos (GEMEINER *et al*, 2009). Lectinas são (glico)proteínas reconhecedoras e ligadoras de carboidratos livres ou em oligossacarídeos e glicoconjugados, de origem não imunológica, capazes de aglutinar células tendo a hidrofobicidade como a principal força de estabilização desta interação (THOM *et al.*, 2007; SOBRAL *et al*, 2010).

A descoberta de fatores tóxicos protéicos em extrato de *Ricinus communis* por Stillmark, em 1888, foi o marco inicial no estudo de lectinas. Estes fatores eram responsáveis pela aglutinação de células sanguíneas. O termo lectina (do Latim *lectus* que significa escolher) foi utilizado pela primeira vez por Boyd (1954) para enfatizar a habilidade exibida por algumas hemaglutininas em discriminar células do grupo sanguíneo ABO.

As lectinas estão presentes em todos os seres vivos. As de origem vegetal normalmente são obtidas de sementes, principalmente nas leguminosas

representando cerca de 10% das proteínas totais nas sementes (RINI, 1995; SHARON & LIS, 2004). A ligação das lectinas com os carboidratos acontece em locais específicos os domínios de reconhecimento de carboidrato (CRD – *carbohydrate recognition domain*) (SHARON & LIS, 2004). O número de lectinas purificadas tem aumentado muito nas últimas décadas, até então o número de lectinas já identificadas é de aproximadamente 1000 (GEMEINER *et al*, 2009).

Por causa de sua especificidade a carboidratos, por exemplo, em glicoconjugados de superfície ou citoplasmáticos, as lectinas se apresentam como ferramentas histoquímicas valiosas na identificação e monitoramento de mudanças na glicosilação de glicoconjugados durante diferenciação celular e transformação neoplásica (FISCHER, 1894; FUSTER & ESKO, 2005).

A histoquímica convencional utiliza como ferramenta de avaliação a morfologia das células e dos tecidos, auxiliada por corantes, dentre os quais os mais utilizados nos procedimentos histológicos são a hematoxilina e a eosina (ROBBINS, 2007). No entanto, diagnósticos morfológicos são subjetivos, uma vez que aspectos morfológicos de um tumor podem mascarar o seu verdadeiro comportamento biológico (COTRAN *et al*, 1996).

A histoquímica com lectinas (HqL) pode ser empregada como ferramenta auxiliar e complementar no diagnóstico realizado com IHQ, o qual já é bem estabelecida e é rotineiramente utilizada em laboratórios de anatomia patológica (NONOGAKI *et al*, 2007). Uma das grandes limitações da utilização biotecnológica das lectinas era sua clonagem com atividade, porém trabalho recente mostra capacidade de sistema heterólogo em clonar a lectina obtida da semente de *Cratylia mollis* com atividade (VAREJÃO *et al*, 2010)

Experimentalmente lectinas já têm sido empregados no auxílio de diagnóstico histopatológico, para o mapeamento dos estágios de diferenciação e desdiferenciação, nível de malignidade e capacidade de metástases em tecidos revelando alteração no perfil glicídico quando conjugadas a peroxidase, biotina ou éster de acridina (Campos *et al*, 2006)

Em câncer de cavidade oral as lectinas UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin) e Con A (Concanavalina A), são capazes de diferenciar os graus de malignidade do carcinoma mucoepidermoide revelendo um aumento do número de ligantes dessas lectinas no estroma e uma diminuição dos mesmos no parênquima (Rego *et al*, 2005; Sobral *et al*, 2010), Essas mesmas lectinas em amostras de câncer de mama revelam que o aumento da expressão dos seus ligantes no endotélio vascular e na matriz extracelular peritumoral estão associados a invasão linfonodal e alto grau histológico (Rêgo *et al*, 2010).

O valor diagnóstico de algumas lectinas já foi avaliado em diferentes tecidos humanos como em cérebro (Beltrão *et al*, 2003), mama (Beltrão *et al*, 2001; Rêgo *et al*, 2010), próstata (Lima *et al*, 2010), entre outros. Nesse sentido um dos objetivos desse trabalho foi a utilização da histoquímica com lectinas para avaliação da diferença do perfil de carboidratos no ambiente hipóxico em relação ao microambiente tumoral não-hipóxicos em amostras tumorais de pacientes com câncer de mama. A possível utilização desses dados como informação de valor diagnóstico e prognóstico também foi avaliada.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Artigo 1

HYPOXIC REGIONS ON BREAST CANCER DIAGNOSIS: HOW TO EVALUATE THESE AREAS TO IMPROVE THERAPEUTIC CONDUCT?

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo\*

Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE);  
Núcleo para Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-UFPE) Avenida Professor  
Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife - PE - 50670-901. Brazil. E-mail:  
moacyr.rego@ufpe.br

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);  
Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE).  
Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária Recife - PE - 50670-901.  
Brazil. ebeltrao@hotmail.com

Correspondence to:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária

Recife - PE - 50670-901.

BRAZIL

Fax: + 55 81 21268484

Tel: + 55 81 2126848

**Abstract:**

Hypoxia has been extensively studied in solid tumors mainly in breast cancers being responsible for chemotherapy and radiotherapy resistance. HIF-1-alpha is the main actor of hypoxia in tumor microenvironment and have had their molecular mechanisms described and therapeutic strategies designed but very little efforts has been made in the role of the hypoxic environment in diagnosis to help oncologists conduct. This Hypothesis urges the pathology and oncology societies for setting evaluation standards for hypoxia areas and including hypoxia biomarkers in the panel of breast cancer markers since positivity of hypoxia responsible molecules exceeds some markers already used in routine such as HER-2. The extension definition of hypoxic cores can change the oncologist decision in the choice of therapeutic conduct since many anti-angiogenic treatments worsen the clinical status of patients by creating hypoxic environment.

hypoxic response via hypoxia inducible factor (HIF) is recognized as one of the most important microenvironmental molecule on tumour behaviour influencing all tumors hallmarks enabling tumours cells to acquire an aggressive phenotype and become resistant to chemotherapy and radiotherapy (1-2). Many papers have described some cell hypoxia issues like poor drug delivery, for example cetuximab and transtuzumab on immunotherapy (3), the defaulted cellular uptake of many drugs caused by tumor associated acidity (4), as well as the role of key-cascade hypoxia molecules in therapeutics (5). Some mechanisms were highlighted as the HIF-1 $\alpha$  knockdown in breast carcinoma MCF-7 cells it was shown to be responsible for increasing the sensitivity to methotrexate (6) and that HIF-1  $\alpha$  silencing reverted the hypoxia-induced protection against paclitaxel-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells (7). However HIF-1  $\alpha$  is transcribed continuously in normoxia, its levels are kept low by a rapid degradation process through the ubiquitin-proteasome system. This constitutive expression, diffuse staining and short half-time turns difficult its utilization as prognostic and diagnostic biomarker (8).

Differing from researches in the role of hypoxia in tumour behaviour and treatment, fewer efforts have been made in the role of hypoxia as diagnostic information to oncologist treatment decision. This is pivotal to treatment because some breast cancer patients receiving anti-angiogenic treatment show increased metastases, possibly as a result of induced hypoxia (9). Recently Voss and co-workers (10) showed that hypoxia caused increased migratory activity in tumour cells, involving the release and autocrine action of soluble mediators. Hypoxic cells conditioned medium induced migration of normoxic cells in selected luminal and

basal-like breast carcinoma cell lines which might explain why anti-angiogenic treatment can worsen clinical outcome in some patients. This could be at least minimized by evaluation of hypoxia extension in solid tumour at diagnostic moment. This could be crucial to oncologist. Do we have any good and reproducible marker in hypoxia? There are some known hypoxia responsible molecules like Glut-1, CA IX, CD105 and HIF-1 $\alpha$ . CA IX is a great candidate to answer that question. The prolonged half-life of CA IX means it would remain in the tumour when other proteins with a shorter half-life are no longer present being able to access hypoxia regions in many solid tumours including breast ones (11). This data drives some important researches like one made by Ahlskog and co-workers (12) that developed a specific new human anti-CA IX antibodies that are expected to be non-immunogenic in patients with cancer and may serve as broadly applicable reagents for the non-invasive imaging of hypoxia and for drug delivery applications.

Indeed some reports show that 25–40% of invasive breast cancer samples score positively for hypoxia markers (13). This is higher than the 20% of HER-2 (14). Why do not include a hypoxia marker in antibody panel to pathological evaluation? Beside this increased HIF-1 $\alpha$  levels are also associated with hormone receptor negativity; HER-2 over expression increased levels of VEGF and COX-2, and increased nuclear p53, indicating an intimate link between HIF-1 $\alpha$  and aggressive phenotypes in breast cancer (15). Dale and co-workers (16) described the presence of different HIF-1 $\alpha$  splice variants in human breast cancer and non-malignant tissue samples. By performing real-time quantitative PCR of fresh frozen tissues, the authors demonstrated that the mRNA levels of a specific splice variant termed HIF-1 $\alpha$ TAG are associated with positive lymph node status, high tumour grade and

negative estrogen and progesterone status, as well as poor metastasis-free survival in early breast cancer. The quantification of this variant could indicate the hypoxia extension.

Recently Fox and co-workers (17) analyzed the expression of PHD1, PHD2 and PHD3 together with HIF-1  $\alpha$  and the HIF-inducible genes, as vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and carbonic anhydrase IX, by immunohistochemistry using a tissue microarray approach in 211 patients. PHD1, PHD2 and PHD3 expression was significantly increased after epirubicin therapy suggesting that this kind of treatment increases signalization to HIF-1 $\alpha$  degradation. This study was the first to describe the correlation of prolylhydroxylases and treatment but one should considerate that the authors performed CA IX evaluation with their own system of score and considered any staining membrane positivity as indication of hypoxia regions. Our experience indicates that usually there are many focus of CA IX with differential extension and this could be considered in staining evaluation of hypoxia areas.

Another point is that prolyl hydroxylases could give useful information for measurement of the hypoxic region at the diagnostic moment since they are the true sensor of O<sub>2</sub> and not Hif-1  $\alpha$  his is the first evidence that these enzymes are up-regulated on therapy and opens many windows. However, there are many another things to do in this sense. Could FIH an asparaginyl hydroxylase another key-enzyme signalize Hif-1  $\alpha$  to degradation in hypoxia be used as diagnostic and treatment responsive marker? The first step was done revealing that cytoplasmic location of FIH is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter

survival in invasive breast cancer (19) However few months ago an interestingly paper (20) reveals Hif-1  $\alpha$  and FIH co-staining in peri-necrotic areas. Adding the PHD results we can see that the challenge persists.

Yet we cannot forget the pivotal role of hypoxia on estrogen receptor. Hypoxia induces rapid ER $\alpha$  protein degradation by a proteasome-mediated pathway in breast cancer cells, and also regulates ER  $\alpha$  at transcriptional level (21), which may facilitate hormone insensitivity in the tumor microenvironment. Challenges appear! Which is the best hypoxia biomarker? Is there any or only one? Is CAIX the best choice? How evaluate the hypoxia positivity and its extension? Based on that information we believe that CA IX is the best candidate regardless of little but precious information concerning this hypoxia marker in breast cancer. But how to use them? Despite these doubts, in one thing we are sure that oncologists should consider the hypoxia extension and number of foci in tumour microenvironment observed by the pathologist. The knowledge of hypoxia area extension must be taken in consideration for the treatment choice with anti-angiogenic molecules. Oncologists need to hang it in the balance before trying to kill the tumor by deprivation of nutrients and oxygen, depending on the extent of hypoxia such treatment may worsen the patient condition. That is why the oncology and pathology scientific community need to encourage their researchers to establish hypoxia area guidelines through multi-centric studies.

#### Acknowledgments

We thank Professor Luiz Bezerra de Carvalho Junior for critical review.

## References

1. Ruan, K.; Song, G.; Ouyang, G.; Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J, Cell Biochem*, v.107, p.1053 -1062, 2009.
2. Moeller, B.J.; Richardson, R.A.; Dewhirst, M.W.; Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, v.26 p.241-248, 2007.
3. Lee, C.M.; Tannoc, I.F, The distribution of the therapeutic monoclonal antibodies cetuximab and trastuzumab within solid tumors, *BMC Cancer* v.10 p.255, 2010.
4. Cosse, J.P.; Michiels, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression, *Anticancer Agents Med Chem*, v.8, p. 790-797, 2008.
5. Koh, M.Y.; Spivak-Kroizman, T.R.; Powis, G.; Inhibiting the hypoxia response for cancer therapy: the new kid on the block, *Clin Cancer Res*, v.15, p.5945-5946, 2009.
6. Li, J.; Shi, M.; Cao, Y.; et al, Knockdown of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate, *Biochem Biophys Res Commun*, v.342 p.1341-1351, 2006.

7. Lionel; Flamant; Notte, A.; Ninane, N.; Raes, M.; Michiels, C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia, *Molecular Cancer*, v.9, p.191,2010.
8. Adams, J.M.; Difazio, L.T.; Rolandelli, R.H.; et al. Z.H, HIF-1: a key mediator in hypoxia, *Acta Physiol Hung*, v.96, p.19-28, 2009.
9. Voss, M.J.; Möller, M.F.; Powe, D.G.; et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia,mediated by an autocrine mechanis, *BMC Cancer*, v.11, p.158, 2011.
10. Chen, H.H.; Su, W.C.; Lin, P.W.; Guo, H.R.; Lee, W.Y. Hypoxia-inducible factor-1alpha correlates with MET and metastasis in node-negative breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, v.103 p.167-175, 2007.
11. Sobhanifar, S.; Aquino-Parsons, C.; Stanbridge, E.J.; Olive, P. Reduced expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in perinecrotic regions of solid tumors, *Cancer Res* v.65 p.7259-7266, 2005.
12. Ahlskog, J.K.J.; Schliemann, C.; Marlind, J.; et al, Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours, *British Journal of Cancer* v.101 p.645 – 657, 2009.

13. Santhanam, A.N.; Baker, A.R.; Hegamyer, G.; Kirschmann, D.A.; Colburn, N.H.; Pdc4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion, *Oncogene* v.29 p.3921–3932, 2010.
14. Al-Ahwal, M.S. Her-2 positivity and correlations with other histopathologic features in breast cancer patients-hospital based study, *J Pak Med Assoc* v.56 p.65-68, 2006.
15. Yamamoto, Y.; Ibusuki, M.; Okumura, Y.; et al, Hypoxia-inducible factor 1alpha is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer, *Breast Cancer Res Tr.* v.110, n.465–475, 2008.
16. Dales, J.F.; Beaufils, N.; Silvy, M.; et al, Hypoxia inducible factor 1a gene (HIF-1a) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer, *BMC Medicine* v.8, p.44, 2010.
17. Fox, S.B.; Generali, D.; Berruti, A.; et al. The prolyl hydroxylase enzymes are positively associated with hypoxia-inducible factor-1a and vascular endothelial growth factor in human breast cancer and alter in response to primary systemic treatment with epirubicin and tamoxifen, *Breast Cancer Research* v.13, p.1617, 2011.
18. Lando, D.; Peet, D.J.; Gorman, J.J.; et al. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor, *Genes Dev* v.16, p.1466-1471, 2002.

19. Tan, E.Y.; Campo, L.; Han, C.; et al. Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer, *Breast Cancer Res*, v.9, p.R89, 2007.
  
20. Hyseni, A.; Van der Groep, P.; Van der Wall, E.; Van Diest, P.J. Subcellular FIH-1 expression patterns in invasive breast cancer in relation to HIF-1 $\alpha$  expression, *Cell Oncol* v.34, n.6 p.565-570, 2011.
  
21. Ryu, K.; Park, C.; Joo-Lee, Y.; Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogenreceptor alpha gene in human breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 407 p.831–836, 2011.

## 4.2 Artigo 2

### IMPLICATIONS ON GLYCOBIOLOGICAL ASPECTS OF TUMOR HYPOXIA IN BREAST DUCTAL CARCINOMA *in situ*

*(Artigo aceito para publicação - Medical Molecular Morphology)*

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1\*</sup>; Gabriela Souto Vieira de Mello<sup>1</sup>; Carlos André da Silva Santos<sup>1</sup>; Roger Chammas<sup>2</sup>; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>1,3</sup>

1 Pathology Sector of Keizo Asami Immunopathology Laboratory - Federal University of Pernambuco (LIKA-UFPE). Recife, Brazil

2 Radiology and Oncology Department and São Paulo Cancer Institute, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

3 Biochemistry Department - Federal University of Pernambuco (UFPE). Recife, Brazil.

\* Correspondence to:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife – PE

50670-901. BRAZIL

E-mail: moacyr.rego@ufpe.br

Fax Number: +55 81 2126 8485

**Keywords:** lectin histochemistry, immunohistochemistry, hypoxia, DCIS, galectins

## Abstract

Breast carcinoma is one of the most common neoplasia and the first cause of women cancer related deaths worldwide. In the past few years with diagnostic increment the number of patients diagnosed with Ductal Carcinoma *in situ* (DCIS) increased considerably and opened up new ways in research and new dilemmas in diagnostic and clinical practice. This work aimed to evaluate differences in Galectin-1 and Galectin-3 expression and lectins ligands profile on DCIS cells in hypoxic microenvironment. Lectin histochemistry and immunohistochemistry were performed with Concanavalin A, Wheat Germ Agglutinin, Peanut Agglutinin and *Ulex europaeus* Agglutinin lectins and with anti-Galectin-1 and anti-Galectin-3, antibodies. Lectin ligands were more recognized in hypoxic lesions by Concanavalin A ( $p=0.0019$ ), Wheat Germ Agglutinin ( $p<0.001$ ) and *Ulex europaeus* Agglutinin ( $p= 0.0014$ ) but not by Peanut Agglutinin ( $p= 0.5779$ ) when compared to non hypoxic. Galectin-1 was not observed in all cases analyzed on both groups, differing from Galectin-3 that was overexpressed on cytoplasm of DCIS hypoxic group in relation to control group ( $p=0.031$ ). As far as we are concerned this is the first paper that describes glycobiological alterations in breast cancer hypoxic environment *in vivo* that could be used to validate *in vitro* models on this aspect. Moreover comedonic/necrotic carcinomas were usually associated with poor-prognostic than others and our results show that glycosylation may play an important role in this event.

## Introduction

Breast carcinoma is one of the most common neoplasias and the first cause of women cancer related deaths worldwide<sup>1</sup>. In the past few years with diagnostic increment the number of patients diagnosed with Ductal Carcinoma *in situ* (DCIS) increased considerably and opened up new ways in research and new dilemmas in diagnostic and clinical practice<sup>2</sup>.

Ducts in DCIS are markedly enlarged in the range of 360  $\mu\text{m}$  in diameter, but since the diffusion of oxygen from peri-ductal vessels is limited to 100-180  $\mu\text{m}$ , cells in the center of DCIS are poorly oxygenated and become either necrotic or remain hypoxic but viable<sup>3,4</sup>. Because of this, DCIS represents a great injury to study hypoxia events so that Bussolati and coworkers<sup>4</sup> propose a new classification system for DCIS based on necrotic and hypoxia area in tumors. This classification was shown highly reproducible in many different European cancer centers.

The hypoxic response via Hypoxia Inducible Factor (HIF) is recognized as one of the most important microenvironmental modulator, altering tumour behavior influencing all tumors hallmarks, enabling tumours cells to acquire an aggressive phenotype and become resistant to chemotherapy and radiotherapy<sup>5, 6</sup>. Hypoxia switches, not only energetic metabolism to anaerobic pathway but changes glucose destination, synthesis of sugar nucleotide transporters, and glycosyltransferases activity<sup>7</sup>. These alterations in glycan cycle alters glycosylation pattern of tumour cells changing the neoplastic cells behavior<sup>8</sup>.

Such glycosylation changes might be recognized by endogenous galectins<sup>9</sup>, modulators of biological events, and by exogenous lectins capable of correlate these events with information concerning prognosis, diagnosis and therapy response<sup>10</sup>. In

this sense ConA - Concanavalin A, UEA-I - *Ulex europaeus* Agglutinin, WGA - Wheat Germ Agglutinin and PNA - Peanut Agglutinin lectins receive highlights in the literature since their ligands, glucose/mannose, L-fucose, sialic acid/N-acetylglucosamine and D-galactose, respectively, present different expressions profile in cells under carcinogenic process.

Some studies have shown that other glycobiological aspects are changed in tumour hypoxia like Galectin-3 (Gal-3) overexpression in melanoma cells on hypoxic environment<sup>11</sup> and Galectin-1 (Gal-1) that represents a link between tumour immune privilege and hypoxia in Squamous-cells carcinoma<sup>12</sup>. In this context, this work aimed to evaluate differences in Gal-1 and Gal-3 expression and ConA, WGA, UEA-I and PNA ligands profile in hypoxic and non-hypoxic DCIS lesions.

