

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

EDSO HENRIQUE BATISTA BARROS

**Efeito da Hipóxia e/ou privação de nutrientes na
expressão de Galectina-3 em células neoplásicas de
mama: Possível papel na sobrevivência celular?**

Mestrado
PPGIT/UFPE
2016

**Recife
2016**

EDSO HENRIQUE BATISTA BARROS

Efeito da Hipóxia e/ou privação de nutrientes na expressão de Galectina-3 em células neoplásicas de mama: Possível papel na sobrevivência celular?

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof^o. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Recife

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barros, Edso Henrique Batista

Efeito da hipóxia e/ou privação de nutrientes na expressão de Galectina-3 em células neoplásicas de mama: possível papel na sobrevivência celular? / Recife: O Autor, 2016.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadora: Máira Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências

- 1. Mamas- câncer 2. Carboidratos 3. Metabolismo energético I. Rêgo, Moacyr Jesus de Melo (orientador) II. Máira Galdino da Rocha Pitta (coorient.) III. Título**

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 301

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Profº. Drº. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profº. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª. Drª. Maria Eduarda Lacerda de Larrazába

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª. Drª. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profª. Drª. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profº. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARROS, Edso Henrique Batista.

Título: Efeito da Hipóxia e/ou privação de nutrientes na expressão de galectina-3 em células neoplásicas de mama: Possível papel na sobrevivência celular?

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em inovação terapêutica.

Aprovada em: 11 / 08 / 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Avaliador externo)

Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

Assinatura: _____

Prof.^a. Dr.^a Maria Danielly Lima de Oliveira (Primeira Avaliadora Interna)

Instituição: Departamento de Bioquímica - UFPE

Assinatura: _____

Prof.^a. Dr.^a Luiza Rayanna Amorim de Lima (Segunda Avaliadora Externa)

Instituição: Faculdades Integradas de Patos - FIP

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa vitória à minha família. De forma especial, dedico aos meus pais que priorizaram a educação na minha vida. Eles me tornaram um vencedor. Devo cada conquista à grande aposta que meus pais fizeram desde o início da minha vida. Com muito carinho ao meu irmão, Elso Carlos e à Mayara Meyrelles.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus, meu Senhor, pelo dom magnífico da Vida. À Ele, minha gratidão pelas Graças, Bençãos, pelos inúmeros livramentos. Pela força e a coragem que do Alto ele me enviou.

A Nossa Senhora, Mãe de Deus e da humanidade, por atender as minhas súplicas e as minhas orações.

Agradeço à minha família. Meus pais, **Edmilson Francelino e Maria do Socorro**, pela educação exemplar, pelo apoio, pelo incentivo de sempre. Ao meu querido irmão, **Elsó Carlos**, pela companhia e amizade. Às minhas tias, que com muito amor e carinho, sempre me incentivaram à prática do bem e ao sucesso na vida.

À minha namorada e futura esposa, **Mayara Meyrelles**, o meu muito obrigado. Você sempre me ajudou, apoiou e incentivou na caminhada da Vida, tanto no pessoal, espiritual quanto no profissional.

Aos meus amigos que cultivo desde a graduação: **Michael Willames, Taciano França, Hector Deyvson e Hildeberto**.

Aos amigos e colegas LINATEanos: **Antônio Félix, Flaviana Alves, Thuanny Maryna, Lucas Souza, Lucas Tavares, Adson Belém, Sayonara Gonçalves, Pablo Gualberto, Marina Ferraz, Mardonny Chagas, Gabriela Souto, Thiago Lins, Wanessa Sena, Fernanda Gomes, Anderson, Wagner Oliveira** pelo grande apoio nesses dois anos de muita luta.

Agradeço ao meu orientador, **Profº. Drº. Moacyr Rêgo** pelo apoio, incentivo. Por estar sempre presente durante essa trajetória. Pelo conhecimento transmitido e sobretudo, em colaborar para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado por essa oportunidade.

Muito Obrigado!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação dos principais tipos de câncer entre as regiões mais desenvolvidas e o Brasil para ambos os sexos.	20
Figura 2. Hallmarks do câncer. Fonte: Weinberg, 2011	21
Figura 3. Regulação metabólica de HIF-1.	26
Figura 4. Classificação das Galectinas em relação ao domínio de reconhecimento de carboidratos.	27
Figura 5. Funções de Galectina-3 no microambiente tumoral.	29
Figura 6. Análise de expressão gênica de Gal-3 em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas.	66
Figura 7. Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 em período de 24 horas.	68
Figura 8. Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 em período de 48 horas.	69
Figura 9. Estratégia utilizada para delimitar e analisar população de células (Gate).	70
Figura 10. Análise de morte por incorporação de iodeto de propídio em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas.	71
Figura 11. Análise de ciclo celular por incorporação de iodeto de propídio em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação molecular do câncer de mama. 23

Tabela 2. Lista de condições de estudo e suas respectivas siglas. SFB: Soro Fetal Bovino 30

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

WHO – do inglês, World Health Organization

OMS – Organização Mundial de Saúde

GAL-3 – Galectina-3

N10 – Normóxia com nutrientes (10%)

N1 – Normóxia com privação de nutrientes (1%)

H10 – Hipóxia com nutrientes (10%)

H1 – Hipóxia com privação de nutrientes (1%)

SFB – Soro Fetal Bovino

PI – Iodeto de Propídeo

qRT-PCR – do inglês, quantitative Real-Time Reaction Chain Polymerase

HIF-1 α – Fator Induzido por Hipóxia

IARC, do inglês, International Agency for Research on Cancer

pH – Potencial Hidrogeniônico

CAIX – Anidrase Carbônica nove

GLUT-1 – Transportador 1 de Glicose

HER-2 – Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

RE – Receptor de Estrógeno

RP – Receptor de Progesterona

Ki-67 – Índice de proliferação celular

CK5 – Citoceratina 5

EGFR – Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico

ATCC – do inglês, American Type Culture Collection

DNA – Ácido Desoxirribunucleico

EPO - Eritropoietina

CRD – do inglês, Carbohydrates Recognition Domain

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

CO₂ – Gás Carbônico

PBS - do inglês, Phosphate-buffered saline

EDTA – do inglês, Ethylenediamine tetraacetic acid

HEPES – do inglês, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

pO₂ – Pressão parcial de Oxigênio

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

BSA – do inglês, Bovine Serum Albumins

DAPI – do inglês, 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.2	Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Câncer	18
3.2	Câncer de mama	22
3.3	Ambiente hipóxico	24
3.4	Galectina-3	27
4	METODOLOGIA	30
4.1	Cultivo das células	30
4.2	Ensaio de exposição em câmara de hipóxia	30
4.3	Análises de expressão gênica de gal-3 por PCR em tempo real	31
4.4	Extração de Proteínas	31
4.5	Gel de Poliacrilamida e <i>Western Blotting</i>	32
4.6	Imunofluorescência	32
4.7	Ensaio de inibição de Gal-3	33
4.8	Ensaio de morte e avaliação do ciclo celular	33
4.9	Análise estatística	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Artigo 1	34
5.2	Resultados obtidos com MDA-MB-231	66
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80

RESUMO

BARROS, E.H.B. Efeito da Hipóxia e/ou privação de nutrientes na expressão de galectina-3 em células neoplásicas de mama: Possível papel na sobrevivência celular?, 2016.