## **Materials and Methods**

### **Patients**

This retrospective study was performed with archival tissue biopsies from patients diagnosed with breast DCIS (n=66), between years 2002–2009, obtained at the University Hospital of Federal University of Pernambuco after approval by Health Sciences Centre Ethics Board. Clinical and pathological data from patients were obtained from medical file at Medical Assistance and Statistic Service of this institution. Lesions were considered hypoxic if presenting necrotic nuclei or more than 360  $\mu\text{m}$  diameter<sup>4</sup>, small lesions without necrotic areas was considered non-hypoxic. Considering that one biopsy frequently presents more than one lesion the media of lesions analyzed were 80.

### **Lectin histochemistry**

Four-micrometer-thick sections of specimens were deparaffinized in xylene and dehydrated in graded alcohol (100 - 70%). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37°C followed by a 0.3% (v/v) methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 30 min at 25°C and then incubated, separately, with 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Con A, PNA, WGA and UEA-I lectins conjugated to horseradish peroxidase (Sigma, USA) for 2 h at 4°C. All solutions and washings were carried out using a 10mM phosphate buffer solution pH 7.2 containing 150mM NaCl. Lectin binding inhibition assays were developed incubating the lectin with its corresponding specific sugars, sialic acid/N-acetyl-glucosamine for WGA, methyl- $\alpha$ -D-mannoside for Con A, L-fucose for UEA-I and D-galactose for PNA (20 to 500mM) prior to tissue incubation. Negative controls

were performed replacing the lectin for PBS and positive controls with tissues previously known as positive for these lectins.

### **Immunohistochemistry**

Four-micrometer-thick sections of specimens, after xylene deparaffinization and graded alcohol hydration (100 - 70%), were incubated in methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (1:1, v/v) and with 10% (w/v) non-fat milk solution. Antigenic sites were thermally recovered in steamer with 10mM citrate buffer pH 6.0. Primary antibodies (anti-Gal-3 and anti-Gal-1, both at 1:150) were incubated for 2h at 25°C and immune detected with biotin-free polymer (DAKO, USA), revealed with Diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Mayer's haematoxyline. Negative controls were obtained replacing the primary antibody by non-immune serum and positive controls were performed according to antibody manufacturer (Santa Cruz Biotechnology, USA)

### **Statistical analysis**

All statistical analyzes were performed in GraphPad Prism version 4.0. Non-parametric data were evaluate we used the chi-square ( $\chi^2$ ). Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . All experiments were repeated at least three times to results consideration.

## Results

### *Lectin ligands are differently recognized in hypoxic DCIS*

Con A ligands (D-mannose/D-glucose) were more recognized in hypoxic group than non-hypoxic ( $p=0.0019$ ). Forty out of 44 hypoxic lesions were stained by ConA (Figure 1A) and in non-hypoxic group this lectin was positive only in 25 lesions and negative in 15. The subcellular location of lectin staining was cytoplasmatic only or cytoplasmatic plus membrane in both groups. WGA recognized its ligands in 41 lesions of hypoxic group (Figure 1B) and did not in three samples. On the other hand, the non-hypoxic group was positive only in 19 cases and negative in 21 lesions, revealing a higher recognition of its ligands in the hypoxic group ( $p<0.001$ ). It was observed a difference in WGA cellular staining pattern; in hypoxic lesions this staining was mainly cytoplasmatic differing from non-hypoxic group that shows membrane staining too (Figure 1C).

UEA-I recognized L-fucose residues mainly in hypoxic group (22 of 40 sample) (Figure 1D) while in non-hypoxic group only 6 of 40 lesions were positive ( $p=0.0014$ ). PNA did not recognize differentially the two groups being positive in 21 lesions in hypoxic group (Figure 1E) and 18 in non-hypoxic group ( $p=0.5779$ ). PNA and UEA-I staining pattern was cytoplasmatic, predominantly, in both groups. It was also observed that PNA negative lesions were all positive for WGA in hypoxic group and this was not observed in non-hypoxic. After neuraminidase treatment PNA negative samples of hypoxic group became positive in 60% of them. Lectin histochemistry results were summarized on figure 2.

### *Gal-3 but not Gal-1 is overexpressed in hypoxic DCIS*

Gal-1 expression was not detected in neoplastic cells of all cases analyzed on both groups but tumor associated stromal cells were recognized by anti-gal-1 (data not shown). Trying to draw a difference between the groups hypoxic and non hypoxic positive stromal cells were counted in six different random fields in the 40x objective, but no difference was found. On the other hand, Gal-3 was overexpressed (Figure 1F) on cytoplasm of DCIS hypoxic group in relation to non-hypoxic ( $p < 0.031$ ).

### **Discussion**

Quantitative and qualitative changes in cell glycoconjugates are highly significant in the development and progression of many neoplastic processes<sup>13</sup>. In tumour cells the content, accessibility and/or expression of surface carbohydrates have been evaluated by lectin histochemistry<sup>14</sup>. These processes are affected, directly or indirectly, by *N*- and/or *O*-glycosylation of functional proteins or lipids<sup>15</sup>. The characterization of this glycode is therefore indispensable for the understanding of many biological processes<sup>16</sup>.

A few years ago the role of hypoxia in glycan cycle started to be elucidated showing a different pattern of glycosylation<sup>9</sup>. Our results reveals an overexpression of Con A ligands in DCIS hypoxic group ( $p = 0.0019$ ). One hypothesis for this increase is the gain of mannose rich structures in some proteins selectively expressed in hypoxic environment such as carbonic anhydrase<sup>17</sup>.

In our results we observed a positive relation between UEA-I ligands in DCIS and hypoxic areas in these lesions ( $p = 0.0014$ ) and this could be related to the increased expression of difucosylated Lewis antigens by fucosyltransferase VII increased expression<sup>18</sup>.

Our results also showed that negative lesions to PNA were positive to WGA since galactose (recognized by PNA) is usually a terminal residue which is frequently sialylated on cancer being hidden by this later sugar<sup>19</sup>. This result was confirmed when negative sample became positive after neuraminidase treatment. These data are in agreement with Yin and co-workers<sup>20</sup> that showed an increased expression of sialic acid transporters accompanied with an enhanced incorporation of N-glycolylneuraminic acid as well as N-acetyl sialic acid in colon cancer cells under hypoxic conditions. In hypoxic group WGA staining was more cytoplasmic and less membrane related; this change on sub-cell ligands expression provides important information since membrane staining is usually more associated with N-glycosylation and cytoplasmic with O-glycosylation<sup>21</sup> suggesting a saccharide pattern change in this group of neoplastic cells.

Knowing that Gal-1 is not commonly expressed in neoplastic cells of breast cancer<sup>22</sup> we hypothesized that this protein could be required by these cells or overexpressed in stromal cells in hypoxia environment. Our hypotheses were not validated by our experiments. Differently Le and co-workers<sup>12</sup> observed Gal-1 positivity in samples of head and neck squamous cell carcinoma which was correlated to the immune privilege struck by the absence of CD3 antigen on stromal cells coupled with its overexpression in neoplastic cells. We could not form such correlation since none of DCIS lesion was positive to Gal-1. We also try to observe an increase in stromal cells expression of Gal-1 on hypoxic microenvironment however, this association also did not proved true.

Gal-3 was overexpressed on hypoxic group like observed on melanoma cell in a vitro hypoxic model. As Galectin-3 is frequently involved with protection against cell

death<sup>23</sup>, this molecule may play an important role in cancer survive and resistant to many therapy approaches on hypoxia microenvironment. In this sense inhibition of Gal-3 represent a promising strategy to sensitize these cells to death.

Our study shows that Gal-3 and ConA, UEA I and WGA ligands are overexpress on hypoxic environment and Gal-1 and PNA ligands are not. As far as we are concerned this is the first paper to describe glycobiological alterations in breast cancer hypoxic environment *in vivo* that could be used to validate *in vitro* models that tries to modulate Gal-3 and others glycobiological aspects of breast cancer. Moreover open new ways to use this data to correlate with patient prognostic since comedonic carcinomas, usually hypoxic because of central necrosis, were associated with poor-prognostic than others.

### **Acknowledgement**

Authors thank to CNPq and FACEPE for financial support and Dr Ana Lúcia Porto, MD for the diagnosis review and Pathology assistance.

## References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010) GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- 2 Ernster VL, Ballard-Barbash R., Barlow WE, Zheng Y, Weaver DL, Cutter G., Yankaskas BC, Rosenberg R, Carney PA, Kerlikowske K, Taplin SH, Urban N, Geller BM. (2002) Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. J Natl Cancer Inst,94:1546-1554.
- 3 Ruan K, Song G, Ouyang G (2009). Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. J Cell Biochem 107(6):1053 -1062.
- 4 Bussolati G, Bongiovanni M, Cassoni P, Sapino A (2000) Assessment of necrosis and hypoxia in ductal carcinoma in situ of the breast: basis for a new classification. Virchows Arch 437(4):360-4.
- 5 Cosse JP, Michiels. C, (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. Anticancer Agents Med Chem 8 790-797.

6 Moeller. BJ, Richardson RA, Dewhirst MW, (2007) Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 26 241-248.

7 Shirato K, Nakajima K, Korekane H, Takamatsu S, Gao C, Angata T, Ohtsubo K, Taniguchi N. (2011) Hypoxic regulation of glycosylation via the N acetylglucosamine cycle. *J Clin Biochem Nutr* 48(1):20-5.

8 Taniguchi N (2009) From the gamma-glutamyl cycle to the glycan cycle: a road with many turns and pleasant surprises. *J Biol Chem* 11;284(50):34469-78.

9. Vasta GR, (2012) Galectins as pattern recognition receptors: structure, function and evolution. *Adv Exp Med Biol* 946: 21-36.

10 Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem* 113: 236-54.

11 Olbryt M, Jarzab M, Jazowiecka-rakus J, Simek K, Szala S, Sochanik A (2006) Gene expression profile of B 16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene Expr* 13(3):191-203.

12 Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ, Giaccia AJ, Koong AC (2005) Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol* 23(35): 8932-41.

13 Goetz JA., Mechref Y, Kang P, Jeng MH., Novotny MV (2009) Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells *Glycoconj J* 26:117–31.

14 Powlesland AS, Hitchen PG, Parry S, Graham SA., Barrio MM., Elola MT, Mordoh J, Dell A, Drickamer K, Taylor ME (2009) Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiol* 19:899–909.

15 Ono M., Hakomori S. (2004) Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj J* 20:71-78.

16 Shimma Y, Jigami Y (2004) Expression of human glycosyltransferase genes in yeast as a tool for enzymatic synthesis of sugar chain. *Glycoconj J* 21:75-78.

17 Shinji G, Chihiro S, Jun Y, Reiji K, Ken K (2007) Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357(2):7537-542.

18 Koike T, Kimura N, Mlyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, chen J, et al (2004). Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link

between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. Proc Natl Acad Sci U S A 101(21):8132-7.

19 Suzuki O, Nozawa Y, Kawaguchi T, Abe M (2003) Alpha-2,6-sialylation of L-PHA reactive oligosaccharides and expression of N-Acetyl-glucosaminyl transferase V in human diffuse large B cell lymphoma. Oncol Rep 10(6):1759-64.

20. Yin J, Hashimoto A, Izawa M, Miyazaki K, Chen GY, Takematsu H, Kozutsumi Y, Suzuki A, Furuhashi K, Cheng FL, Lin CH, Sato C, Kitajima K, Kannagi R (2006) Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. Cancer Res 66(6):2937-45.

21. Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler (2009) Essentials of Glycobiology, 2nd edition Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

22. Jung EJ, Moon HG, Cho BI, Jeong CY, Joo YT, Lee YJ, Hong SC, Choi SK, Ha WS, Kim JW, Lee CW, Lee JS, Park ST (2007) Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. Int J Cancer 120(11): 2331-8.

23. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A (1997) Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 57(23):5272-6.

### Figure Legends

Figure 01: Lectins staining pattern in hypoxic breast DCIS. A) ConA cytoplasmatic, 100x. B) WGA cytoplasmatic, 100x. C) WGA membrane staining in non-hypoxic lesion, 400x D) UEA-I, 100x, staining hypoxic DCIS but not no-hypoxic below (arrow). E) PNA staining in perinecrotic cell of hypoxic DCIS, 100x. F). Gal-3 expression in hypoxic group, arrow indicates absence of staining in a no-hypoxic lesion area.

Figure 02: Positive and Negative lesion of DCIS in hypoxic and non-hipoxic group. \*\*  
p<0.01 \*\*\*p<0.001

Figure 01

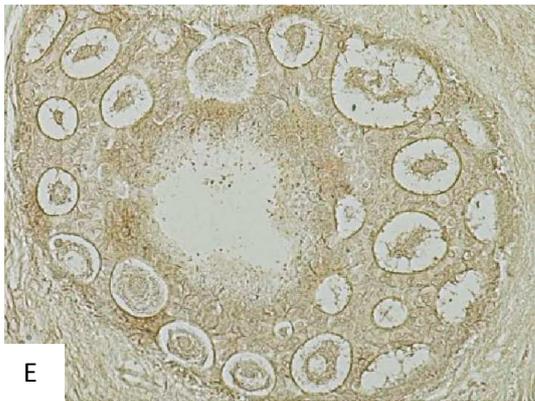
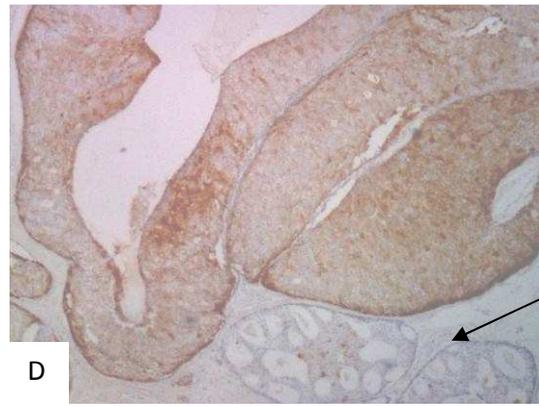
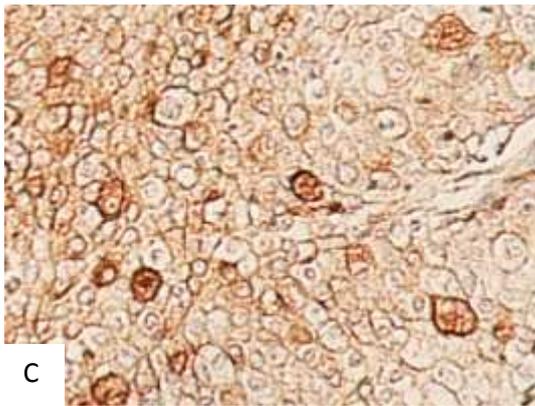
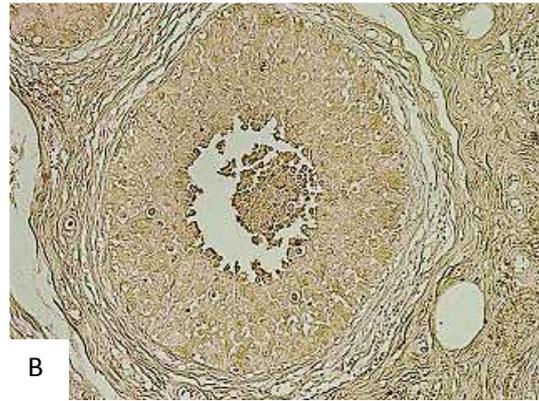
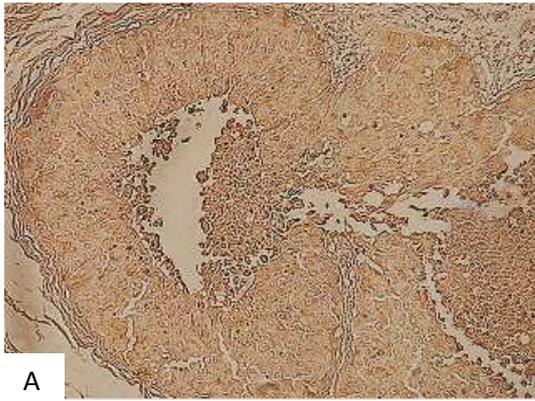
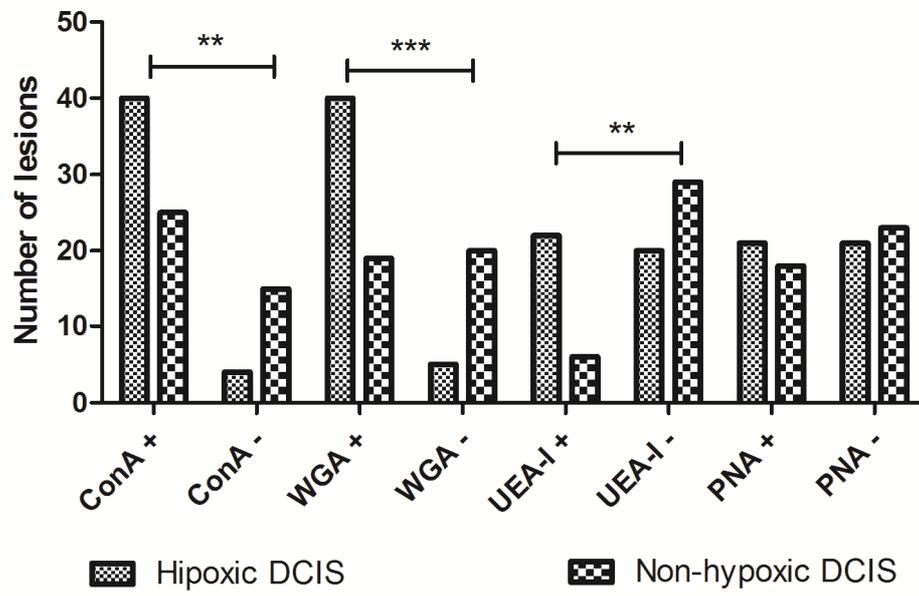


Figure 2



### 4.3 Artigo 3

GLYCOBIOGIC PROFILE IS ALTERATED IN BREST CANCER PATIENTS WITH  
HYPOXIC REGIONS: IMPLICATIONS IN  
DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND TUMOR BEHAVIOR

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1\*</sup>; Antônio Felix<sup>1</sup>; Petra Barros Santos<sup>1</sup>; Roger  
Chammas<sup>2</sup>; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>1,3</sup>

1 Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami da  
Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

2 Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo (FM/USP).

3 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

\* Correspondence to:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, 50670-901

Recife- PE- BRAZIL

E-mail: moacyr.rego@gmail.com

**Resumo:**

Este artigo objetivou analisar a expressão de Galectina-1, Galectina-3, Ácido siálico e  $\beta$ 1-6 branched glycan structures em ambientes hipóxicos de pacientes com Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) de mama. Para isso 86 amostras de pacientes com CDI foram submetidas a histoquímica com lectinas para L-PHA e SNA e imunohistoquímica para, Gal-1, Gal-3, CAIX e HIF-1 $\alpha$  além de RE, RP, HER-2. Nossos resultados mostram que as pacientes positivas para os marcadores de hipóxia em sua maioria são do tipo basal, negativas para receptor de estrógeno ( $p=0,0003$ ) e com comprometimento nodal maior que o grupo controle ( $p=0.0439$ ). O padrão glicobiológico dessas pacientes expressava mais Gal-3 ( $p=0.0021$ ) e ligantes de SNA ( $p=0.0498$ ). Dentro do grupo positivo para marcadores de hipóxia não houve associação da marcação de galectinas e lectinas com dados clínicos e histopatológicos ( $p>0.05$ ). Entretanto foi possível observar nesse grupo o aumento da marcação nuclear de Gal-3, que esta relacionada ao mau prognóstico em câncer de mama, assim como, o aumento da sialilação que esta relacionada com proteção a morte celular. Os nossos resultados sugerem um perfil glicobiológico alterado nas áreas de hipóxia e ratifica a necessidade do desenvolvimento de um modelo reprodutível *in vitro* para avaliar a participação dessas moléculas no comportamento do ambiente tumoral hipóxico.

**Palavras-chave:** Galectinas, ligantes de lectinas e Hipóxia.

## Introdução

As neoplasias mamárias assim como na maioria dos tumores sólidos, possuem regiões centrais que não são irrigadas adequadamente estabelecendo um ambiente hipóxico e privado de nutrientes geralmente peri-necrótico (RUAN *et al*, 2009). As células que sobrevivem a esse ambiente adverso são normalmente responsáveis por resistência à radioterapia e quimioterapia (MOELLER *et al*, 2007; COSS *et al*, 2008). O fator induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é o principal modulador dessa condição e é descrito como uma proteína produzida constitutivamente e cujo acúmulo é estimulada pela baixa disponibilidade de oxigênio, que ocorre normalmente há uma distância maior que 180 $\mu$ m do vaso sanguíneo (ADAMS *et al*, 2009).