O microambiente do câncer de mama tem pobre distribuição de oxigênio e nutrientes. Para caracterizar o modelo *in vitro* e entender o papel de Gal-3 na sobrevivência de células neoplásicas de mama a esse ambiente adverso, linhagens de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, foram cultivadas e submetidas às seguintes condições de estudo: N10, normóxia com nutrientes 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); N1, normóxia com privação de nutrientes (1% SFB); H10, hipóxia com nutrientes (10% SFB) e H1, hipóxia sem nutrientes (1% SFB). A privação de oxigênio foi estabelecida em câmara de hipóxia em períodos de 24 e 48 horas. Para avaliar taxa de morte e ciclo celular, foi utilizada a incorporação de iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. Para caracterização da influência da hipóxia e/ou privação de nutrientes na expressão de Gal-3, foi realizada a avaliação do seu transcrito por qRT-PCR, expressão da proteína por western Blotting e localização subcelular por imunofluorescência. Para avaliar um possível papel de Gal-3 nas condições do estudo, morte e ciclo celular foram avaliados após inibição da galectina-3. Hipóxia com privação de nutrientes determina aumento na expressão de transcritos de Gal-3 em 48 horas, com consequente aumento na quantidade da glicoproteína Gal-3 no mesmo período. A privação de nutrientes determina a concentração de Gal-3 no núcleo. Além disso, a inibição de Gal-3 secretada aumenta a população de células mortas, sugerindo a participação de Gal-3 na sobrevivência de células MCF-7. Em células MDA-MB-231, a hipóxia aumentou os transcritos e determinou maior concentração intracelular de Gal-3. Hipóxia com privação de nutrientes reduziu com maior significância a população de células em G0-G1. Este estudo demonstrou a modulação de Gal-3 no microambiente do câncer de mama e avaliou a sobrevivência de células MCF-7 e MDA-MB-231 mediada por Gal-3.

Palavras-chave: Desregulação do metabolismo energético, Glicobiologia, carboidrato

ABSTRACT

Barros, E.H.B. Effect of hypoxia and / or nutrient deprivation in galectin-3 expression in neoplastic breast cells: possible role in cell survival?, 2016.

The microenvironment of breast cancer has poor distribution of oxygen and nutrients. To characterize the in vitro model and understand the Gal-3 role in the survival of neoplastic cells breast this adverse environment, breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 cells were grown and subjected to the following conditions study: N10, normoxia with nutrients 10% Fetal Bovine Serum (FBS); N1, normoxia with nutrient deprivation (1% FBS); H10, hypoxia with nutrients (10% FCS) and H1, nutrients without hypoxia (1% FCS). The oxygen deprivation was established in hypoxic chamber for periods of 24 and 48 hours. To assess rate of death and the cell cycle was used incorporation of propidium iodide (PI) by flow cytometry. To characterize the influence of hypoxia and / or nutrient deprivation in Gal-3 expression, the evaluation of its transcript by qRT-PCR, protein expression by western blotting and subcellular localization by immunofluorescence was performed. To assess a possible role of Gal-3 the conditions of the study, death and cell cycle were assessed after inhibition of galectin-3. Hypoxia with nutrient deprivation determines increased expression of Gal-3 transcripts in 48 hours, with a consequent increase in the amount of Gal-3 glycoprotein in the same period. The nutrient deprivation determines Gal-3 concentration in the core, independent of the presence of oxygen manner. Furthermore, inhibition of Gal-3 secreted increases the population of dead cells, suggesting Gal-3 participation in MCF-7 cell survival. In cells MDA-MB-231, hypoxia increased transcripts and determined the higher Gal-3 intracellular concentration. Hypoxia with deprivation of nutrients reduced with greater significance to the population of cells in G0-G1. This study Demonstrated the modulation of Gal-3 in the microenvironment of breast cancer and evaluated the survival of cells MCF-7 and MDA-MB-231 is Mediated by Gal-3.

Keyword: Deregulation of energetic metabolism, glycobiology, carbohydrate.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer representa uma das principais causas de mortes no mundo. Aumento na taxa de crescimento celular, capacidade de invasão, destruição de tecidos adjacentes, migração, angiogênese, resistência e evasão à morte celular são algumas características ou capacidades adquiridas pelas células tumorais. Enquanto um tecido normal possui características peculiares que estão relacionadas à função que este tecido exerce, a massa tumoral apresenta heterogeneidade celular. Ou seja, o tumor apresenta características do tecido parental bem como características de outros tecidos. Além disso, os tumores sólidos, como é o caso do câncer de mama, possuem regiões com distribuição pobre de oxigênio e nutrientes, o que dificulta as estratégias terapêuticas de combate ao câncer. A incidência do câncer vem aumentando com os anos. Em 2012, 14 milhões de indivíduos foram diagnosticados com câncer e o número de mortos ultrapassou 8 milhões em todo o mundo. Em 2020, espera-se que o número de novos casos ultrapasse 23 milhões (“WHO | Cancer”, 2015).