HIF-1 $\alpha$  está relacionada à progressão tumoral e angiogênese, participando do controle da expressão de uma variedade de genes envolvidos na adaptação à deficiência de oxigênio e nutrientes que levam à sobrevivência celular, inibição da apoptose e indução de migração (SEMENZA 2003; POWIS & KIRKPATRICK 2004). Entre eles CA IX (Carbonic Anhydrase IX – Anidrase Carbônica – IX) e GLUT1 (Glucose Transporter 1 – Transportador de Glicose 1) cruciais no processo de adaptação celular que ocorre pela alteração do metabolismo energético destas células, as quais passam a apresentar altas taxas de glicólise anaeróbia ( POWIS & KIRKPATRICK 2004; SEMENZA 2003; ADAMS *et al*, 2009; RUAN *et al*, 2009).

Essa mudança no perfil metabólico é acompanhada não apenas da expressão alterada das enzimas envolvidas na glicólise aeróbica e anaeróbica, mas também na síntese de açúcares-nucleotídeo e transportadores de carboidratos (SHIRATO *et al*, 2010). Essas alterações aumentam o número de moléculas desviadas da via

glicolítica para via das hexoaminas e ciclo da N-Acetil-glicosamina alterando componentes chaves da glicosilação celular como, por exemplo, a disponibilidade de substrato para as glicosiltransferases (TANIGUSHI, 2009).

A hipóxia, além de induzir a expressão de moléculas de adaptação e alterar o comportamento celular, também está relacionada com a expressão de de Galectina-3 (Gal-3), uma proteína que parece ter um papel pró-neoplásico nesse ambiente (OLBRYT *et al*, 2006; ZENG *et al*, 2007). Porém pouco ainda se sabe sobre os aspectos glicobiológicos do ambiente hipóxico do câncer de mama e suas possíveis implicações

Por isso esse trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de galectina-1 (Gal-1) e Gal-3 bem como o perfil de ligantes de SNA e L-PHA no ambiente hipóxico do Carcinoma Ductal Invasivo (CDI) de mama. Também foi avaliado o possível valor diagnóstico e prognóstico da marcação dessas moléculas em amostras tumorais de pacientes positivas e negativas para marcadores de hipóxia.

## **Materiais e Métodos**

### **Seleção de Casos**

Foram selecionadas 86 biópsias de pacientes com CDI do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) no período entre 2002 e 2010. Foram utilizadas as bordas livres de tumor, bem como, 10 biópsias de mastoplastia redutora como controle normal. Como critério de exclusão utilizou-se a presença de carcinoma inflamatório ou medular e idade da paciente (< 30 anos). Do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do HC-UFPE foram retiradas as informações clínicas e histopatológicas das pacientes. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa humana da Universidade Federal de Pernambuco.

Para melhor compreender os aspectos glicobiológicos do ambiente hipóxico as pacientes de CDI foram divididas em dois grupos: amostras positivas para HIF-1 $\alpha$  e CAIX em áreas perinecróticas tumorais (hipóxia), e amostras negativas para os marcadores HIF-1 $\alpha$  e CA IX (controle).

### **Histoquímica com Lectinas**

Cortes com 4 $\mu$ m de espessura das amostras dos pacientes selecionados foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol decrescente (100% a 70%). Em seguida foram tratados com tripsina, submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena e incubados com as lectinas biotiniladas SNA: Aglutinina da *Sambucus nigra*; L-PHA lectina fitoemaglutinina (20 $\mu$ g/mL) por 2 h 25°C e 1 h com streptavidina-peroxidase. O excesso dos reagentes previamente utilizados foi retirado com dois banhos do tampão PBS de 5min, à revelação feita com

diaminobenzidina-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o núcleo contra-corado com hematoxilina. Tecidos previamente conhecidos como positivos para a lectina foram utilizados como controles positivos. Já o controle negativo foi obtido substituindo a lectina por PBS e inibindo a lectina com seu açúcar específico na concentração de 300mM.

### **Imunohistoquímica**

Cortes com 4µm de espessura de biópsias de CDI foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, para então os cortes histológicos serem incubados com os anticorpos primários (Tabela 1) por 2h a 37°C. Para visualização da reação foi utilizado o sistema de revelação de polímero livre de biotina (DAKO) e DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante de anticorpo e para controle negativo o anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Para a avaliação dos receptores hormonais, foi usado o sistema de escore proposto por Allred e colaboradores (1998) que avalia a proporção de núcleos corados e a intensidade de marcação. A análise do HER2 seguiu os critérios adotados pelo Consenso da American Society of Clinical Oncology e College of American Pathologists (2007), onde são consideradas a intensidade de marcação da membrana e a porcentagem de células marcadas. A marcação de CA IX foi considerada positiva quando houve qualquer marcação de membrana já HIF-1 $\alpha$  quando havia marcação nuclear em mais de 10% das células analisadas(Zanetti et al, 2011). Gal-1 e Gal-3 foram consideradas positivas quando 10% das células apresentaram alguma marcação independentemente do compartimento celular.

Tabela 1: Parâmetros de uso dos anticorpos na Imunohistoquímica.

Anticorpo primário	Fonte	Diluição
RE	Santa Cruz	1:100
RP	Santa Cruz	1:150
HER-2	DAKO	1:400
GAL-3	Spring	1:150
M338	Hibridoma	1:20
GAL-1	Santa Cruz	1:100
CAIX	Santa Cruz	1:150
HIF-1 $\alpha$	Santa Cruz	1:100

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; HER-2: Receptor Epidermal Humano 2; Gal-3: Galectina 3; M338: nome dado ao hibridoma produtor de anticorpo anti-N-terminal de Gal-3; Gal1: Galectina 1; CAIX: Anidrase Carconica nove; HIF-1 $\alpha$ ; Fator Induzido por hipóxia.

### Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 4.0. Para avaliação dos dados não-paramétricos foi utilizado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram repetidos três vezes para a consideração dos resultados.

## Resultados

*O ambiente hipóxico nas amostras tumorais é predominantemente do subtipo Basal e estão associadas a invasão linfonodal e negatividade para o receptor de estrógeno*

As 86 amostras selecionadas foram submetidas à IHQ para HIF-1 $\alpha$  e CAIX para confirmação do estabelecimento do ambiente hipóxico. Vinte amostras foram positivas para os marcadores de hipóxia apresentando marcação nuclear para HIF-1 $\alpha$  e de membrana para CAIX ( $p < 0.001$ ). Sessenta e seis amostras de pacientes foram negativas para os marcadores de hipóxia e então consideradas como grupo controle. Este grupo controle teve uma média de idade mais baixa e uma população mais homogênea para esse parâmetro  $50,5 \pm 5,2$ . Já o grupo positivo para CAIX (Figura 1) teve uma média de idade maior e uma população mais heterogênea para esse parâmetro  $58,6 \pm 15,0$  (PALOMA-POSMENOPAUSA). As demais características clínicas e histopatológicas dos grupos encontram-se resumidas na Tabela 2.

Nas análises dos marcadores diagnósticos e preditores de tratamento (RE, RP e HER-2), pode-se observar que não houve uma relação na diferença de positividade entre os grupos analisados ( $p > 0.05$ ). Contudo foi possível observar uma relação inversa entre RE e o grupo positivo para CAIX ( $p = 0.03$ ). Na análise dos subtipos clínicos moleculares luminal, triplo negativo, Basal e que superexpressa HER-2 não foi possível estabelecer uma relação estatística entre a positividade para os marcadores de hipóxia e o subtipo molecular do paciente ( $p > 0.05$ ). Apesar da diferença não ser significativa, foi possível observar que a população positiva para

CAIX foi predominantemente do tipo Basal (60%), sendo o restante da população 15% luminal, 20% triplo negativo e 5% que superexpressa Her-2. No grupo controle 57% era do tipo Luminal, 18% triplo negativo 18% Basal e 7% que superexpressa Her-2. Os correlações diagnósticas e prognósticas encontram-se resumidas na tabela-2.

Tabela 02: Características clínico-histopatológicas dos grupos positivos e negativos para marcadores de hipóxia.

Parâmetro	CDI CAIX -	CDI CAIX +	Valor de p
<b>Tamanho do Tumor</b>			
pT1	20 (30,3%)	02 (10%)	p>0.05
pT2	30 (45,5%)	10 (50%)	
pT3	04 (6,09%)	06 (30%)	
pT4	12 (18,2%)	02 (10%)	
<b>Metástase Linfonodal</b>			
Sim	22 (44,82%)	17( 65%)	P=0.0439
Não	44 (54,02)	03 (35%)	
<b>Grau Histológico</b>			
1	15 (22,72%)	03(15%)	p>0.05
2	24 (36,36%)	05(25%)	
3	27 (40,92%)	12(60%)	
<b>Marcadores</b>			
<b>Imunohistoquímicos</b>	22 (46,8%)	04 (20%)	P=0.0003
RE +	22 (46,8%)	13 (65%)	
RP +	03 (6,4%)	03 (15%)	
HER-2 +			

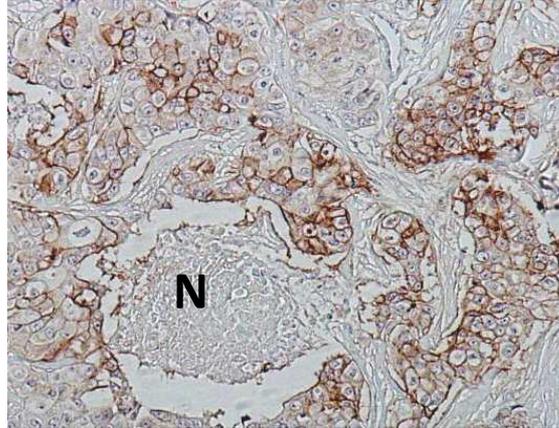


Figura 01: Marcação membranar de CAIX (seta) com N indicando o núcleo necrótico. aumento de 100x.

*Há um aumento da expressão de Galectina-3 e ligantes de SNA nas pacientes positivas para marcadores de hipóxia –paloma – Ikembar-pós-menopausa*

SNA mostrou reconhecer mais ligantes no grupo positivo para os marcadores de hipóxia ( $p=0.0498$ ) que no grupo controle. Já para ligantes de L-PHA não houve correlação significativa ( $p=0.39$ ) (Figura 2). Não foi observada positividade para Gal-1 nas células neoplásicas dos dois grupos analisados, porém foi observada uma marcação nas células do estroma associadas ao tumor (Figura 2A), porém, sem diferença entre grupo hipóxico e o controle.

Com um intuito de analisar um possível papel da gal-1 no micro ambiente dessas lesões o número de células positivas, em 10 campos aleatórios na objetiva de 40x, foi contado nos grupos hipóxicos e controle para avaliar se haveria uma relação de positividade estromal de Gal-1, agressividade tumoral, e hipóxia, todavia essa conexão não foi estabelecida.

Foi observado que para o anti-Gal-3 ocorre um aumento do reconhecimento do grupo positivo para CA IX em relação ao controle ( $p=0.0021$ ) acompanhado por uma mudança na localização subcelular na marcação da Gal-3 (Figura 1B) que nesse grupo é também nuclear. A figura 3 resume a relação da porcentagem de lesões para os marcadores glicobiológicos em relação aos grupos de estudo.

Quanto ao M338 (reconhecedor de N-terminal) observou-se uma tendência ao aumento na marcação citoplasmática acompanhada ou não de marcação nuclear, porém o número de casos positivos para esse anti-corpo foi muito baixo. A mesma análise de sublocalização celular foi feita para as lecinas L-PHA e SNA (Figuras 1C e 1D) onde para SNA foi possível observar que há uma tendência de migração da marcação do citoplasma e membrana para apenas o citoplasma. Já para L-PHA não há uma alteração significativa, apenas um pequeno aumento da marcação citoplasmática e uma pequena diminuição na co-marcação de citoplasma e membrana.

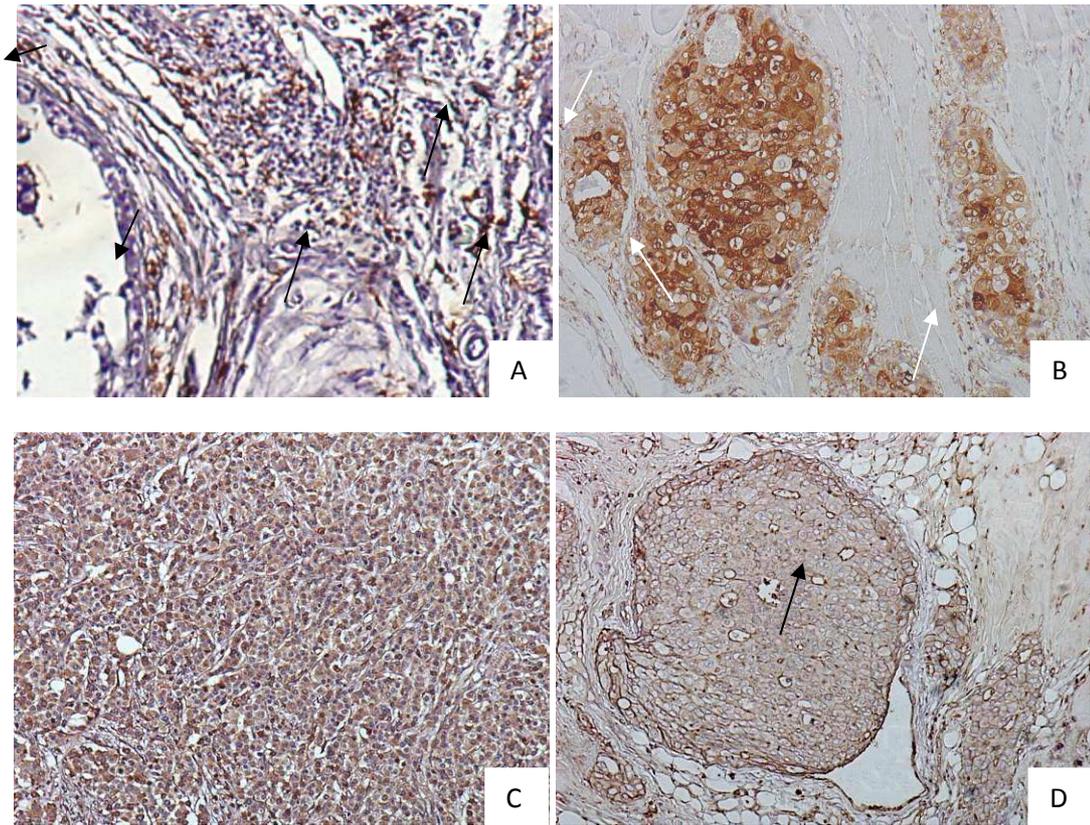


Figura 02: Marcação das lectinas e anticorpos utilizados no estudo. A) Marcação de Galectina-1 nas células do estroma associadas ao tumor (setas). B) Anti-gal-3 reconhece intensamente citoplasma e núcleo as setas indicam a marcação nuclear. C) Positividade citoplasmática para lectina SNA. D) L-PHA reconhece membrana(seta) e citoplasma. Figuras A, B e D apresentam um aumento de 100x e figura C: 200x.

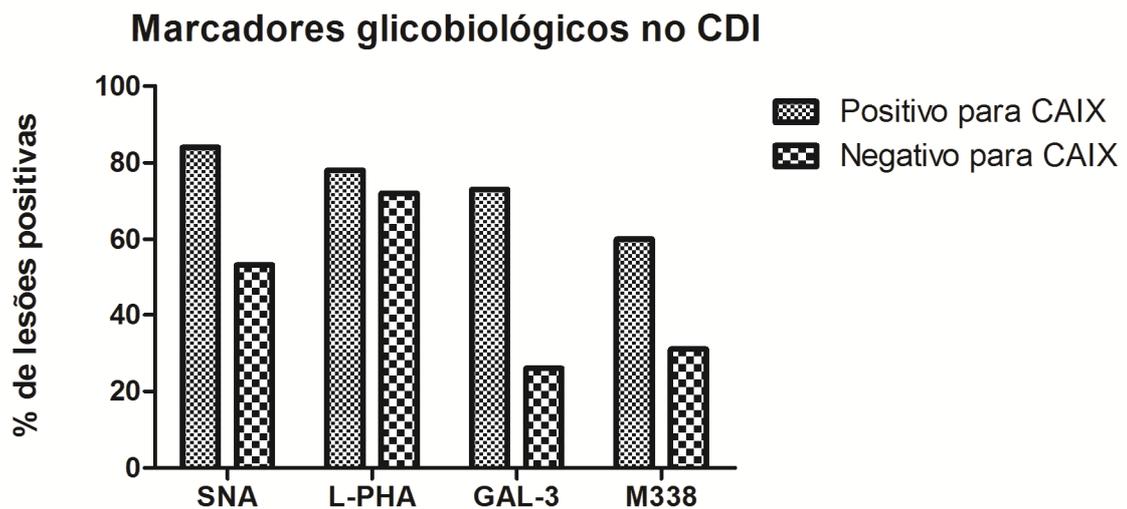


Figura 03: Marcadores glicobiológicos no CDI em relação aos grupos de estudo. SNA L-PHA anti-Gal-3 M338 SNA: Aglutinina da *Sambuco nigra*; L-PHA lectina fitoemaglutinina. M338: nome dado ao hibridoma produtor de anticorpo anti-N-terminal de Gal-3

## Discussão

O microambiente tumoral é altamente complexo, onde há a participação de uma intrincada rede de moléculas que participam de diversos processos que levam a evasão da morte celular, auto-suficiência de sinais de crescimento, falta de sensibilidade a sinais anti-proliferativos, invasão tecidual e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese (HANAHAN & WENBERG, 2011). Todas essas características do podem ser influenciadas e potencializadas pela hipóxia (RUAN *et al*, 2009) que altera a expressão de muitas moléculas. Entre estas estão a Gal-3 e a Gal-1, que parecem modular muitas destas características tumorais, demonstrando um papel chave no desenvolvimento de neoplasias (RABINOVITCH, 2011).

Nas amostras de CDI houve marcação de Gal-1 nas células estromais associadas ao tumor, porém não houve uma diferença significativa entre os grupos hipóxicos e controle ( $p > 0.05$ ). Diferindo de glioblastoma onde essa proteína está associada a evolução clínica do paciente (JUNG *et al*, 2007). Diferença maior pode ser observada em estudos câncer de cabeça e pescoço que estabeleceram o papel da Gal-1 na hipóxia onde esta proteína representando uma ligação entre privilégio imune tumoral e hipóxia (Le *et al*, 2005). Gal-1 induz morte em linfócito T e a expressão dessa proteína no estroma mostra-se inversamente proporcional a marcação de CD3 (Le *et al*, 2005) Deve-se interpretar esses dados com cuidado, já que, no estudo supracitado a marcação de Gal-1 é parenquimal e no nosso estudo é estromal.

Gal-3 mostrou-se superexpressa nas amostras de CDI positivas para os marcadores de hipóxia ( $p = 0.0021$ ) com um aumento na localização nuclear.

Marcação nuclear de Gal-3 está associada com tumores mais agressivos e de pior prognóstico (MOISA *et al*, 2007). Estudos relatam que Gal-3 é requerida num primeiro momento da carcinogênese mamária e tem sua expressão diminuída com a progressão tumoral (CASTRONOVO *et al*, 1996; SHEKRAR *et al*, 2004). Porém a utilização do número baixo de amostras, de anticorpos policlonais torna os resultados questionáveis além de que a fosforilação galectina pode mascarar seus sítios antigênicos (BALAN *et al*, 2010).

Outro resultado bastante interessante foi a baixa positividade obtida pelo anticorpo M338 que pode ser explicada por clivagem da região N-terminal por metaloproteinases de matriz bem como por fosforilação dessa estrutura (OCHIENG *et al.*, 1998; BALAN *et al*, 2010). Em ambientes limites, como áreas necróticas, Gal-3 e seus ligantes já foram descritos como superexpressos em amostras de pacientes com glioblastoma em uma área conhecida como pseudopaliçada que são encontradas nos astrocitomas e glioblastomas multiformes (IKEMORY, 2009).