No câncer, as células que sofreram o processo de transformação maligna (carcinogênese) podem modular funções biológicas ao seu favor. Geralmente, essas células ou grupos de células formam tecidos de massa tumoral (sólidos) com capacidade, muitas vezes, de se destacar (migração) e invadir tecidos adjacentes ou mesmo distantes do sítio primário do tumor (GUSTERSON; STEIN, 2012).

As metástases, por sua vez, representam a principal causa de morte por câncer (ARTHMAR *et al.*, 2013). Nesse cenário, o câncer de mama recebe destaque por apresentar altas taxas de morbi-mortalidade de mulheres no Brasil e no Mundo (CRUCHO *et al.*, 2015). O diagnóstico tardio reduz as chances de cura, já que o curso evolutivo da doença nesses períodos reflete alto grau de agressividade, além de probabilidade aumentada de metástases (KUO; LE, 2014).

O câncer de mama é um tumor sólido, e como tal, apresenta regiões que não são irrigadas adequadamente (PORUK *et al.*, 2014). Isso acontece porque as células neoplásicas têm elevada taxa mitótica, formando camadas que se distanciam de vasos sanguíneos adjacentes, reduzindo a entrega de oxigênio e nutrientes (GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015). Essa condição é determinante

tanto para a morte de grande parte dessas células, como para o processo de adaptação que leva a sobrevivência, relacionada com expressão de genes que permitem a adaptação metabólica ao ambiente hostil (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

HIF-1 α (Fator Induzido por Hipóxia) é uma proteína produzida de forma constitutiva tanto por células normais quanto por células tumorais e representa a molécula central de adaptação ao ambiente hipóxico. O acúmulo e estabilização desse fator de transcrição ocorrem na ausência de oxigênio e modula a expressão de várias moléculas, incluindo galectina-3 (SAMANTA *et al.*, 2014).

Galectina-3 é uma glicoproteína que reconhece resíduos β -galactosídeos (MORE *et al.*, 2015). Dentre as 15 galectinas descritas, é a única classificada no subtipo químera, pois tem a capacidade de ligar-se a outras moléculas de Gal-3, formando uma estrutura pentamérica (HIRANO *et al.*, 2015). Gal-3 possui capacidade de modular inúmeras etapas da carcinogênese como proliferação celular, adesão, invasão e metástase.

De modo geral, as galectinas têm sido amplamente estudadas, já que suas funções estão relacionadas com eventos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos (BERARDI *et al.*, 2015). Gal-3 tem sido relatada em diversos tipos de tumores e suas funções foram determinadas de acordo com o tipo de neoplasia, ou seja, Gal-3 atua de forma particular em cada tipo de câncer (SONG *et al.*, 2014a). Assim, descrever os potenciais mecanismos de modulação de Gal-3 no microambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes no câncer de mama, pode responder se essa proteína participa do processo de sobrevivência da célula neoplásica ao ambiente hostil.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o papel de Gal-3 na sobrevivência de linhagens de células mamárias neoplásicas (MCF-7 e MDA-MB-231) em ambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a expressão gênica e proteica de Gal-3 em células de linhagem de câncer de mama em condições combinadas de hipóxia e privação de nutrientes;

Analisar a localização subcelular de Gal-3, no microambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes;

Analisar os efeitos da Gal-3 no ciclo celular e na sobrevivência das células no microambiente hipóxico e privado de nutrientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER

O corpo humano possui trilhões de células que participam de um processo chamado divisão celular (DALZIEL *et al.*, 2014). Cada célula possui inúmeros genes, que são responsáveis por fornecer informações quanto à organização estrutural, bem como as atividades desempenhadas por esta célula.