Nas amostras de CDI foi observado que as pacientes positivas para CAIX possuem fenótipos tumorais e características clínicas mais agressivas e está de acordo com resultados prévios obtidos por TAN *et al*, (2009) e CHAUDARY *et al*, (2007). Além disso CA IX é indicador de resistência a quimioterapia e terapia hormonal no ambiente hipóxico, por isso, já está sendo alvo de terapias hipóxia-específicas (Generali *et al*, 2006; Lou *et al* 2011).

Nossos resultados também mostram uma significativa negatividade para receptor de estrógenos nos casos positivos para os marcadores de hipóxia ( $p=0003$ ) que normalmente estão associados a um pior prognóstico (AGURS-COLLINS *et al*, 2010). Isto pode estar relacionado com mecanismos já descritos na literatura que

mostram que HIF-1  $\alpha$  induz degradação do RE em hipóxia via proteassoma, bem como diminui sua transcrição, por diminuir o recrutamento da RNAPol II na região promotora do loco ESR1 (RYU *et al*, 2011). A esse resultado soma-se o fato da maior parte da população positiva para hipóxia pertencer ao subtipo basal, mais agressivo e frequentemente associado à invasão nodal (HAUPT *et al*, 2010).

Foi observado um aumento relativo na expressão de ligantes de SNA no grupo positivo para os marcadores de hipóxia. O padrão clássico observado pelas lectinas que reconhecem resíduos de ácido siálico nos tumores (WANG *et al*, 2008) se deve ao aumento do conteúdo desse monossacarídeo na superfície celular que diminui a interação da célula com a matriz facilitando a metástase e promovendo um escape do sistema imunológico, por isso a positividade para essas lectinas esta associada a um mau prognóstico no câncer de mama (CHEN *et al*, 2010). Além disso, os casos que foram negativos para L-PHA foram positivos para SNA, o que sugere que a lectina não reconhece seu ligante por causa do impedimento pelo ácido siálico. Essa informação já foi confirmada em linfomas de células B que tinham os ligantes de L-PHA mascarado por ácido siálico em ligação  $\alpha 2-6$  (SUZUKI *et al*, 2003) que é a reconhecida por SNA.

Nossos resultados são os primeiros na literatura a analisar o perfil glicobiológico no ambiente hipóxico em amostras de câncer de mama bem como relacionar esse dados com marcadores de diagnóstico e prognósticos. Porém, fica claro a necessidade do estabelecimento de modelos *in vitro* reprodutíveis para que possam ocorrer interferências no sistema e a avaliação do real papel da expressão alterada de galectinas e ligantes de lectinas, nesse ambiente, seja estabelecida.

## **Agradecimentos**

A CAPES, FACEPE e CNPq pelo suporte financeiro e Carmelita

## **Referência Bibliográficas**

ADAMS. J.M, DIFAZIO L.T, ROLANDELLI R.H, LUJÁN J.J, HASKÓ. G, CSÓKA. B, SELMECZY. Z, NÉMETH. Z.H, HIF-1: a key mediator in hypoxia, Acta Physiol Hung. 2009 96:19-28.

AGURS-COLLINS T, DUNN BK, BROWNE D, JOHNSON KA, Lubet R. Epidemiology of health disparities in relation to the biology of estrogen receptor-negative breast cancer. Semin Oncol. 2010 ;37(4):384-401.

ALLRED DC, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol. 1998 11(2):155-68.

BALAN V, NANGIA-MAKKER P, JUNG YS, WANG Y, RAZ A Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. Biochim Biophys Acta. 2010 Oct;1803(10):1198-205

CASTRONOVO V, VAN DEN BRÛLE FA, JACKERS P, CLAUSSE N, LIU FT, GILLET C, SOBEL ME. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. J Pathol. 1996 May;179(1):43-8.

CHAUDARY N, Hill RP Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis.* 2007; 26:55-64.

CHEN CHI-LONG, JAN-SHOW CHU, WU-CHOU SU, SOON-CEN HUANG, WEN-YING LE. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch.* 2010 457(1):53-61

COSSE JP, MICHELS C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:790-797

GENERALI D, FOX SB, BERRUTI A, BRIZZI MP, CAMPO L, BONARDI S, WIGFIELD SM, BRUZZI P, BERSIGA A, ALLEVI G, MILANI M, AGUGGINI S, DOGLIOTTI L, BOTTINI A, HARRIS AL. Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006 13(3):921-30.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* 144(4), 2011- 646-674.

IKEMORI, R. Y. 2009. Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão da galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas”, Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP

LE QT, SHI G, CAO H, NELSON DW, WANG Y, CHEN EY, ZHAO S, KONG C, RICHARDSON D, O'BYRNE KJ, GIACCIA AJ, KOONG AC. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol.* 2005 10;23(35):8932-41.

LOU Y, MCDONALD PC, OLOUMI A, CHIA S, OSTLUND C, AHMADI A, KYLE A, AUF DEM KELLER U, LEUNG S, HUNTSMAN D, CLARKE B, SUTHERLAND BW, WATERHOUSE D, BALLY M, ROSKELLEY C, OVERALL CM, MINCHINTON A, PACCHIANO F, CARTA F, SCOZZAFAVA A, TOUISNI N, WINUM JY, SUPURAN CT, DEDHAR S. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* 2011 171(9):3364-76.

MOISA A, FRITZ P, ECK A, WEHNER HD, MÜRDTER T, SIMON W, GABIUS HJ. Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4B):2131-9.

MOELLER. B.J, RICHARDSON R.A, Dewhirst M.W, Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 26:241-248.

OLBRYT M, JARZAB M, JAZOWIECKA-RAKUS J, SIMEK K, SZALA S, SOCHANIK A. Gene expression profile of B 16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene Expr.* 2006 13(3):191-203.

OCHIENG J., GREEN B., EVANS S., JAMES O. AND WARFIELD P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1998 1379:97-106.

POWIS G, KIRKPATRICK L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 2004 3:647–654.

REGO, M. J. B. M.; CAVALACANTI, C. L. B.; BELTRÃO, E. I. C. & SOBRAL, A. P. V. Histochemical localization of carbohydrates in morphological stages of developing human minor salivary glands: a comparative study with cytoskeletal markers. *Int. J. Morphol.* 2011 29(2):604-613.

RUAN K, SONG G, OUYANG G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* 2009 107(6):1053-1062.

RYU K, PARK C, JOO-LEE Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogenreceptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2011 407:831–836.

SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct;3(10):721-32.

SHEKHAR MP, NANGIA-MAKKER P, TAIT L, MILLER F, RAZ A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *Am J Pathol*. 2004 Dec;165(6):1931-41.

SHIRATO K, NAKAJIMA K, KOREKANE H, TAKAMATSU S, GAO C, ANGATA T, OHTSUBO K, TANIGUCHI N. Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Jan;48(1):20-5.

SOBRAL, A. P. V.; RÊGO, M. J. B. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Science*, 2010 52(1): 49-54.

SUZUKI O, NOZAWA Y, KAWAGUCHI T, ABE M. Alpha-2,6-sialylation of L-PHA reactive oligosaccharides and expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in human diffuse large B cell lymphoma. *Oncol Rep*. 2003 10(6):1759-64.

TAN EY, YAN M, CAMPO L, HAN C, TAKANO E, TURLEY H, CANDILORO I, PEZZELLA F, GATTER KC, MILLAR EK, O'TOOLE SA, MCNEIL CM, CREA P, SEGARA D, SUTHERLAND RL, HARRIS AL, FOX SB. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009 Jan 27, 100(2):405-11.

TANIGUCHI N. From the gamma-glutamyl cycle to the glycan cycle: a road with many turns and pleasant surprises. *J Biol Chem.* 2009 11;284(50):34469-78.

WANG Y, AO X, VUONG H, KONANUR M, MILLER FR, GOODISON S, LUBMAN DM. Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *J Proteome Res.* 2008 (10):4313-25.

WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(1):118-45.

ZENG Y, DANIELSON KG, ALBERT TJ, SHAPIRO IM, RISBUD MV. HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. *J Bone Miner Res.* 2007 Dec 22(12):1851-61.

#### 4.4 Artigo 04

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS GLICOBIOLOGICOS NO MICROAMBIENTE  
HIPÓXICO E/OU PRIVADO DE NUTRIENTES DO CÂNCER DE MAMA EM UM  
MODELO *IN VITRO*

EVALUATION OF GLYCOBIOLOGIC ASPECTS IN BREAST CANCER HYPOXIC  
MICROENVIRONMENT BY AN *in vitro* MODEL

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>1\*</sup>; Rafael Iamashita Ikemori<sup>2</sup>;

Roger Chammas<sup>2,3</sup>; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão<sup>1,4</sup>

1 Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE).

2 Laboratório de Investigação Médica 24, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FM/USP).

3 Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP).

4 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

\* Correspondência para:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária

Recife - PE - 50670-901.

BRAZIL

E-mail: moacyr.rego@ufpe.br

## Resumo

Este artigo objetivou analisar aspectos glicobiológicos em ambientes hipóxicos e/ou privados de nutrientes em células de câncer de mama. Para isso a linhagem celular de câncer de mama T47D foi utilizada. Os experimentos de microscopia confocal e de western blotting mostraram que a expressão de Galectina-3 aumenta na condição de hipóxia e privação de nutrientes. Já a Galectina-1 se mostrou negativa em todas as condições avaliadas. A análise de expressão por RT-PCR mostrou que o transcrito de Gal-3 aumenta em mais de duas vezes nas situações de hipóxia, não sendo observada influência da condição de privação de nutrientes visto que não ocorreu a indução da transcrição do gene nessa condição isolada. A expressão de ST6GAL1 foi aumentada na hipóxia diminuindo proporcionalmente no período de 24 a 72h. A avaliação da morte celular, onde as células foram submetidas às condições de hipóxia e/ou privação de nutrientes, empregando seu açúcar específico e o anticorpo M338 (específico para o N-terminal de Gal-3) indicou que não houve correlação entre inibição da Gal-3 via CRD e o aumento de morte celular, contudo houve com o anti-M338. Lectin blotting com L-PHA e SNA mostrou que o padrão de ligantes de L-PHA diminuiu em hipóxia e privação de nutrientes, diferente de SNA cuja marcação foi mais intensa na hipóxia e mais fraca na privação de nutrientes. Os resultados revelam um aumento na expressão de Gal-3 na hipóxia e sugerem que esta molécula pode participar da proteção a morte celular nesse ambiente via N-terminal. Os resultados também mostraram um aumento da sialilação nesse ambiente que podem estar mascarando os ligantes de L-PHA e sugerem que ST6Gal1 não é a principal sialiltransferase envolvida nesse evento.

**Palavras-chave:** Hipóxia, Galectina-3, ligantes de lectinas

## Introdução

A hipóxia via Hif-1 $\alpha$  é moduladora de muitos aspectos no microambiente tumoral perinecrótico tornando as células mais agressivas e aumentando seu poder de invasão e metástase (COSSE *et al*, 2008; Ruan *et al*, 2009). Nesse ambiente a célula sofre uma alteração no seu metabolismo energético para obtenção de energia principalmente por glicólise anaeróbica e também para resistir a um ambiente mais ácido (Chen *et al*, 2011; Ruan *et al*, 2009). A alteração genotípica e fenotípica da célula para resistir a esse ambiente adverso é freqüentemente indutiva de resistência a quimioterapia e radioterapia (MOELLER *et al*, 2007; COSSE *et al*, 2008).

Essa mudança no perfil metabólico é acompanhada não apenas da expressão alterada das enzimas envolvidas na glicólise aeróbica e anaeróbica, mas também na síntese de açúcares-nucleotídeo e transportadores de carboidratos (SHIRATO *et al*, 2010). Essas alterações aumentam o número de moléculas desviadas da via glicolítica para via das hexoaminas e ciclo da N-acetil-glucosamina alterando componentes chaves da glicosilação celular como, por exemplo, a disponibilidade de substrato para as glicosiltransferases (TANIGUSHI, 2009); conseqüentemente alterando a disponibilidade de ligantes de galectinas.

Há alguns anos trabalhos vem estudando a expressão de Galectina-3 (Gal-3) e Galectina-1 (Gal-1) no ambiente hipóxico em modelos *in vitro* no intuito de mimetizar o ambiente peri-necrótico nos tumores sólidos (OLBRYT *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2007; ZHAO *et al*, 2010). Porém no ambiente tumoral *in vivo* a hipóxia é acompanhada de privação de nutrientes, pois é decorrente de uma má irrigação da parte central do tumor, e freqüentemente nos modelo *in vitro* a privação de

nutrientes não é avaliada em estudo de expressão de Gal-3 e Gal-1 nesses ambientes (OLBRYT *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2010).

Este trabalho objetivou avaliar aspectos glicobiológicos em um modelo *in vitro* utilizando células T47D de câncer de mama em câmara de hipóxia em condições privadas ou não de nutrientes. Os aspectos glicobiológicos avaliados incluíram a expressão de Gal-3, Gal-1 e ligantes de L-PHA, SNA e Gal-3, bem como, a distribuição dessas moléculas nos compartimentos celulares.

## **Materiais e Métodos**

### **Cultivos das células**

As células da linhagem T47D (Positiva para Receptor de Estrógeno e com baixa capacidade de metástase) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, p/v) (Cultilab), 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e Bicarbonato de Sódio 24 mM em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o repique destas culturas foi utilizado Tripsina-EDTA (0,05%).

### **Ensaio de exposição em câmara de hipóxia**

As células T47D foram incubadas em câmara de hipóxia (Billupus-rothenberg – Modular Incubator Chamber) durante 10min em atmosférica hipóxica recebendo 19L/min de N<sub>2</sub> e 1L/min de CO<sub>2</sub> sendo a concentração de oxigênio monitorada em tempo real através de um detector de oxigênio (PAC 3000, Draeger,) para garantir uma pO<sub>2</sub><1,5%. Após a pO<sub>2</sub> desejada ter sido alcançada a câmara foi vedada e as células ficaram submetidas ao ambiente hipóxico durante 24, 48 e 72h. Para mimetizar a privação de nutrientes as células foram incubadas em meio RPMI contendo apenas 1% de soro fetal bovino (p/v). Foram criadas quatro condições de estudo: Normóxia com 10% de SFB (N10); Normóxia com 1% de SFB (N1); Hipóxia com 10% de SFB (H10) e Hipóxia com 1% de SFB (H1) que foram submetidos a essas condições nos três intervalos de tempo.

### **Microscopia Confocal e Imunofluorescência**

Cerca de  $4 \times 10^3$  de células T47D foram plaqueadas em placa de 24 poços nas condições e intervalos de tempo estabelecidos para o estudo, sendo no final incubado com Mitotracker (1:2000, Invitrogen) por 45 min. As células foram fixadas em 3,5% de formaldeído em PBS e em seguida, após serem lavadas três vezes com PBS (tampão fosfato de sódio 7,2mM, suplementado com NaCl 15mM), foi adicionado Triton X-100 0,2%/PBS por 5 min. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 1 h. Posteriormente foi adicionado o anticorpo primário monoclonal anti Gal-3(1:20), anti-Gal-1(1:100), anti- $\beta$ -catenina (1:150) diluídos em PBS/BSA 5% por 18h a 4°C. Depois de lavadas três vezes com PBS/BSA 1%, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com Alexa Flúor 488, de acordo com a origem do anticorpo primário. Após serem lavadas novamente com PBS/BSA 1%, foi adicionado DAPI para contra-coloração do nucleo por 15 min diluído em PBS/BSA 5% e por último, foram montadas as lâminas. Para avaliar co-localização com vacúolos autofágicos as células foram submetidas previamente a um tratamento com Monodancilcadeverina a 25 $\mu$ M. A análise foi realizada em microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta/UV.

### **Análises de expressão gênica por PCR em tempo real**

As células T47D foram plaqueadas em placas de seis poços e expostas à normóxia e hipóxia em meio completo (10%) ou privado (1%) de soro fetal bovino (p/v). Ao final do tratamento, seu mRNA foi extraído (Tri-Reagent) e seu cDNA sintetizado (Superscript). Para a reação de qRT-PCR, foi utilizado o *SYBR-Green* e

os dados de quantificação obtidos foram analisados pelo *software* de análise do aparelho RT-PCR 7900 (AB). A expressão diferencial da Gal-3, Gal-1 e St6gal1 (transcritos alvos) foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador ( $\beta$ -actina). Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001).

### **Ensaio de morte celular**

Cerca de  $1 \times 10^5$  células foram cultivadas em placas de 6 poços onde foram submetidas as condições e intervalos de tempo do estudo. Depois de realizados os ensaios, as células foram fixadas em etanol 70%, mantidas congeladas até o momento da análise por citometria de fluxo (FACS Calibur BD). O processo de morte foi avaliado pela incorporação de iodeto de propídio, que se incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA de uma população de células.

### **Extrações protéicas**

Para a extração protéica, as células foram tratadas com um tampão detergente descrito por Califice *et al.* (2004) (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 0,1% Triton X-100, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM de PMSF, 2g/mL de aprotinina) por 15 min a 4°C e centrifugado a 15600xg por 10 min. Após esta extração, o sobrenadante foi classificado como de fração citoplasmática e o *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise nuclear (50mM Tris, 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150mM NaCl, 1mM de EDTA, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1mM PMSF e 2 $\mu$ g/mL aprotinina) por 15 min a 4°C e centrifugado a 15.600xg por 10 min, sendo

este novo sobrenadante classificado como de fração nuclear. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando-se o kit Reagente BCA para Ensaio de Proteínas (Lowry modificado – BioAgency).

### **Gel de Poliacrilamida e *Western Blot***

Foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos protéicos foram separadas em gel de poliacrilamida. O gel de corrida contém Tris 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0,03% em N,N,N-tetrametilenodiamina (TEMED, Sigma); e o gel de empilhamento, TRIS 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045%, e TEMED. Em seguida, os extratos protéicos separados foram transferidos para a membrana de PVDF (*Hydrophobic polyvinilidene difluoride*, Amershan) para a realização do *blotting*, sendo feita em tampão Tris 25 mM, metanol 20% por uma hora a 100 V e a 4°C. Posteriormente as membranas foram bloqueadas 1h em em encubadas com os anti-corpos. A membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados com leite seco desnatado 5% (p/v) em PBS–Tween 0,5% e incubada com os anticorpo M338 anti-Gal-3, anti-Gal-1 e anti  $\beta$ -actina, sendo revelados com sistema secundário de anticorpos conjugados a peroxidase. A revelação da membrana foi feita utilizando-se o ECL *western blotting system* da GE. Como controle da reação, foi utilizado um padrão conhecido de peso molecular.

## **Lectin Blot**

Foi realizada uma PAGE 7,5% em condições não desnaturantes e os extratos foram diluídos também em tampão não desnaturante (2x). Após o bloqueio foram realizadas 3 lavagens em PBS/BSA 0,5% e a membrana foi incubada com as lectinas biotiniladas L-PHA e SNA (20 $\mu$ g/mL) durante 2 h. Posteriormente foram realizadas mais três lavagens com PBS/BSA 0,5% e uma nova incubação de 1h foi realizada com o link estrepavidina-peroxidase. Antes da revelação com DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser efetuada a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS/BSA 0,5% e uma ultima lavagem apenas com PBS.

## **Ensaio de ligantes de Galectina-3**

A Gal-3 recombinante conjugada a fosfatase alcalina (Sintetizada no LIM24/FM-USP) foi utilizada como sonda para verificar os ligantes de Gal-3 em membranas de *western blotting* e *in vitro*. O bloqueio para ligações inespecíficas foi realizado com TBS/BSA 5% (p/v) e a reação foi revelada com NBT/BCIP.

## **Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 4.0 utilizando o teste *Two-Way ANOVA*. As correlações com o valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas

## Resultados

*Há um aumento do número de transcritos e superexpressão da proteína Gal-3 em células T47D submetidas à hipóxia e privação de nutrientes*

Para analisar a expressão de Gal-3 nas células de linhagem de mama T47D foram realizados os testes de imunofluorescência para microscopia confocal e western blotting. Em ambos os casos foi utilizado o anticorpo monoclonal de hibridoma M338. A expressão de Gal-3 pareceu ser condição dependente aumentando com o tempo de exposição à hipóxia bem como a privação de nutrientes assim, as células que mais expressavam Gal-3 eram as que estavam em condição de hipóxia e com privação de nutrientes (1% SFB) durante 72h (Figura 01).

Observou-se que a marcação para Gal-3 foi tanto nuclear quanto citoplasmática no controle em normóxia suplementado com 10% de SFB. Comparando-se com as amostras submetidas às situações de hipóxia e privação de nutrientes observou-se um aumento em ambas as marcações, mais notadamente no citoplasma. Para análise de co-localização mitocondrial, vacúolos autofágicos e com  $\beta$ -catenina foi realizado uma co-imunomarcação com Myotracker, mono-dancil-cadaverina e anti- $\beta$ -catenina, respectivamente, sendo as duas primeiras hipóteses refutadas e a última aceita para  $\beta$ -catenina (dados não mostrados). Os resultados do western blotting revelam um aumento proporcional da expressão de galectina-3 com o tempo de hipóxia e a privação de nutrientes (Figura 02).

Galectina-1 se mostrou negativa tanto nos experimentos de microscopia confocal quanto nos de western blotting (dados não mostrados) Para avaliação da

imposição das condições no estímulo de transcritos de Gal-3 foram realizadas PCR por tempo real a partir da extração de RNA das células submetidas às condições do estudo. Na figura 03 se observa um aumento do número de transcritos de Gal-3, principalmente associado à condição de hipóxia ( $p < 0.0001$ ), visto que em normóxia e privação de nutrientes não há um aumento na expressão do gene *LSGAL3* que codifica Gal-3. Este resultado indica que a hipóxia é mais crítica que a privação de nutrientes no estímulo a transcrição do gene que codifica Gal-3. A hipóxia *per se* aumenta o nível de transcritos de Gal-3 acima de duas vezes ( $p < 0.0001$ ) assim como a hipóxia associada à privação de nutrientes. Não foi observada a amplificação do gene *LSGAL1*, que codifica Gal-1 em nenhuma das condições impostas (dados não mostrados).

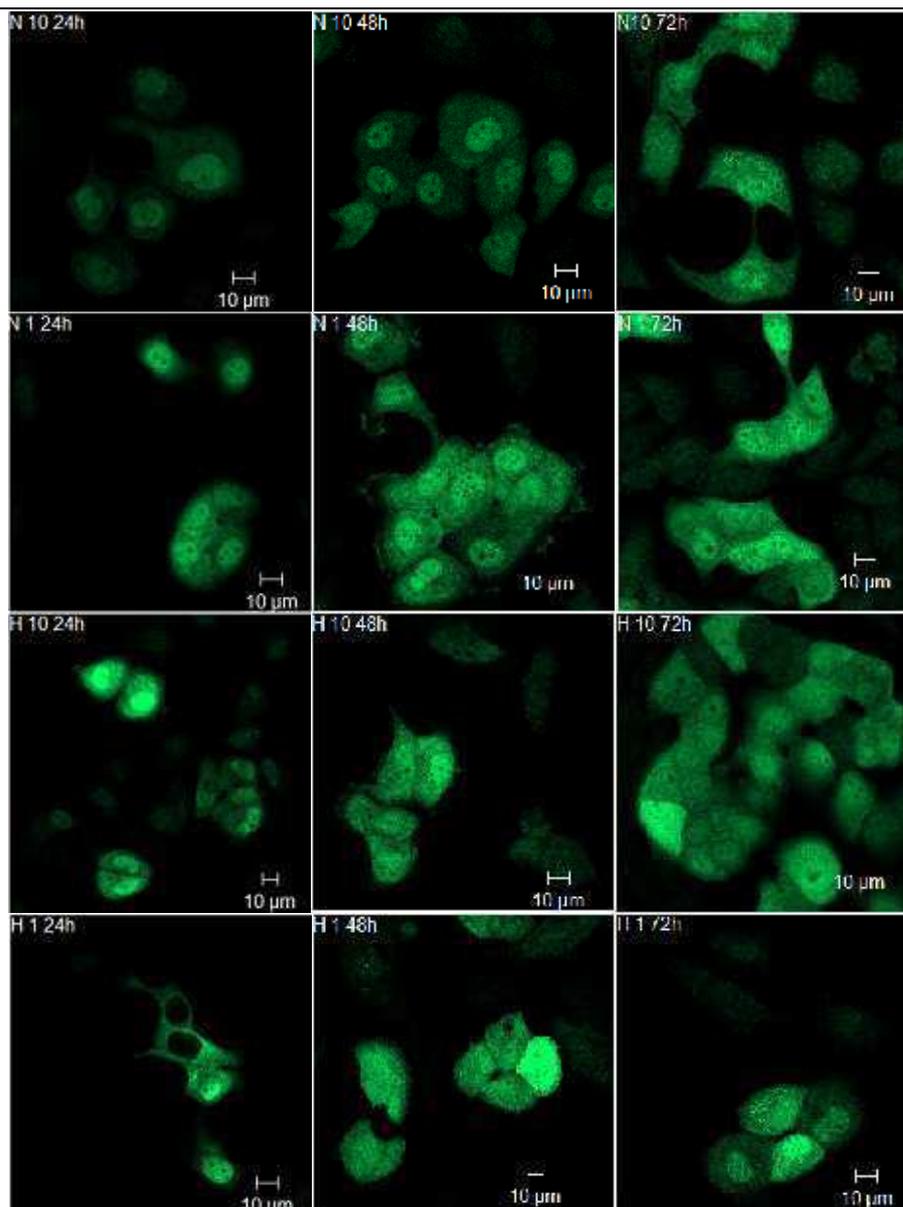


Figura 01: Análise da expressão e localização celular de Gal-3 por microscopia confocal. As colunas representam as condições de disponibilidade de  $O_2$  e as linhas a privação ou não de nutrientes. No canto superior esquerdo de cada figura está escrito a condição de estudo que a figura representa. Coluna da direita representa 24h da imposição das condições, a coluna central 48h e a da esquerda 72h das mesmas condições. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes.

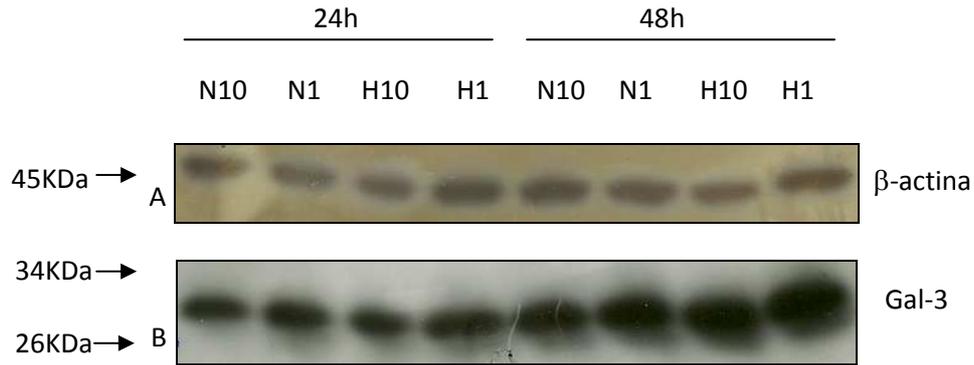


Figura 02: Análise da expressão protéica de Gal-3 em hipóxia e privação de nutrientes nos intervalos de 24 e 48h. Em (A) controle para  $\beta$ -actina (B) Aumento da expressão de Gal-3, proporcionalmente em relação à condição de normóxia sendo mais expressa em 48H1. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes.

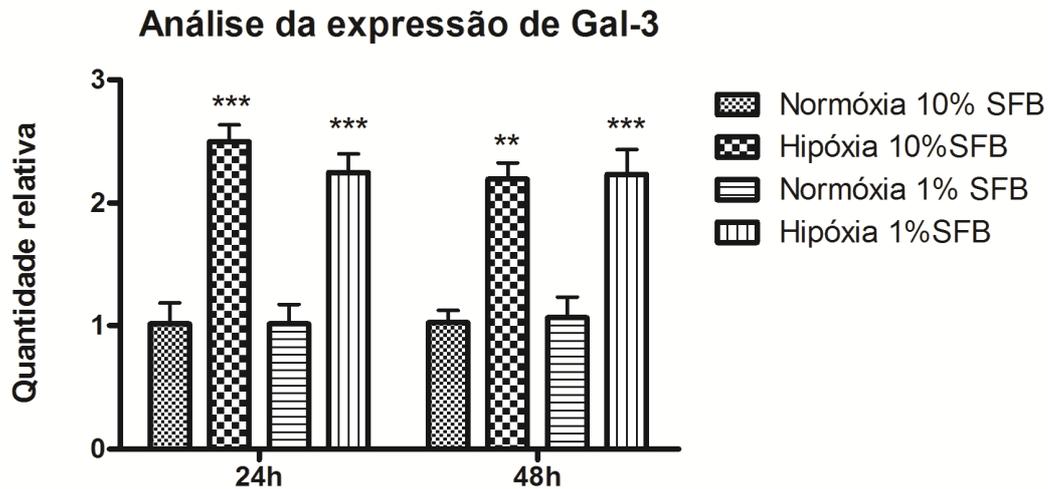


Figura 03: Análise da expressão de transcritos de Gal-3 em hipóxia e privação de nutrientes nos intervalos de 24 e 48h. \*\*  $p < 0.001$  \*\*\*  $p < 0.0001$ .

*O número de ligantes de Gal-3 e L-PHA não parece ser alterado nas condições de hipóxia e privação de nutrientes*

Os extratos proteicos, das células, obtidos nas condições de hipóxia e privação de nutrientes não apresentaram diferença aparente na expressão de ligantes de Gal-3 (dados não mostrados), pois a intensidade aparente das bandas

parecia a mesma em todas as condições analisadas. O padrão de L-PHA apresentou uma diminuição no reconhecimento dos seus ligantes nas condições N1, H10, H1, em relação a N10 (dado não mostrado) em todos os intervalos de tempo testados. Porém não houve diferença aparente nas condições H10, H1 e N1 entre si. *Ocorre sialilação aberrante nas células T47D submetidas à hipóxia mais não nas submetidas à privação de nutrientes.*

O perfil de sialilação das células dos extratos protéicos (12 $\mu$ g/ml - cada) em hipóxia ou privação de nutrientes, avaliado em *lectin blotting* empregando SNA (*Sumbicus nigra* agglutinin) biotinilada, específica para ácido siálico preferencialmente em ligação  $\alpha$ 2-6, revelou que ocorre sialilação aberrante em hipóxia (24H10, 48H10 e 72H10) em relação a normóxia (24N10, 48N10 e 72N10) contudo, o mesmo não ocorre na privação de nutrientes (Figura 06).

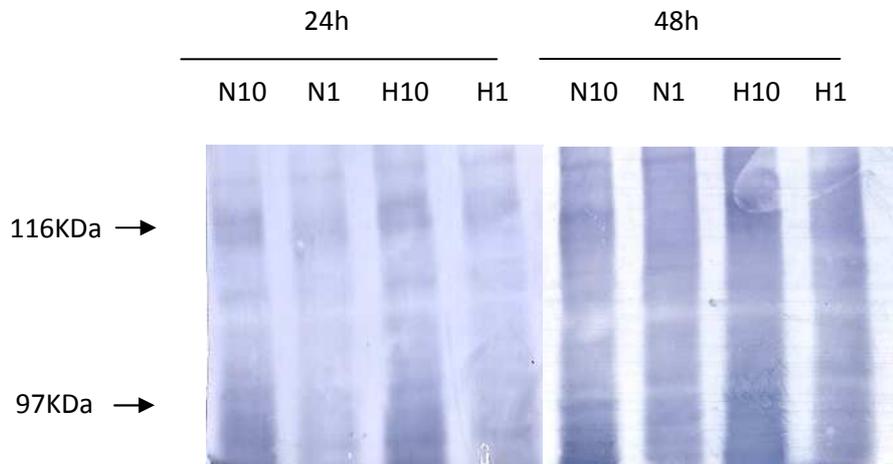


Figura 04: Perfil de sialilação das células T47D submetidas as condições do estudo. N10: normóxia com 10% de nutrientes; N1 Normóxia com 1% de nutrientes; H10: Hipóxia com 10% de nutrientes; H1: Hipóxia com 1% de nutrientes.

*Não ocorre superexpressão dos transcritos de ST6Gal1 indicando que a maior parte dos resíduos de ácido siálico não são  $\alpha$ 2-6 N-ligados.*

Como observado no *blotting* com SNA ocorre um aumento de sialilação nas condições de hipóxia. Nesse sentido hipotetizamos se a responsável por essa sialilação aberrante era a enzima ST6Gal1 que sialila os resíduos de polilactosaminas em N-glicosilação impedindo que os mesmos sejam reconhecidos pela Gal-3. O resultado do Real-Time PCR para ST6Gal1 indicam que essa enzima, provavelmente, não é enzima chave responsável pelo aumento aberrante de sialilação observado no *lectin blotting*. A Figura 5 mostra o padrão de transcritos de acordo com as condições do estudo, onde é possível observar que em 24H10 ocorre um aumento na expressão do transcrito que diminui gradualmente em 48H10 e 72H10. Entretanto, quando a privação de nutriente é imposta no sistema ocorre uma diminuição na expressão do transcrito, aparentemente mais restritiva, superando o efeito indutor da hipóxia tornando a expressão de ST6GAL1 menor que a do gene normalizador  $\beta$ -actina.

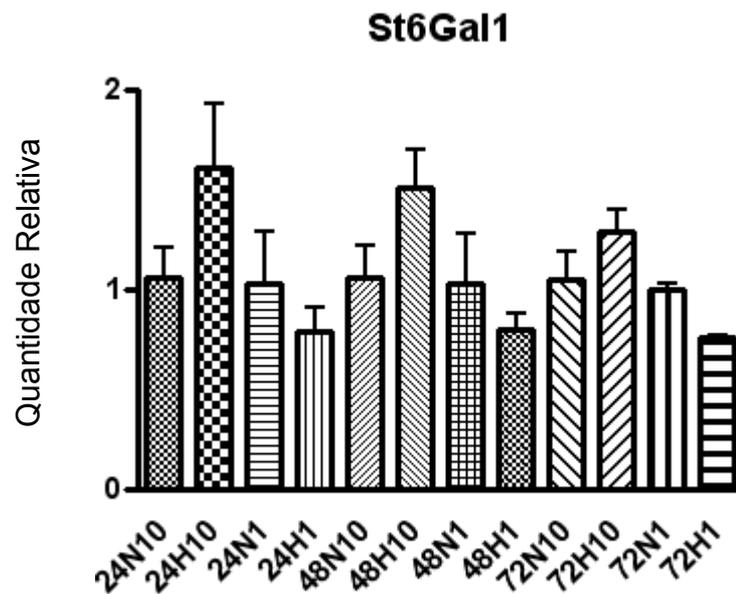


Figura 05: Análise da expressão dos transcritos de ST6Gal1 em Hipóxia e normóxia combinadas ou não com privação de nutrientes.

*Gal-3 protege as células da morte no ambiente hipóxico via N-terminal e não via Domínio de Reconhecimento a carboidratos.*

Para avaliar a viabilidade celular, as células T47D foram analisadas quanto a hipodiploidia por incorporação de Iodeto de propídeo (PI) através de citometria de fluxo (FACS Calibur BD). Como mostrado na figura 1, na condição mais adversa na qual a célula foi submetida, 72h de hipóxia e privação de nutrientes, apenas 3% da população celular apresentava morte celular. Para avaliar o papel da Galectina-3 na sobrevivência ao ambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes, as células foram incubadas com 25mM de Lactose, açúcar específico de Gal-3, 25mM de sacarose, controle de açúcar inespecífico e o anticorpo M338 que reconhece a porção N-terminal de Gal-3. A inibição de Gal-3 pelo seu açúcar específico não alterou a

numero de células mortas nas condições hipóxicas, indicando que o CRD de Gal-3 não exerce função protetora nesse ambiente (Figura 07). Contudo, no intervalo de tempo de 48h da condição imposta as células tratadas com o anticorpo aumentou a indução da morte celular em torno de 2x em relação ao grupo que não recebeu nenhum tratamento, indicando um papel protetor do N-terminal de Gal-3. Por causa dos altos desvios padrão os resultados de 72h não foram considerados

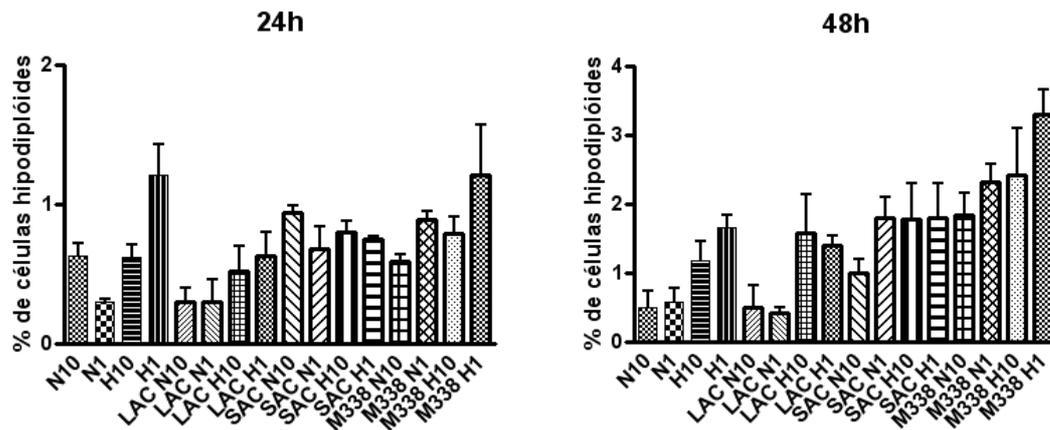


Figura 06: Ensaio de avaliação de morte celular por incorporação de iodeto de propídio pelas células T47D submetidas a hipóxia e privação de nutrientes nos períodos de 24h e 48h. N: normóxia, H: Hipóxia, LAC: Lactose, SAC: Sacarose, M338: anticorpo monoclonal anti-Gal-3.

## Discussão

O crescimento tumoral está associado com modificações na estrutura dos resíduos glicanos pertencentes às glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular, alterando sítios de reconhecimentos de galectinas e induzindo invasão e metástase (VARKI *et al*, 2009). Essa glicosilação aberrante é causada por uma disfunção de glicosiltransferases e/ou glicosidades (Guillot *et al*, 2004). A hipóxia altera o chamado “ciclo dos glicanos” alterando a expressão de transportadores de glicose e açúcares nucleotídeos, alterando a atividade das glicosiltransferases e consequentemente o padrão de glicosilação nesse ambiente (SHIRATO *et al*, 2010).

Galectinas são moléculas endógenas que se ligam a carboidratos e tem seu padrão de ligação alterado no câncer (VARKI *et al*, 2009). Dentre as galectinas a Gal-3 é uma molécula bastante estudada em eventos carcinogênicos. *In vitro*, é vista a expressão dessa molécula em diversas linhagens, como a linhagem de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, câncer de cólon HCT-116 e HT-29, e também em linhagens de glioma, como a T98G (SATISHA *et al*, 2007; SATELLI *et al*, 2008), sendo pouco detectável em células normais, sugerindo uma possível indicação da Gal-3 como biomarcador específico de câncer.

Apesar de ser uma molécula bem estudada, seus mecanismos de ação e de expressão ainda não estão totalmente elucidados (RABINOVITCH *et al*, 2011), de modo que um dos objetivos deste trabalho visou analisar a expressão de Gal-3 em ambiente hipóxico e/ou privados de nutrientes, utilizando como ferramenta uma linhagem de mama cuja expressão de Gal-3 ainda não estava relatada na literatura.

Nossos resultados mostram um aumento na expressão dos transcritos em hipóxia e hipóxia combinada com privação de nutrientes, porém a privação de nutrientes por si só não induz a expressão do transcrito. Além disso, não houve diferença de expressão entre a hipóxia isolada e a hipóxia combinada com privação de nutrientes, indicando que a hipóxia é o evento restritivo e que a privação de nutriente não causa nenhum efeito aditivo a esse.

O aumento da transcrição de galectina-3 frente à hipóxia já foi relatada na literatura utilizando outros modelos *in vitro*, onde são descritos dois estudos envolvendo genes diferencialmente expressos em normóxia e hipóxia (GREIJER *et al*, 2005; OLBRYT *et al*, 2006). Greijer e colaboradores (2005) descrevem uma compilação de genes afetados pela indução da hipóxia e genes afetados, direta ou indiretamente, por HIF-1 $\alpha$  em uma linhagem de fibroblastos 3T3 expostos a 1% de oxigênio. É demonstrado que a maior parte dos genes regulados positivamente, 89%, é influenciada por HIF, quando comparado com células *knockout* para HIF-1 $\alpha$ , entre eles, galectina-3, e foi visto que o RNAm desta proteína tem um aumento de 2,3 vezes em relação à normóxia.

Em outros estudos, Olbryt e colaboradores (2006) descreveram também a ação da hipóxia, porém em células de melanoma murino B16(F10), além de comparar as ações da hipóxia, 1% de oxigênio, com a hipóxia mimética em cloreto cobaltoso. Este estudo mostra que o gene da galectina-3, apresenta-se com um aumento de 19,41 vezes em hipóxia em comparação à normóxia. Diferindo também dos nossos resultados o qual apresentou aumento de 2,8 vezes.