Na transferência de informação genética, uma célula normal pode sofrer alterações significantes no DNA de seus genes. Essas modificações, em última análise, permitem a entrega de informações erradas (BABU *et al.*, 2013). Nesse sentido, genes denominados protooncogenes, inativos em células normais, são ativados e transformam-se em oncogenes, sendo responsáveis pela malignização das mesmas (BARTON MD, 2014).

O processo de formação do câncer, também conhecido como carcinogênese, ocorre de forma lenta na maioria dos casos e está relacionado às interações entre fatores genéticos e ambientais (LAUBLI *et al.*, 2014). Apresenta vários estágios até a completa transformação maligna, onde se pode destacar: (a) estágio de iniciação, que representa o primeiro estágio carcinogênico. Nele, as células sofrem os efeitos dos agentes carcinógenos que provocam modificações gênicas. (b) estágio de promoção, onde as células que sofreram os efeitos iniciais são transformadas de forma lenta e gradual em uma célula maligna, (c) estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação desordenada de células malignas. Nesse estágio, o tumor está instalado e em desenvolvimento e pode eventualmente se disseminar (CARVALHO *et al.*, 2014).

Quanto aos fatores de riscos envolvidos no processo de carcinogênese, a Organização Mundial de Saúde apresenta uma lista onde os principais itens são: consumo de tabaco; excesso de peso ou obesidade; uma dieta rica em gorduras e pobre em frutas e legumes; falta de atividade física ou sedentarismo; uso demorado de álcool; infecção por HPV, entre outras doenças sexualmente transmissíveis; radiações ionizantes e não-ionizantes, entre outros (“WHO | Cancer”, 2015).

O câncer é um problema mundial de saúde pública, sendo responsável pelo número crescente de mortes tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e emergentes (SIEGEL, REBECCA L; MILLER; JEMAL, 2016). Em consequência ao processo de industrialização, houve uma sincronização das sociedades em ordem mundial, regendo uma nova definição na jornada de trabalho, no tempo dedicado à nutrição e consumo de modo geral (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2015; MEDICAL *et al.*, 2013).

Em 2012, cerca de 14 milhões de novos casos de câncer foram confirmados no mundo. Ademais, no mesmo ano foram relatados 8,2 milhões de mortes e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer. Dentre esta mortalidade, os principais tipos de cânceres envolvidos foram: pulmão (1,59 milhões de mortes); fígado (745 mil mortes); estômago (723 mil mortes); colorretal (694 mil mortes); mama (521 mil mortes) e câncer esofágico (400 mil mortes) (GLOBOCAN, 2012).

O câncer não representa um problema de saúde apenas para determinada região ou classe social, e não acontece somente em regiões mais pobres. Países desenvolvidos, países subdesenvolvidos e emergentes também são acometidos. Conforme os dados apresentados pela Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (IARC), pôde-se fazer uma comparação entre o Brasil e os países desenvolvidos no tocante à incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer (Figura 1).

Nos Estados Unidos da América, por exemplo, o câncer é uma das principais causas de morte. Segundo estimativas, mais de 1,6 milhões novos casos de neoplasias são esperados para o ano de 2016, com quase 600 mil mortes (SIEGEL, REBECCA L; MILLER; JEMAL, 2016).

A incidência e mortalidade de um tipo específico de câncer podem ser diferentes quando comparados por sexo. Em geral, as neoplasias acontecem em homens e mulheres com taxas diferentes (SIEGEL, REBECCA L; MILLER; JEMAL, 2016; SIEGEL, REBECCA *et al.*, 2014), mas existem tumores com maior incidência para determinado gênero. Como exemplo, tem-se o câncer de mama. A glândula mamária humana é um órgão que sofre diversas mudanças durante toda a vida, sobretudo, no período pós-natal (MÁRQUEZ-ACOSTA, 2012). Há semelhanças

entre as mamas de homens e mulheres quanto à celularidade e anatomia (RAOUF *et al.*, 2012). Mas, em determinado momento, com a puberdade, hormônios sexuais atuam de forma decisiva nas primeiras diferenças até a formação da mama adulta. Tais particularidades assinalam as diferenças de incidência do câncer de mama entre homens e mulheres.