Apesar destes estudos criarem condições de hipóxia *in vitro*, não houve mimetização completa do microambiente tumoral, haja vista que as condições de

oferta de nutrientes continuaram altas, com exposição de 15% a 10% de SFB para Greijer (2005) e Olbryt e colaboradores (2006), respectivamente. Deste modo, não há mimetização do microambiente tumoral necrótico, onde as células são expostas a baixas concentrações de oxigênio e nutrientes. Contudo, o aumento de transcritos e da proteína Gal-3 em ambiente hipóxico e/ou privado de nutriente já foi relatado na literatura em estudos com linhagens de glioma utilizando também câmaras de hipóxia (YKEMORI, 2009). Porém diferindo dos nossos resultados esse trabalho aponta que a privação de nutriente também exerce papel na indução de Gal-3 e sugerem que a privação de soro fetal bovino pode vir a atuar como um fator importante na indução da expressão dessa molécula. Contudo essa diferença observada entre os estudos pode ser decorrente das características intrínsecas dos gliomas e dos tumores de mama.

Outro fato destacado por estes resultados foi a marcação nuclear para Gal-3 que não possui sequência internalizadora nuclear Nkahara e colaboradores (2006) mostraram que Gal-3 pode translocar para o núcleo via transporte ativo e difusão facilitada, além disso, algumas moléculas como a  $\beta$ -catenina podem translocar com Gal-3 para o núcleo (SHIMURA *et al*, 2005). Como em nossos resultados observamos a posição nuclear de Gal-3 hipotetizamos se essa proteína estaria sendo translocada para o núcleo via  $\beta$ -catenina, proteína que comumente realiza esse papel (SHIMURA *et al*, 2004) e que já está descrita na literatura sua interação com Gal-3 na via Wnt principalmente em câncer de cólon (SHIMURA *et al*, 2005). Através da microscopia confocal observamos co-localização entre Gal-3 e  $\beta$ -catenina no ambiente hipóxico e privado de nutrientes o que não ocorre no grupo controle,

sugerindo que esta molécula pode estar translocando Gal-3 para o núcleo apenas em ambientes hipóxicos.

Como Gal-1 tem sua expressão induzida em ambientes hipóxicos de Carcinoma de células escamosas (Le *et al*, 2005) e câncer de cólon (ZHAO *et al*, 2010) nós hipotetizamos se o mesmo poderia ocorrer com as células T47D submetidas à hipóxia, hipótese esta que foi refutada. Como estudos de IHQ mostram que a marcação de Gal-1 está localizada nas células do estroma associadas ao tumor (JUNG *et al*, 2007). Estudos futuros de co-cultivo das células neoplásicas com macrófagos ou fibroblastos possam fornecer melhores resultados sobre o papel de Gal-1 no ambiente hipóxico do câncer de mama.

O aumento de transcritos e da proteína Gal-3 em ambiente hipóxico e/ou privado de nutriente já foi relatado também em estudos com linhagens de glioma com um perfil mais citoplasmático e com ligantes de galectinas na região do complexo de Golgi (YKEMORI, 2009). Outro resultado apontado por esse trabalho e que é semelhante ao nosso é que a privação de nutriente também exerce papel na indução de Gal-3 e apontam que a privação de soro fetal bovino pode vir a atuar como um fator importante na indução dessa molécula. É visto que a privação de nutrientes pode ser um indutor de estresse celular e metabólico (CHEN *et al*, 2009), e como a galectina-3 é uma proteína relacionada à proteção contra estresse celular, ele pode ter peso importante na indução de galectina-3.

Como a literatura descreve que Gal-3 tem papel chave na proteção a morte celular por *anoikis* em células de câncer de cólon (ZHUO *et al*, 2008) Nós avaliamos um possível papel da Gal-3 na proteção a morte das células T47D no ambiente hipóxico. Nossos resultados apontaram que a inibição do CRD da Gal-3 não é

responsável por um possível papel de proteção de Gal-3 diferindo dos resultados de ZHUO e colaboradores (2008). Já quando foi utilizado um anti-corpo anti-N-terminal de Gal-3 observou-se um aumento na indução da morte. Os resultados indicaram que a região N-terminal de Gal-3 pode participar dessa proteção a morte no ambiente hipóxico e/ou privado e nutrientes. O N-terminal de Gal-3 é a região responsável pela multimerização dessas moléculas formando uma estrutura múltiplas em gal-3 capaz de impedir dimerização de receptores por representar uma barreira física que impede esse evento (BREWER, 2002).

Um perfil exacerbado de sialilação foi observado nas amostras tumorais linhagem T47D nas condições de hipóxia, porém não na privação de nutriente provavelmente porque a fonte do siálico está no SFB. O padrão clássico observado pelas lectinas que reconhecem resíduos de ácido siálico nos tumores (WANG *et al*, 2008) se deve ao aumento do conteúdo desse monossacarídeo na superfície celular que diminui a interação da célula com a matriz facilitando a metástase e promovendo um escape do sistema imunológico, por isso a positividade para essas lectinas esta associada a um mau prognóstico no câncer de mama (CHEN *et al*, 2010).

Nossos resultados mostraram também uma positividade diminuída de ligantes de L-PHA (também são ligantes de Gal-3) na hipóxia e privação de nutrientes (H1) em relação ao controle (N10). Isso pode ocorrer porque a transformação maligna de células humanas está normalmente associada a um aumento nos resíduos de  $\beta$ -1-6-N-acetil-galactosamina (Ligante de L-PHA) nas proteínas N-glicosiladas (VARKI & CROCKER, 2009) (Como nosso resultados em N10). Entretanto o aumento nos resíduos de ácido siálico acontecem geralmente nos resíduos de N-acetilactosamina

localizados na membrana externa ligados a N-glicanos (SUZUKI *et al*, 2003; VARKI & CROCKER, 2009) evento este que está sendo potencializado pela hipóxia e explica os resultados para L-PHA nesse microambiente.

Provavelmente essa sialilação aberrante visualizada nas células não é realizada apenas pela ST6GALNAC1 que como mostrado em nossos resultados. Deve existir um efeito aditivo realizado pela ST6GalNac-1 uma enzima que sialila o-glicanos, participa da síntese do antígeno Sialil-Tn no câncer de mama (SEWELL *et al*, 2006) e esta associada com o aumento da agressividade das células MDA-MB-231 (JULIEN *et al*, 2006). Além disso Kannagi (2007) relata a indução no ambiente hipóxico de glicogenes formadores de estruturas antigênicas mono e disialiladas fato que também está associado com os nosso resultados.

Nossos resultados indicam um padrão glicobiológico alterado com aumento da expressão de Gal-3 na hipóxia e privação de nutrientes e de sialilação na hipóxia. A comparação com os dados da literatura sugere que o modelo usado neste estudo é eficiente em modular os aspectos glicobiológicos em ambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes *in vivo*.

### **Agradecimentos**

A CAPES, CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro e a Ana Fernandes pelos serviços técnicos prestados.

## Referências Bibliográficas

BREWER C.F. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys. Acta*, 2002, 1572:255-262.

CHEN CHI-LONG, JAN-SHOW CHU, WU-CHOU SU, SOON-CEN HUANG, WEN-YING LE. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch*, 2010, 457(1):53-61.

CHEN G, ZOU Q, YANG Z. Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010 ;35(6):584-9.

COSSE JP, MICHIELS C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8:790-797.

GREIJER AE, VAN DER GROEP P, KEMMING D, SHVARTS A, SEMENZA GL, MEIJER GA, VAN DE WIEL MA, BELIEN JA, VAN DIEST PJ, VAN DER WALL E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol* 2005 Jul, 206(3):291-304.

GUILLOT J, GUERRY M, KONSKA G, CALDEFIE-CHEZET F, DE LATOUR M, PENAULT-LLORCA F. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull Cancer*. 2004 91(2):141-58.

IKEMORI, R. Y. Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão da galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas”, Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, 2009.

JULIEN S, ADRIAENSSENS E, OTTENBERG K, FURLAN A, COURTAND G, VERCOUTTER-EDOUART AS, HANISCH FG, DELANNOY P, LE BOURHIS X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 2006, Jan;16(1):54-64.

KANNAGI R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J*, 2007 30(3):189-209.

JUNG EJ, MOON HG, CHO BI, JEONG CY, JOO YT, LEE YJ, HONG SC, CHOI SK, HA WS, KIM JW, LEE CW, LEE JS, PARK ST. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2331-8.

LE QT, SHI G, CAO H, NELSON DW, WANG Y, CHEN EY, ZHAO S, KONG C, RICHARDSON D, O'BYRNE KJ, GIACCIA AJ, KOONG AC. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Invest*. 2005, Dec 10;23(35):8932-41.

MOELLER. B.J, RICHARDSON R.A, Dewhirst M.W, Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 26, 2007, 241-248.

NAKAHARA S, RAZ A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev*. 2007, ;26(3-4):605-10.

OLBRYT M, JARZAB M, JAZOWIECKA-RAKUS J, SIMEK K, SZALA S, SOCHANIK A. Gene expression profile of B 16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene Expr*. 2006, 13(3):191-203.

RUAN K, SONG G, OUYANG G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*, 2009, 107(6):1053 -1062.

SATELLI A, RAO PS, GUPTA PK, LOCKMAN PR, SRIVENUGOPAL KS, RAO US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep*, 2008r; 19(3):587-94.

SATHISHA UV, JAYARAM S, HARISH NAYAKA MA, DHARMESH SM. Inhibition of galectin-3 mediated cellular interactions by pectic polysaccharides from dietary sources. *Glycoconj J*, 2007, 24(8):497-507.

SUNDBLAD V, CROCI DO, RABINOVICH GA. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. *Histol Histopathol*, 2011, 26(2):247-65.

SEWELL R, BÄCKSTRÖM M, DALZIEL M, GSCHMEISSNER S, KARLSSON H, NOLL T, GÄTGENS J, CLAUSEN H, HANSSON GC, BURCHELL J, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem*, 2006, 281(6):3586-94.

SHIMURA T, TAKENAKA Y, TSUTSUMI S, HOGAN V, KIKUCHI A, RAZ A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res*. 2004 15;64(18):6363-7.

SHIMURA T, TAKENAKA Y, FUKUMORI T, TSUTSUMI S, OKADA K, HOGAN V, KIKUCHI A, KUWANO H, RAZ A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res*, 2005, May 1;65(9):3535-7.

SHIRATO K, NAKAJIMA K, KOREKANE H, TAKAMATSU S, GAO C, ANGATA T, OHTSUBO K, TANIGUCHI N. Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Jan;48(1):20-5.

SUZUKI O, NOZAWA Y, KAWAGUCHI T, ABE M. Alpha-2,6-sialylation of L-PHA reactive oligosaccharides and expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in human diffuse large B cell lymphoma. *Oncol Rep*, 2003, 10(6):1759-64.

TANIGUCHI N. From the gamma-glutamyl cycle to the glycan cycle: a road with many turns and pleasant surprises, *J Biol Chem*, 2009 11;284(50):34469-78.

VARKI A, KANNAGI R, TOOLE BP. Glycosylation Changes in Cancer. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

ZENG Y, DANIELSON KG, ALBERT TJ, SHAPIRO IM, RISBUD MV. HIF-1 alpha is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(12):1851-61.

ZHAO XY, CHEN TT, XIA L, GUO M, XU Y, YUE F, JIANG Y, CHEN GQ, ZHAO KW. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 2010, v31(8):1367-75.

## 5 DISCUSSÃO

O microambiente tumoral é altamente complexo, onde há a participação de uma intrincada rede de moléculas envolvidas em diversos processos que levam a evasão da morte celular, auto-suficiência de sinais de crescimento, falta de sensibilidade a sinais anti-proliferativos, invasão tecidual e metástase, potencial replicativo ilimitado e angiogênese (HANAHAN & WENBERG, 2011). Todas essas características do ambiente tumoral podem ser influenciadas e potencializadas pela hipóxia tornando as células neoplásicas mais agressivas (RUAN *et al*, 2009).

Muitas moléculas estão envolvidas no processo de aquisição das características neoplásicas entre elas estão as galectinas 1 e 3 (VARKI *et al*, 2009). Estas proteínas reconhecedoras de carboidratos modulam muitas etapas da tumorigênese e demonstram, também, participar das adaptações das células neoplásicas ao ambiente hipóxico (LE *et al*, 2005; IKEMORI, 2009).

Em nosso estudo não observamos a expressão de Gal-1 na células T47D submetida à hipoxia e/ou privação de nutrientes nem nas células neoplásicas das amostras tumorais. Hipotetizamos que Gal-1 poderia está sendo recrutada em ambiente hipóxico já que em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço o papel da Galectina-1 na hipóxia já foi estabelecido, representando uma ligação entre privilégio imune tumoral e hipóxia (LE *et al*, 2005).

Além de demonstrar o papel de Gal-1 na hipóxia *in vitro*. Le e col. (2005) analisaram 101 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de células escamosas e observaram a co-marcação maior entre positividade para Gal-1, e negatividade para CD33 nas amostras positivas para CAIX. Esses resultados

também estavam associados a uma pior evolução clínica do paciente (LE *et al*, 2005). Contudo, nossos resultados mostraram uma positividade em Gal-1 nas células do estroma associadas ao tumor, que nas neoplasias mamárias está associada à invasão e progressão tumoral (JUNG *et al*, 2007).

No intuito de estabelecer uma possível conexão entre Gal-1 nas células do estroma e a hipóxia no ambiente tumoral, foi avaliado se houve diferença na marcação dessas células entre os grupos hipóxicos e não hipóxicos no CDI e no CDIS. Entretanto, essa possível relação foi refutada. Estudos posteriores através do co-cultivo de linhagens de câncer de mama com macrófagos ou fibroblastos são necessários para ajudar a compreender melhor o papel da Gal-1 na hipóxia tumoral mamária.

Outra molécula muito investigada em eventos carcinogênicos é a Galectina-3. *In vitro*, sua expressão é vista em diversas linhagens, como as linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA-MB-231; câncer de cólon HCT-116 e HT-29, e também em linhagens de glioma, como a T98G (SATELLI *et al*, 2008), sendo pouco detectável em células normais, sugerindo a Galectina-3 como biomarcador específico de câncer.

Porém, é visto que em outros tipos neoplásicos a expressão de Gal-3 é variável. Dumic e col. (2006) citam um grande número de publicações descrevendo a expressão de Gal-3 em neoplasias, porém estes dados são muitas vezes inconsistentes, impossibilitando uma conclusão sobre o papel da Gal-3 no surgimento de tumores, devido aos diversos métodos de avaliação e a heterogeneidade entre os diferentes tipos de câncer. Entretanto, é notável que em comum a estas neoplasias está a proliferação descontrolada, distúrbios de adesão e

resistência à apoptose, onde a Gal-3 pode estar envolvida nestes diversos fatores (ZHOU *et al*, 2008; IKEMORY, 2009).

Apesar de Gal-3 ser uma molécula bem estudada, seus mecanismos de ação e de expressão ainda não estão totalmente elucidados (SUNDBLAD *et al*, 2011). Por isso, um dos objetivos deste trabalho visou entender melhor o papel de Gal-3 em hipóxia utilizando como ferramenta uma linhagem de mama cuja expressão ainda não estava relatada na literatura.

Nossos resultados indicaram que no ambiente hipóxico e no hipoxico com privação de nutrientes houve um aumento da expressão do transcrito de Gal-3 em 2,8 vezes. Contudo, no ambiente apenas privado de nutrientes esse aumento não ocorre indicando que a hipóxia é o fator restritivo na indução do transcrito de Gal-3 e não a privação de nutrientes. Diferindo dos nossos resultados, Ikemori (2009) demonstra um aumento na expressão de Gal-3 em células de glioma em ambiente hipóxico e privado de nutrientes com a privação de nutrientes apresentando efeito aditivo nessa indução. Essa diferença observada entres os estudos pode estar relacionada com as diferenças intrínsecas entre os tumores de mama e cérebro.

Greijer e col. (2005) descreveram uma compilação de genes afetados pela indução da hipóxia, direta ou indiretamente, por HIF-1 $\alpha$  em uma linhagem de fibroblastos 3T3 expostos a 1% de oxigênio. Foi observado que a maior parte dos genes regulados positivamente, 89%, é influenciada por HIF-1 $\alpha$ , quando comparado com células *knockout* para esta proteína. Dentre estes genes está o da proteína Gal-3 para a qual foi visto que seu mRNA tem um aumento de 2,3 vezes em relação à normóxia.

Olbryt e col. (2006) descreveram também a ação da hipóxia em células de melanoma murino B16(F10), além de comparar as ações da hipóxia (1% de O<sub>2</sub>) com a hipóxia mimética em cloreto cobaltoso. No modelo deste estudo observou-se que o gene da Gal-3 teve um aumento de expressão de 19,41 vezes em hipóxia comparada à normóxia comprovando a importância da Gal-3 neste contexto.

Apesar destes estudos (GREIJER *et al*, 2005; OLBRYT *et al*, 2006) usarem condições de hipóxia *in vitro*, não houve mimetização completa do microambiente tumoral, haja vista que as condições de oferta de nutrientes continuaram altas, com exposição de 10% a 15% de soro fetal bovino (SFB).

A avaliação da produção de Gal-3 em células da linhagem T47D *in vitro* demonstrou que estas células foi possível observar o aumento da expressão de Gal-3 no ambiente hipóxico e privado de nutrientes tanto no citoplasma como no núcleo. É descrito que apesar da Gal-3 estar presente no núcleo e no citoplasma, não se tem observado peptídeos-sinal para o endereçamento desta para compartimentos intracelular como o núcleo ou retículo endoplasmático (COOPER & BARONDES, 1999).

Nkahara e col. (2006) observaram que Gal-3 pode ser translocada para o núcleo via transporte ativo ou difusão facilitada. Estudos recentes demonstram que proteínas já conhecidas, porém com habilidades não relacionadas a mecanismos de secreção, utilizam esta via alternativa, como a caspase-1 e a proteína periférica do Golgi, GRASP. Este mecanismo alternativo pode ter evoluído de forma a compartimentalizar a Gal-3 e seus ligantes, evitando seu encontro prematuro dentro da célula, o que poderia causar agregação e mau enovelamento de proteínas, além de induzir sinais autócrinos pela ligação com receptores (NICKEL *et al*, 2009).

Como em nossos resultados observamos a posição nuclear de Gal-3 é provável que essa proteína esteja sendo translocada para o núcleo via  $\beta$ -catenina, proteína que comumente realiza esse papel (SHIMURA *et al*, 2005). Já está descrita na literatura a interação de Gal-3 com  $\beta$ -catenina na via Wnt (do inglês, Wingless na *Drosophila*), principalmente em câncer de cólon (SHIMURA *et al*, 2005). Através da microscopia confocal observamos co-localização entre Gal-3 e  $\beta$ -catenina no ambiente hipóxico e privado de nutrientes o que não ocorre nos demais grupos.

A avaliação do possível papel da Gal-3 na proteção a morte celular foi realizada por citometria de fluxo das células T47D incubadas com sacarose (inibidor inespecífico de Gal-3) e lactose (um inibidor específico de Gal-3) além do anticorpo M338 específico para o N-terminal de Gal-3. Nossos resultados indicam que o possível papel de Gal-3 na proteção a morte no ambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes não é realizado via CRD já que Lactose não é capaz de reverter esse processo. Esses resultados diferem dos observados em câncer de cólon onde é possível observar que o papel na proteção a morte por Gal-3 é realizado pelo CRD (ZHOU *et al*, 2008)

Entretanto nos intervalos de tempo de 48h e 72h nas condições de hipóxia e privação de nutrientes o anticorpo M338 aumenta a indução a morte celular em até duas vezes. Estes resultados indicam uma possível participação do N terminal de Gal-3 nesse processo. O N-terminal da Gal-3 é a região responsável pela multimerização dessas moléculas formando uma estrutura múltipla em Gal-3 sendo capaz de impedir dimerização de receptores por representar uma barreira física, realizando impedimento estérico (BREWER, 2002). Assim, essa multimerização

pode ser essencial para o papel da Gal-3 na sobrevivência ao ambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes.

Gal-3 também se mostrou superexpressa nas biópsias de CDI e CDIS analisadas no estudo e as pacientes positivas para marcadores de hipóxia em CDIS apresentaram um aumento na localização nuclear. A marcação nuclear de Gal-3 está associada a tumores mais agressivos e de pior prognóstico (MOISA *et al*, 2007).

Para CDIS a positividade citoplasmática de Gal-3 foi associada ao tipo comedônico, que possui necrose central tumoral e células marginais em hipóxia, e está associado a uma maior probabilidade de recidiva e progressão para CDIS (SCHNITT, 2010). Entretanto a positividade para M338 em CDIS foi muito baixa e tal resultado indica a provável clivagem da região N-terminal da Gal-3 por metaloproteinases de matriz extracelular bem como por fosforilação dessa estrutura (OCHIENG *et al*, 1998; BALAN *et al*, 2010).

Estudos relatam que Gal-3 é requerida num primeiro momento da carcinogênese mamária e tem sua expressão diminuída com a progressão tumoral (CASTRONOVO *et al*, 1996; SHEKRAR *et al*, 2004). Porém trabalhos utilizando um número baixo de amostras e anticorpos policlonais torna os resultados questionáveis, além disso, a fosforilação de galectina pode mascarar seus sítios antigênicos impedindo o reconhecimento pelo anticorpo (BALAN *et al*, 2010).

Em ambientes limites, como áreas necróticas, Gal-3 e seus ligantes já foram descritos em amostras de pacientes com glioblastoma em uma área conhecida como pseudopaliçada que são encontradas nos astrocitomas e glioblastomas multiformes (Ikemori, 2009). Também baseado em uma área morfológica

perinecrótica no câncer de mama, o CDIS comedônico foi utilizado como modelo hipóxico, enquanto que, os CDIS não-comedônicos (cribforme, sólido e micropapilar) foram considerados como controles. Baseadas na hipóxia e necrose no CDIS, Bussolati e col. (2000) estabeleceram uma nova classificação em um estudo multicêntrico europeu que se mostrou eficiente e reprodutível na avaliação de recidiva e período livre de doença.

Nossos resultados mostram que há uma superexpressão de ligantes para Con A ( $p=0.0019$ ), WGA ( $p<0.001$ ) e UEA-I ( $p=0.0014$ ) porém não para PNA ( $p=0.5779$ ) no CDIS comedônicos/hipóxico em relação aos não-comedônicos (controle). Este resultado para PNA também foi observado no CDIS de bexiga (NAKANISHI *et al*, 1993). O principal ligante de PNA é a galactose que é normalmente terminal e frequentemente sialilado (VARKI *et al*, 2009). Outro resultado encontrado que corrobora essa afirmativa é o fato de que os casos negativos para PNA nos CDIS hipóxicos foram positivos para WGA (reconhedora de siálico). Esta relação entre negatividade para PNA e positividade para WGA não foi encontrada no grupo controle.

Zengh & Ji (1990) mostraram em um estudo com 100 amostras de tumores mamários que a UEA-I está significativamente mais associada aos carcinomas mamários invasivos bem diferenciados, que segundo a teoria da progressão tumoral seria a próxima etapa após o CDIS (SCHNITT *et al*, 2010). Os nossos resultados indicam que os resíduos de L-fucose são requeridos nos estágios iniciais da carcinogênese mamária. Além disso hipóxia aumenta a expressão de antígenos de Lewis difucosilados com aumento da expressão da fucosiltransferase VII (KOIKE *et al*, 2004).

Korourian e col. (2008) analisaram a marcação das lectinas VVA e GSA-I no reconhecimento de antígenos-carboidratos associados a tumor e observaram que ocorre um maior reconhecimento dos ligantes das lectinas no CDIS de grau III que no I que representariam comedônico e não-comedônico, respectivamente, e corroboram nossos resultados de glicosilação aberrante no CDIS hipóxico. Uma das possíveis explicações para o aumento do reconhecimento da Con A no ambiente hipóxico é o aumento de estruturas ricas em manose em algumas proteínas seletivamente expressas em ambiente hipóxico, como por exemplo, a CA IX (LI *et al*, 2010). O grupo hipóxico no CDI também apresentou um aumento no reconhecimento de ligantes de ConA

Um perfil exacerbado de sialilação foi observado nas biópsias de CDI e na linhagem T47D, em ambientes hipóxicos. O padrão clássico observado pelas lectinas que reconhecem resíduos de ácido siálico nos tumores se deve ao aumento do conteúdo desse monossacarídeo na superfície celular que diminui a interação entre célula e matriz extracelular facilitando a metástase e promovendo um escape do sistema imunológico, por isso a positividade para essas lectinas esta associada a um mau prognóstico no câncer de mama (WANG *et al*, 2008; CHEN *et al*, 2010).

Nossos resultados mostram uma localização da marcação de SNA nas amostras de CDI preferencialmente no citoplasma. A inserção de resíduos de ácido siálico acontece, geralmente, nos resíduos terminais de N-acetilactosamina localizados na face externa da membrana celular ligados a N-glicanos ou no citoplasma em O-glicanos (VARKI & CROCKER, 2009) Esse fato corrobora, também, com o nosso resultado de que ST6GALNac1 não é, provavelmente, a única enzima responsável pela sialilação exacerbada no ambiente hipóxico no câncer de

mama. Os dados do padrão de distribuição citoplasmático de ácido siálico nas amostras de CDIS juntamente com os resultados de ST6GALNAC1 nas células T47D indicam um papel mais importante da O-glicosilação nesse evento no ambiente hipóxico e sugerem um maior papel dos O-glicanos nesse ambiente.

Provavelmente, essa sialilação aberrante visualizada nas células e nas amostras tumorais está sendo realizada pela ST6GalNac-1 uma enzima que sialila O-glicanos, que participa da síntese do antígeno Sialil-Tn no câncer de mama (SEWELL *et al.*, 2006) e está associada com o aumento da agressividade das células MDA-MB-231 (JULIEN *et al.*, 2006). Além disso, Kannagi (2007) relata a indução no ambiente hipóxico de glicogenes formadores de estruturas antigênicas mono- e disialiladas, fato que também está associado com os nossos resultados.

Nas amostras de CDI foi observado que as pacientes positivas para CA IX possuem fenótipos tumorais e características clínicas mais agressivas como invasão nodal ( $p=0.0439$ ) e ausência do reconhecimento do receptor de estrógeno ( $p=0.003$ ). A relação entre detecção de CAIX por IHQ e associada a um mau prognóstico são corroborados por outros estudos (TAN *et al.*, 2009; CHAUDARY *et al.*, 2007). Além disso, CA IX é indicador de resistência à quimioterapia e terapia hormonal e por tamanha importância no ambiente hipóxico já está sendo alvo de terapias hipóxia-específicas (GENERALI *et al.*, 2006; LOU *et al.* 2011)

O crescimento tumoral está associado com modificações na estrutura dos resíduos glicanos pertencentes às glicoproteínas e glicolipídios presentes na superfície celular. Essa glicosilação aberrante é causada por uma disfunção de glicosiltransferases e/ou glicosidades ou alteração da sua localização subcelular (GUILLOT *et al.*, 2004). Mutações somáticas no gene *MGAT5* que codifica a enzima

responsável pelo aumento das estruturas antenárias (Através da adição de  $\beta$ 1-6-N-Acetil-galactosamina) nos N-glicanos ou o bloqueio dessa enzima pelo uso de drogas inibem invasão e metástase em modelos animais (FERNANDES, *et al*, 1991; GUILLOT *et al*, 2004).

A transformação maligna de células humanas está normalmente associada a um aumento nos resíduos de  $\beta$ 1-6-N-Acetil-galactosamina nas proteínas N-glicosiladas (VARKI *et al*, 2009). O fenótipo conferido pela adição desse resíduo de carboidrato pode ser reconhecido pela lectina L-PHA que está relacionada com progressão tumoral em câncer de cólon e de mama (FERNANDES *et al*, 1991).

Nas análises de lectin blotting para L-PHA, revelou que há uma diminuição do reconhecimento dos ligantes dessa lectina nas condições hipóxicas e/ou privadas de nutrientes em relação as células em normóxia e supridas de nutrientes. Isso pode ocorrer por um aumento na sialilação desses resíduos como já foi identificado em linfomas (SUSUKI *et al*, 2003), ou por mais uma vez a O-glicosilação ser mais restritiva no ambiente hipóxico que a N-glicosilação

Em um estudo realizado por espectrometria de massa, Abbott e colaboradores (2008) analisaram o perfil de proteínas enriquecidas por ligantes de L-PHA em 30 pacientes com CDI e 4 amostras-controle normais. O estudo observou que no mínimo no grupo câncer havia 34 proteínas enriquecidas com os ligantes de L-PHA, sendo 12 comuns em todos os tumores analisados. Nossos resultados, também mostram esse perfil no grupo em normóxia e surpido de nutrientes e sugere que a mesma abordagem utilizada Abbott e colaboradores (2008) em células submetidas a hipóxia pode ser bastante informativo no que se relaciona ao mascaramento dos ligantes de L-PHA.

Nossos resultados são os primeiros na literatura a descrever aspectos glicobiológicos em ambientes hipóxicos em amostras de câncer de mama e correlacionar esses dados com informações de valor diagnóstico e prognóstico. Além disso, foi utilizado um sistema *in vitro* que apresentou características glicobiológicas muito semelhantes às amostras tumorais analisadas, sugerindo que o modelo será eficiente em estudos posteriores de avaliação do papel de galectinas e ligantes carboidratos na modulação do comportamento tumoral ao ambiente hipóxico.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ O transcrito e a proteína Gal-3 são superexpressos na linhagem de mama em hipóxia e privação de nutrientes, a proteína tanto no citoplasma quanto no núcleo na. Já Gal-1 apresentou-se negativa em todas as condições analisadas;
- ✓ Gal-3 pode estar envolvida na proteção a morte celular no ambiente hipóxico, provavelmente via N-terminal e não CRD;
- ✓ Ocorre sialilação aberrante nas células hipóxicas, mas provavelmente a enzima ST6Gal1 não é a única enzima responsável por esse fenótipo;
- ✓ Os ligantes das Lectinas WGA, UEA-I, ConA e Gal-3 são consideravelmente mais expressos nos comedocarcinomas que nos CDIS não comedônicos indicando uma superexpressão dos mesmo no ambiente hipóxico;
- ✓ Gal-3 encontra-se mais expressa nas amostras de pacientes com câncer de mama que são positivas para marcadores hipóxicos em relação ao grupo negativo para esses marcadores hipóxicos, com um aumento da compartimentalização nuclear;
- ✓ Os ligantes de L-PHA e SNA encontram-se alterados no ambiente hipóxico nas amostras tumorais de CDI com uma diminuição nos ligantes de L-PHA na hipoxia e/ou privação de nutrientes e um aumento dos ligantes de SNA na hipóxia;
- ✓ O grupo de pacientes positivas para marcadores de hipóxia não só apresentaram um perfil de glicosilação aberrante em relação ao grupo negativo como também características clínicas (invasão nodal) e histopatológicas (Receptor de estrógeno negativo) mais agressivas.

## 7 PERSPECTIVAS

- ✓ Correlacionar a expressão de Gal 3 com resposta a tratamento neoadjuvante;
- ✓ Analisar o papel da Gal-3 na proteção a morte celular em hipóxia por silenciamento estável de Gal-3 e estabelecer os mecanismos de sobrevivência ao ambiente hipoxico e/ou deprivado de nutrientes em outras linhagens de mama como a MDA-MB-231 (Projeto já aprovado pela FACEPE);
- ✓ Avaliar as modificações pós-traducionais de Gal-3 em ambientes hipóxicos bem como gerar anticorpos para Gal-3 fosforilada e hiperfosforilada (Projeto já aprovado, parceria CAPES-UDELAR);
- ✓ Estabelecer o valor da extensão da hipóxia e do processo de glicosilação no momento do diagnóstico para escolha de conduta terapêutica apropriada;
- ✓ Avaliar o silenciamento de Gal-3 na quimiosensibilização e como efeito aditivo a quimioterápicos já utilizados na clínica;
- ✓ Analisar o papel de inibidores de sialiltransferases na quimiosensibilização e no efeito aditivo em quimioterapia.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT KL, AOKI K, LIM JM, PORTERFIELD M, JOHNSON R, O'REGAN RM, WELLS L, TIEMEYER M, PIERCE M. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *J Proteome Res.* Apr;7(4):1470-80, 2008.

AGRWAL, N.; SUN, Q.; WANG, S. Y.; WANG, J. L. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J Biol Chem.* 268(20):14932-9, 1993.

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

ALLRED DC, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 11(2):155-68, 1998.

BALAN V, NANGIA-MAKKER P, JUNG YS, WANG Y, RAZ A. Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1803(10):1198-205, 2010.

BARONDES, S. H.; COOPER, D. N.; GITT, M. A. & LEFFLER, H. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 269: 20807-20810, 1994

BARROW H, RHODES JM, YU LG The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer*. 1;129(1):1-8, 2011.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74(3). 125-134, 1998.

BELTRÃO, E. I. C.; CABRAL, T. A.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B. de. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin histochemistry study. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, 46(1), 32-35, 2001.

BELTRÃO EI, MEDEIROS PL, RODRIGUES OG, FIGUEREDO-SILVA J, VALENÇA MM, COELHO LC, CARVALHO LB JR. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem*. 47(2):139-42, 2003.

BOSCHER C, DENNIS JW, NABI IR Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 383-92, 2011.

BERBERAT PO, FRIESS H, WANG L, ZHU Z, BLEY T, FRIGERI L, ZIMMERMANN A, BÜCHLER MW Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer.. *J Histochem Cytochem*. 49(4):539-49. 2001.

BOSCHER C, DENNIS JW, NABI IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol.*23(4):383-92, 2011.

BOYD, W. C., & SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119: 419, 1954.

BRENTON JD, CAREY LA, AHMED AA, CALDAS C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 10;23(29):7350-60, 2005.

BREWER C.F. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 255-262, 2002.

BROCKHAUSEN I, SCHACHTER H, STANLEY P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 9; 2009.

BUSSOLATI G, BONGIOVANNI M, CASSONI P, SAPINO A. Assessment of necrosis and hypoxia in ductal carcinoma in situ of the breast: basis for a new classification. *Virchows Arch.* 437(4):360-4, 2000

CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; BRACKE, M.; VAN DEN BRÛLE, F. Dual activities of gal-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear gal-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectina-3. *Oncogene*, 23: 7526-7536, 2004.

CAMBY I, LE MERCIER M, LEFRANC F, KISS R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 16(11):137R-157R, 2006.

CAMPOS LM, CAVALCANTI CL, LIMA-FILHO JL, CARVALHO LB, BELTRÃO EI. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*. 11(5):480-4, 2006.

CANNITO S, NOVO E, COMPAGNONE A, VALFRÈ DI BONZO L, BUSLETTA C, ZAMARA E, PATERNOSTRO C, POVERO D, BANDINO A, BOZZO F, CRAVANZOLA C, BRAVOCO V, COLOMBATTO S, PAROLA M. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 29(12):2267-78, 2008.

CAREY LA, PEROU CM, LIVASY CA, DRESSLER LG, COWAN D, CONWAY K, KARACA G, TROESTER MA, TSE CK, EDMISTON S, DEMING SL, GERADTS J, CHEANG MC, NIELSEN TO, MOORMAN PG, EARP HS, MILLIKAN RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 295(21):2492-502, 2006.

CASTRONOVO V, VAN DEN BRÛLE FA, JACKERS P, CLAUSSE N, LIU FT, GILLET C, SOBEL ME. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol*. 179(1):43-8. 1996.

CHAUDARY N, Hill RP Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis.*26:55-64, 2007.

CHEN G, ZOU Q, YANG Z.Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010 Jun;35(6):584-9. *Virchows Arch.* 457(1):53-61, 2010.

CHEN L, SUNDBÄCK J, OLOFSSON S, JONDAL M. Cellular Organization of Glycosylation. In. Ajit Varki, Jeffrey D Esko, and Karen J Colley.

CHEN L, SUNDBÄCK J, OLOFSSON S, JONDAL M. Interference with O-glycosylation in RMA lymphoma cells leads to a reduced in vivo growth of the tumor. *Int J Cancer.* 119(6):1495-500, 2006

CHI-LONG CHEN, JAN-SHOW CHU, WU-CHOU SU, SOON-CEN HUANG, WEN-YING LE. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 $\alpha$ , GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch.* 457(1):53-61. 2010

CONDE DM, TORRESAN RZ, KASHIMOTO E, CARVALHO LE, CARDOSO FILHO C. Fibroadenoma in axillary supernumerary breast: case report. *Sao Paulo Med J.* 1;123(5):253, 2005

COOPER DN, BARONDES SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*.9(10):979-84, 1999.

COSSE JP, MICHIELS C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem*, 8:790-797, 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. *Patologia estrutural e funcional – Robbins*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996.

CUMMINGS RD E FU-TONG LIU. *Galectins. Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008.

DAGHER, S. F.; WANG, J. L. & PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1213-1217, 1995.

DALES JF, BEAUFILS N, SILVY M, et al. Hypoxia inducible factor 1a gene (HIF-1a) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Medicine*; 8:44. 2010.

DEBRAY, C.; VEREECKEN, P.; BELOT, N.; TEILLARD, P.; BRION, J. P.; PANDOLFO, M.; POCHET, R. Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma

cell motility. *Biochemical and Biophysical research Communications* 325, 1393-1398, 2004.

DENNIS JW, GRANOVSKY M, WARREN CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.*1473:21–34, 1999.

DEMYDENKO D, Berest I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol.* 31(2):74-9, 2009.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: An open ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760:616-635, 2006.

ELSTON CW, ELLIS IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 2002 41(3A):154-61, 2002.

ELOLA MT, WOLFENSTEIN-TODEL C, TRONCOSO MF, VASTA GR, RABINOVICH GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci.* 64(13):1679-700, 2007

FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C AND PARKIN DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

FERNANDES B, SAGMAN U, AUGER M, DEMETRIO M, DENNIS JW. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res.* 15;51(2):718-23, 1991.

FISCHER E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges*, 27: 2985-2983, 1984.

FOX SB, GENERALI D, BERRUTI A, BRIZZI MP, CAMPO L, BONARDI S, BERSIGA A, ALLEVI G, MILANI M, AGUGGINI S, MELE T, DOGLIOTTI L, BOTTINI A, HARRIS AL. The prolyl hydroxylase enzymes are positively associated with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in human breast cancer and alter in response to primary systemic treatment with epirubicin and tamoxifen. *Breast Cancer Res.* 3;13(1):R16, 2011

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 5(7), 526-542, 2005.

GARNER OB, BAUM LG. Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochem Soc Trans.* (6):1472-7, 2008.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROYÁ, E.; KOGAN, G.; KOZÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnology Advances*, 27(1), 1-15, 2009.

GENERALI D, FOX SB, BERRUTI A, BRIZZI MP, CAMPO L, BONARDI S, WIGFIELD SM, BRUZZI P, BERSIGA A, ALLEVI G, MILANI M, AGUGGINI S, DOGLIOTTI L, BOTTINI A, HARRIS AL. Role of carbonic anhydrase IX expression in prediction of the efficacy and outcome of primary epirubicin/tamoxifen therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 13(3):921-30. 2006.

GLINSKY VV, KIRIAKOVA G, GLINSKII OV, MOSSINE VV, MAWHINNEY TP, TURK JR, GLINSKII AB, HUXLEY VH, PRICE JE, GLINSKY GV. Synthetic galectin-3 inhibitor increases metastatic cancer cell sensitivity to taxol-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Neoplasia*, 11(9):901-9, 2009.

GREENE FL, PAGE D, MORROW M, BALCH C, HALLER D, FRITZ A, FLEMING I, eds. *AJCC Cancer Staging Manual 6th ed*. New York: Springer; 2002.

GREENWALD P. A favorable view: progress in cancer prevention and screening. *Recent Results Cancer Res*. 174:3-17, 2007.

GREIJER AE, VAN DER GROEP P, KEMMING D, SHVARTS A, SEMENZA GL, MEIJER GA, VAN DE WIEL MA, BELIEN JA, VAN DIEST PJ, VAN DER WALL E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*. 206(3):291-304, 2005.

GUILLOT J, GUERRY M, KONSKA G, CALDEFIE-CHEZET F, DE LATOUR M, PENAULT-LLORCA F. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull Cancer*. 91(2):141-58. 2004.

GUO HB, LIU F, ZHAO JH, CHEN HL. Down-Regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by tumorigenesis- or metastasis-suppressor genes and its relation to metastatic potential of human hepatocarcinoma cells. *J Cell Biochemistry*, 79:370-85, 2000.

GURAY, M.; SAHIN, A. Benign breast disease: classification, diagnosis and management. *The Oncologist*, v. 11, n. 5, p. 435-449, 2006.

HAGEN T KG, FRITZ TA, TABAK LA. All in the family: The UDP-GalNAc:polypeptide *N* acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*.13:1R–16R, 2003.