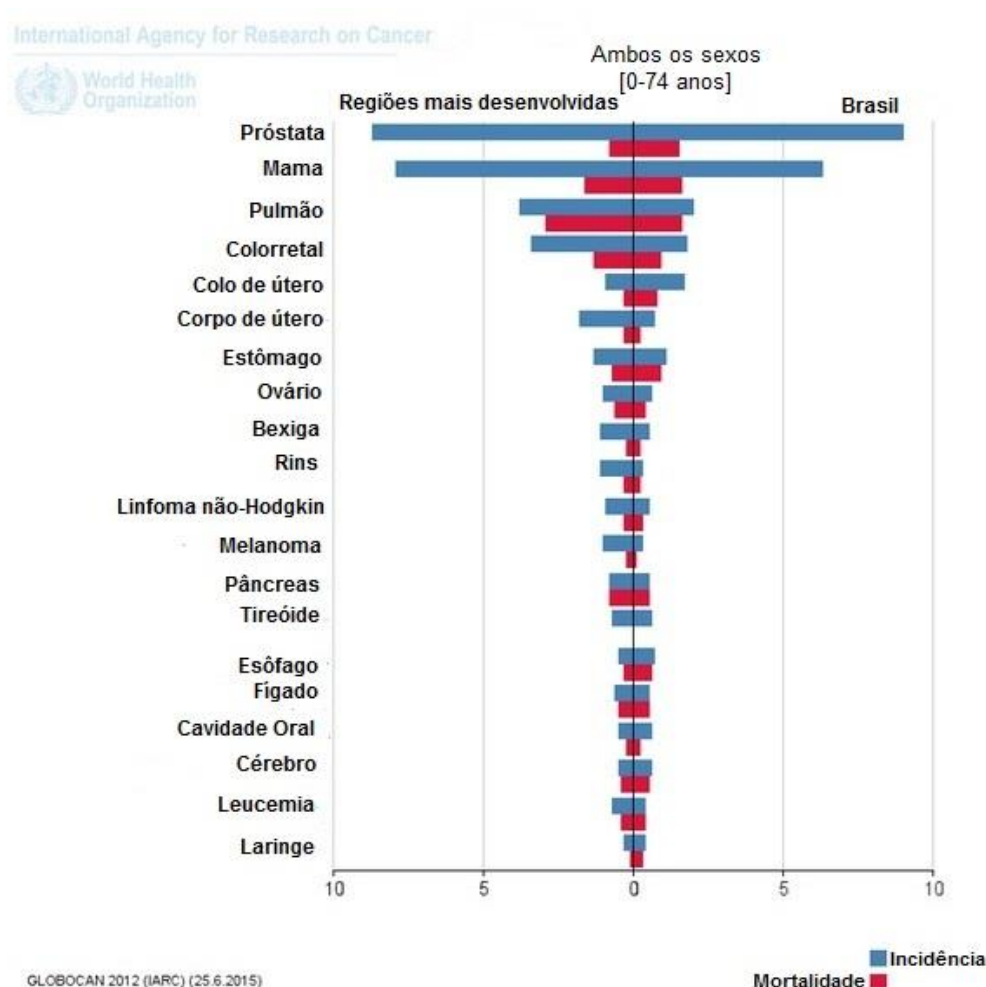


Figura 1. Comparação dos principais tipos de câncer entre as regiões mais desenvolvidas e o Brasil para ambos os sexos. Fonte: GLOBOCAN 2012 (IARC). Disponível em <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. acesso em 25.06.2015. Adaptado pelo autor

O câncer possui múltiplos estágios de desenvolvimento que apresentam características intrínsecas (NUNNEY; MUIR, 2015). Os Hallmarks são capacidades biológicas adquiridas pelas células durante o desenvolvimento do tumor (Figura 2). Entre essas capacidades, estão a manutenção de sinalização proliferativa, fuga de fatores de supressão do tumor, resistência à morte celular, indução de angiogênese, imortalidade replicativa, invasão e metástase, promoção da inflamação, evitar supressão do crescimento, evitar destruição do sistema imune, desregulação do metabolismo energético e resistência a morte celular (HANAHA; WEINBERG, 2011).