HAKOMORI S. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: Their changes associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.*;1473:247–266, 1999.

HATTRUP CL, GENDLER SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*. 70:431–457, 2008.

HANAHAHAN, D., AND WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70, 2000.

HANAHAN, D., AND WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation Cell 144(4), 2011.

HARRIS AL: Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer, 2:38-47, 2002.

HAUDEK KC, PATTERSON RJ, WANG JL. SR proteins and galectins: what's in a name? Glycobiology. 20(10):1199-207, 2010.

HAUDEK KC, SPRONK KJ, VOSS PG, PATTERSON RJ, WANG JL, ARNOYS EJDynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. Biochim Biophys Acta.1800(2):181-9, 2010.

HAUPT B, RO JY, SCHWARTZ MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. Arch Pathol Lab Med. 134(1):130-3, 2010.

HENG HH, BREMER SW, STEVENS JB, YE KJ, LIU G, YE CJ. Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective. J Cell Physiol. 220(3):538-47, 2009

HIRABAYASHI J, KASAI K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. Glycobiology. 3(4):297-304, 1993.

IHARA S, MIYOSHI E, NAKAHARA S, et al. Addition of beta1-6 GlcNAc branching to the oligosaccharide attached to Asn 772 in the serine protease domain of matriptase plays a pivotal role in its stability and resistance against trypsin. *Glycobiology* 14:139-46, 2004.

IKEMORI, R. Y. 2009 Análise de possíveis mecanismos e conseqüências funcionais da expressão da galectina-3 em células de glioma expostas a condições hipóxicas”, Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP

INCA - Estimativa 2010 - Incidência de Câncer no Brasil - 2009 – INCA Acessado em [www1.inca.gov.br/estimativa/2010/](http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/) no dia 01/08/2011

INGBER DE. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment? *Semin Cancer Biol.* 18(5):356-64, 2008.

INKA BROCKHAUSEN, HARRY SCHACHTER, AND PAMELA STANLEY. O-GalNAc Glycans. In 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

JU T, OTTO VI, CUMMINGS RD. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 18;50(8):1770-91

JULIEN S, ADRIAENSSENS E, OTTENBERG K, FURLAN A, COURTAND G, VERCOUTTER-EDOUART AS, HANISCH FG, DELANNOY P, LE BOURHIS X. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 16(1):54-64, 2006.

JUNG EJ, MOON HG, CHO BI, JEONG CY, JOO YT, LEE YJ, HONG SC, CHOI SK, HA WS, KIM JW, LEE CW, LEE JS, PARK STGalectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *Int J Cancer*. 1;120(11):2331-8, 2007.

JUNG TY, JUNG S, RYU HH, JEONG YI, JIN YH, JIN SG, KIM IY, KANG SS, KIM HS Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg*. 109(2):273-84, 2008.

KANNAGI R, IZAWA M, KOIKE T, MIYAZAKI K, KIMURA N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2004;95:377-384.

KANNAGI R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J*. 30(3):189-209, 2007.

KOBATA A, AMANO J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol*, 83:429-39, 2005.

KOIKE T, KIMURA N, MIYAZAKI K, YABUTA T, KUMAMOTO K, TAKENOSHITA S, CHEN J, KOBAYASHI M, HOSOKAWA M, TANIGUCHI A, KOJIMA T, ISHIDA N, KAWAKITA M, YAMAMOTO H, TAKEMATSU H, SUZUKI A, KOZUTSUMI Y, KANNAGI. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;101(21):8132-7. 2004.

KOLSET SO, PRYDZ K, PEJLER G. Intracellular proteoglycans. *Biochem J*.379:217–227, 2004.

KOPF E, ZHARHARY D. Antibody arrays--an emerging tool in cancer proteomics. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(7-8):1305-17, 2007.

KOROURIAN S, SIEGEL E, KIEBER-EMMONS T, MONZAVI-KARBASSI B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry. *BMC Cancer*, 14;8:136, 2008.

KUDO T, NAKAGAWA H, TAKAHASHI M, et al. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*; 6:32, 2007.

KUKLINSKI, S.; PESHEVA, P.; HEIMANN, C.; URSCHEL, S.; GLOOR, S.; GRAEBER, S.; HERZOG, V.; PIETSCH, T.; WIESTLER, O. D.; PROBSTMEIER, R. Expression pattern of galectin-3 in neural tumor cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, no 50: 45-57, 2003.

LAHM H, ANDRE S, HOEFLICH A, KALTNER H, SIEBERT HC, SORDAT B, VON DER LIETH CW, WOLF E, GABIUS HJ. Tumor galectinology: Insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J.*;20:227–238, 2004.

LAJOS I, EVA M. Cytochemical studies in acute leukemia in adults, clinical analysis of the course of the disease *Orv Hetil.* 4;117(27):1623-8, 2008.

LANDO, D.; PEET, D. J.; GORMAN, J. J.; WHELAN, D. A.; WHITELAW, M. L.; BRUICK, R. K. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.*, 16: 1466-1471, 2002 .

LAU KS, PARTRIDGE EA, GRIGORIAN A, SILVESCU CI, REINHOLD VN, DEMETRIOU M, DENNIS JW. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell.*;129:123–134, 2007.

Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ, Giaccia AJ, Koong AC. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol.* 10;23(35):8932-41, 2005.

LEE CM & TANNOC IF. The distribution of the therapeutic monoclonal antibodies cetuximab and trastuzumab within solid tumors. *BMC Cancer*; 10:255, 2010.

LEFFLER H. Galectins structure and function—A synopsis. *Results Probl Cell Differ*. 33:57–83, 2001.

LI Q.; ANVER M. R.; LI Z.; BUTCHER D. O.; GILDERSLEEVE J.C. GaINAc $\alpha$ 1-3Gal, a new prognostic marker for cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 126:459-468, 2010.

LI J, SHI M, CAO Y, YUAN W, PANG T, LI B, SUN Z, CHEN L, ZHAO RC: Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun*, 342:1341-1351, 2006.

LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. V. G.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 179817: 6 pages, 2010.

LIN, H. M.; PESTELL, R. G.; RAZ, A. & KIM, H. R. Galectin-3 enhances cyclin D (1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*, 21:8001-8010, 2002

LIONEL FLAMANT, NOTTE A, NINANE N, RAES M, MICHIELS C Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Molecular Cancer*; 9:191, 2010.

LOGES S, MAZZONE M, HOHENSINNER P, CARMELIET P: Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell*, 15:167-170, 2009.

LOU Y, MCDONALD PC, OLOUMI A, CHIA S, OSTLUND C, AHMADI A, KYLE A, AUF DEM KELLER U, LEUNG S, HUNTSMAN D, CLARKE B, SUTHERLAND BW, WATERHOUSE D, BALLY M, ROSKELLEY C, OVERALL CM, MINCHINTON A, PACCHIANO F, CARTA F, SCOZZAFAVA A, TOUISNI N, WINUM JY, SUPURAN CT, DEDHAR S. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* 1;71(9):3364-76. 2011.

LIU FT, RABINOVICH GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.*5:29–41, 2005.

MAKKER, YOUNG SUK JUNG, YI WANG, Avraham Raz Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase Vitaly Balan, Pratima Nangia- *Biochimica et Biophysica Acta* 1803,1198–12052010.

MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W. & RATCLIFFE, P. J. The pVHL-HIF-1 system. A key mediator of oxygen homeostasis. *Adv Exp Bio*, 76: 502-365, 2001.

MEISNER, A. L. W.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. Breast disease: benign and malignant. *Medical Clinics of North America*, v. 92, n. 5, p. 1115-1141, 2008.

MELCHOR & JAVIER BENÍTEZ. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* vol.29 no.8 pp.1475–1482, 2008.

MOISA A, FRITZ P, ECK A, WEHNER HD, MÜRDTER T, SIMON W, GABIUS HJ Growth/adhesion-regulatory tissue lectin galectin-3: stromal presence but not cytoplasmic/nuclear expression in tumor cells as a negative prognostic factor in breast cancer. *Anticancer Res.* 27(4B):2131-9, 2007.

MOON, B-K.; LEE, Y. J.; BATTLE, P.; JESSUP, J. M.; RAZ, A. & KIM, H-R. C. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: Implication of galectin-3 function during metastasis. *American Journal of Pathology*, vol. 159, no 3: 1055-1060, 2001.

MUKHOPADHYAY P, CHAKRABORTY S, PONNUSAMY MP, LAKSHMANAN I, JAIN M, BATRA SK. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochim Biophys Acta.* ;1815(2):224-40, 2011.

NAKAHARA S, RAZ A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. *Cancer Metastasis Rev.* ;26(3-4):605-10, 2007.

NAKANISHI K, KAWAI T, SUZUKI M Lectin binding and expression of blood group-related antigens in carcinoma-in-situ and invasive carcinoma of urinary bladder. *Histopathology.* 23(2):153-8, 1993.

NAJAR M, RAICEVIC G, ID BOUFKER H, STAMATOPOULOS B, DE BRUYN C, MEULEMAN N, BRON D, TOUNGOUZ M, LAGNEAUX L. Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions. *Exp Hematol.* 38(10):922-32. 2010.

NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K. J. & RAZ, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *American Journal of Pathology,* 156(3): 899-909, 2000.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Dictionary of cancer terms. Disponível em: <http://www.cancer.gov/dictionary?expand=T>. Acesso em: Abr. 2011.

NICKEL W, RABOUILLE C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* ;10(2):148-55, 2009

NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, CHEANG M, KARACA G, HU Z, HERNANDEZ-BOUSSARD T, LIVASY C, COWAN D, DRESSLER L, AKSLEN LA, RAGAZ J, GOWN AM, GILKS CB, VAN DE RIJN M, PEROU CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15;10(16):5367-74, 2004.

NONOGAK S; CRISTINA TAKAMI KANAMURA; LUCIANA FRANÇA DE OLIVEIRA; MÔNICA CONTE BELA; YARA DE MENEZES; ALDA WAKAMATSU; RAIMUNDA TELMA DE MACEDO SANTOS; VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES. Análise de indicadores internos e externos relevantes à resolutividade diagnóstica em laboratório de referência em imuno-histoquímica. *J Bras Patol Med Lab* 43(4), 297-304, 2007.

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

OCHIENG J., GREEN B., EVANS S., JAMES O. AND WARFIELD P. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 97-106, 1998.

OLBRYT, M.; JARZAB, M.; JAZOWIECKA-RAKUS, J.; SIMEK, K.; SZALA, S.; SOCHANIK, A. Gene expression profile of B16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. *Gene Expression*, 13: 191-203, 2006.

PAMELA STANLEY, HARRY SCHACHTER, AND NAOYUKI TANIGUCHI. N-glycans, in 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

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

PEROU CM, SØRLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 7;406(6797):747-52, 2000.

PETERSON JJ, BANCROFT LW, KRANSDORF MJ. Principles of tumor imaging. *Eur J Radiol*, 56(3):319-30, 2005.

PIETRAS, K., AND OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 316: 1324–1331, 2010.

POTAPENKO, I.O.; HAAKENSEN, V.D.; LÜDERS, T.; HELLAND, A.; BUKHOLM, I.; SORLIE, T.; KRISTENSEN, V.N.; LINGJAERDE, O. C.; BORRESEN-DALE, A. C.

Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular Oncology*, 4(2): 98-118, 2010.

POWIS G, KIRKPATRICK L. 2004. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 3:647–654. *Virchows Arch*. 457:53–61,2010.

PUGH CW, RATCLIFFE PJ: Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292:468-472, 2001.

RABINOVICH GA, VIDAL M. Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 18(6):443-51, 2011.

RAKHA EA, ELSHEIKH SE, ALESKANDARANY MA, HABASHI HO, GREEN AR, POWE DG, EL-SAYED ME, BENHASOUNA A, BRUNET JS, AKSLEN LA, EVANS AJ, BLAMEY R, REIS-FILHO JS, FOULKES WD, ELLIS IO. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 1;15(7):2302-10, 2009.

RINI, J. M. *Annual reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*. 34-551:577, 1995.

RÊGO MJB, SANTOS LX, CARVALHO JUNIOR LB, BELTRÃO EIC, SOBRAL APV. Lectin histochemistry of mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol*; 1: 178-179, 2005.

RÊGO MJB, CORDEIRO MF, CAVALCANTI CBL, BELTRÃO EICB. Avaliação da histoquímica com lectinas no estroma do carcinoma ductal invasivo e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. *Revista Brasileira de Mastologia*; 20(3):109-114, 2010.

ROBBINS & COTRAN. Bases patológicas da doença, 2007.

RONALD L SCHNAAR, AKEMI SUZUKI, AND PAMELA STANLEY. Essentials of Glycobiology, Glicosphingolipidies in 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

RUAN K, SONG G, OUYANG G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*; 107(6):1053 -1062, 2009.

RUBINSTEIN N, ALVAREZ M, ZWIRNER NW, TOSCANO MA, ILARREGUI JM, BRAVO A, MORDOH J, FAINBOIM L, PODHAJECER OL, RABINOVICH GA. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-

mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 5(3):241-51, 2004.

RYU K, PARK C, JOO-LEE Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogenreceptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 407:831–836, 2011.

SAELAND E, VAN KOOYK Y. Highly glycosylated tumour antigens: interactions with the immune system. *Biochem Soc Trans*. 19;39(1):388-92, 2011.

SANCHEZ-RUDERISCH H, DETJEN KM, WELZEL M, ANDRÉ S, FISCHER C, GABIUS HJ, ROSEWICZ S.. Galectin-1 sensitizes carcinoma cells to anoikis via the fibronectin receptor  $\alpha 5\beta 1$ -integrin. *Cell Death Differ*. 18(5):806-16, 2011.

SANJUÁN X, FERNÁNDEZ PL, CASTELLS A, CASTRONOVO V, VAN DEN BRULE F, LIU FT, CARDESA A, CAMPO E. differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *gastroenterology*. 113(6):1906-15, 1997.

SATELLI A, RAO PS, GUPTA PK, LOCKMAN PR, SRIVENUGOPAL KS, RAO US. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep*. 19(3):587-94, 2008.

SATO, S.; HUGHES, R. C. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, poly lactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol Chem*, 267: 6983-6990, 1992.

SCHACHTER H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J.* 17:465–483, 2000.

SCHNITT SJ. Local outcomes in ductal carcinoma in situ based on patient and tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst Monogr.* (41):158-61, 2010.

SEWELL R, BÄCKSTRÖM M, DALZIEL M, GSCHMEISSNER S, KARLSSON H, NOLL T, GÄTGENS J, CLAUSEN H, HANSSON GC, BURCHELL J, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem.* 10;281(6):3586-94, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53-62, 2004.

SHEKHAR MP, NANGIA-MAKKER P, TAIT L, MILLER F, RAZ A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. *Am J Pathol.* 165(6):1931-41, 2004.

SHIMURA T, TAKENAKA Y, TSUTSUMI S, HOGAN V, KIKUCHI A, RAZ A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 15;64(18):6363-7, 2004.

SHIMURA T, TAKENAKA Y, FUKUMORI T, TSUTSUMI S, OKADA K, HOGAN V, KIKUCHI A, KUWANO H, RAZ A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res.* 2005; 65(9):3535-7.

SHIRATO K, NAKAJIMA K, KOREKANE H, TAKAMATSU S, GAO C, ANGATA T, OHTSUBO K, TANIGUCHI N. Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *J Clin Biochem Nutr.* 48(1):20-5, 2010.

SMIGAL C, JEMAL A, WARD E, COKKINIDES V, SMITH R, HOWE HL, THUN M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin.* 56(3):168-83, 2006.

SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19):10869-74, 2001.

SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, MARTIAT P, FOX SB, HARRIS AL, LIU ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;100(18):10393-8, 2003.

SOBRAL, A. P. V.; RÊGO, M. J. B. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Science*, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

STANLEY P, SCHACHTER H, TANIGUCHI N.N-GLYCANS.IN: VARKI A, CUMMINGS RD, ESKO JD, FREEZE HH, STANLEY P, BERTOZZI CR, HART GW, ETZLER ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 8, 2009

STILLMARK, H.. Über ricin, ein giftiges Fermenta us den Samen von Ricinus comm. L und einigen anderen Euphorbiaceen,1888; Thesis, Dorpat.

SUMNER WE 3rd, Koniaris LG, Snell SE, Spector S, Powell J, Avisar E, Moffat F, Livingstone AS, Franceschi D. Results of 23,810 cases of ductal carcinoma-in-situ.. *Ann Surg Oncol*, 4: 230-240, 2007.

SUNDBLAD V, CROCI DO, RABINOVICH GA.Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. *Histol Histopathol*. 26(2):247-65, 2011.

SUZUKI, O. & ABE, M. Cell surface N-glycosilation and sialylation regulate galectina-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma. *Onc Reports*, 19: 743-748, 2008.

SUZUKI O, NOZAWA Y, KAWAGUCHI T, ABE M. Alpha-2,6-sialylation of L-PHA reactive oligosaccharides and expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in human diffuse large B cell lymphoma. *Oncol Rep.* 10(6):1759-64. 2003

TAN EY, YAN M, CAMPO L, HAN C, TAKANO E, TURLEY H, CANDILORO I, PEZZELLA F, GATTER KC, MILLAR EK, O'TOOLE SA, MCNEIL CM, CREA P, SEGARA D, SUTHERLAND RL, HARRIS AL, FOX SB. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br J Cancer.* 27;100(2):405-11. 2009.

TANIGUCHI N. From the gamma-glutamyl cycle to the glycan cycle: a road with many turns and pleasant surprises. *J Biol Chem.* 11;284(50):34469-78, 2009.

THIJSSSEN VL, POIRIER F, BAUM LG, GRIFFIOEN AW. Galectins in the tumor endothelium; opportunities for combined cancer therapy. *Blood.* 110:2819–2827, 2007.

VAN DEN BRÛLE FA, WALTREGNY D, CASTRONOVO V. J Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *Pathol.* 193(1):80-7, 2011.

VAREJÃO N, ALMEIDA MDA S, DE CICCIO NN, ATELLA GC, COELHO LC, CORREIA MA, FOGUEL D. Heterologous expression and purification of a biologically

active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochim Biophys Acta*. 1804(9):1917-24, 2010.

VARKI A & CROCKER P.R. I-type Lectins. *Essentials of Glycobiology, Glicosphingolipidies* in 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VARKI A & SCHAUER R. Sialic Acids. *Essentials of Glycobiology, Glicosphingolipidies* in 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VARKI A & SHARON N. Historical Background and Overview. *Essentials of Glycobiology, Glicosphingolipidies* in 2nd edition Edited by Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VARKI A, KANNAGI R, TOOLE BP. Glycosylation Changes in Cancer. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VOSS MJ, MÖLLER MF, POWE DG, NIGGEMANN B, ZÄNKER KS, ENTSCHLADEN F. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. *BMC Cancer*, 11:158, 2011.

ZHENG Z, JI ZM. Studies on the location of eight lectins in breast carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 19(4):275-8, 1990.

WANG Y, AO X, VUONG H, KONANUR M, MILLER FR, GOODISON S, LUBMAN DM. Membrane glycoproteins associated with breast tumor cell progression identified by a lectin affinity approach. *J Proteome Res*. ;7(10):4313-25, 2008.

WIEST I, SELIGER C, WALZEL H, FRIESE K, JESCHKE U. Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1. *Anticancer Res*. 25(3A):1575-80, 2005.

WHO Cancer - World Health Organization. Acessado em [www.who.int/cancer/](http://www.who.int/cancer/), no dia 12/07/2011

WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 25(1):118-45, 2007.

YAMAMOTO H, SWOGER J, GREENE S, SAITO T, HURH J, SWEELEY C, LEESTMA J, MKRDICHIAN E, CERULLO L, NISHIKAWA A, IHARA Y, TANIGUCHI N, MOSKAL JR. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res.* 60(1):134-42, 2000.

YODER. BRIAN J, EDWARD J. WILKINSON, AND NICOLE A. MASSOLL. Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. *The Breast Journal*, 13( 2), 172–179, 2007.

YOSHII, T; FUKUMORI, T.; HONJO, Y.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; RAZ, A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of Biology Chemistry*, 277( 9): 6852-6857, 2002.

ZENG, Y. *J Bone Miner Res*, jun 25, 2007.

ZHAO Y, NAKAGAWA T, ITOH S, INAMORI K, ISAJI T, KARIYA Y, KONDO A, MIYOSHI E, MIYAZAKI K, KAWASAKI N, TANIGUCHI N, GU J. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem.* 2006 27;281(43):32122-3.

ZHUO, Y.; CHAMMAS, R.; BELLIS, S. L. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3 induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(32):22177-85 ,2008.