Figura 2. Hallmarks do câncer. Fonte: Weinberg, 2011. Adaptado pelo autor

O tumor possui a capacidade de recrutamento células, aparentemente normais, que desenvolvem funções pró-tumorais, criando o microambiente tumoral permissível ao seu desenvolvimento (NUNNEY; MUIR, 2015). Este trabalho está inserido no estudo das capacidades de desregulação do metabolismo energético bem como resistência à morte celular. No contexto do metabolismo energético desregulado, as células tumorais adaptam-se ao microambiente adverso, com baixas concentrações de oxigênio e pouca disponibilidade de nutrientes, adquirindo a capacidade de resistir à morte celular, graças à ativação genes responsáveis pelo controle do pH (CAIX) e captação de glicose (GLUT-1), por exemplo.

3.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama está entre os principais tipos de tumores malignos e recebe destaque pelo grande número de novos casos a cada ano e pelos altos índices de morbi-mortalidade (SIEGEL, REBECCA L; MILLER; JEMAL, 2015). Representa o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e ocorre tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos e emergentes (TAKAHASHI; MIYAZAKI; OCHIYA, 2015). Nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 230.000 novos casos de câncer de mama são estimados para o ano de 2015 para ambos os sexos (SIEGEL, REBECCA L; MILLER; JEMAL, 2015). Deste número, apenas 2.000 novos casos são esperados para o sexo masculino. No Brasil, a formação do tumor mamário está relacionada ao processo de industrialização com aspectos já conhecidos, como: baixa paridade, idade precoce da menarca e menopausa tardia, obesidade e consumo de álcool.

Devido ao alto impacto social e econômico, a busca de biomarcadores que forneçam valor diagnóstico, prognóstico e de resposta à terapia para o câncer de mama é uma constante. Algumas moléculas atuam como biomarcadores e já possuem valores clínicos associados, como os receptores hormonais, marcadores de proliferação celular, fatores de angiogênese tumoral, além de produtos proteicos de genes supressores ou promotores tumorais (CARVALHO *et al.*, 2014).

O tumor de mama possui um sistema de classificação molecular particular, sendo baseado nas características intrínsecas do tumor. É dividido em 5 subtipos: luminal A, luminal B, triplo negativo, Her-2 e basal-like. Os subtipos mais comuns são luminal A e B, que correspondem a 60% dos carcinomas mamários (CAY, 2012).

Luminal A representa os tumores de baixo grau histológico, que revelam alta expressão de receptores de estrógeno e progesterona, com baixa proliferação celular. Nesse subtipo, a hormonioterapia constitui uma forma eficaz de terapia adjuvante, sendo o subtipo com melhor valor prognóstico. O tipo Luminal B é segundo mais frequente, e apresenta maior grau histológico e maiores taxas de proliferação celular avaliados pelo índice Ki-67 (GUSTERSON; STEIN, 2012).

O subtipo Her-2 não apresenta expressão de receptores de estrógeno e progesterona, mas expressa o oncogene Her-2, conferindo perfil metastático ao

tumor devido sua maior agressividade. Os tumores triplo-negativos são conhecidos por apresentar maior resistência a tratamentos antineoplásicos e são considerados os mais agressivos (RUST *et al.*, 2013).

Subtipo Molecular	Classificação com índice de Ki-67
LUMINAL A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
LUMINAL B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14%
SUPEREXPRESSÃO DE HER-2	RE-, RP- e HER2+
BASALOIDE	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
TRIPLO NEGATIVO	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Tabela 1. Classificação molecular do câncer de mama. RE, Receptor de Estrógeno. RP, Receptor de Progesterona. HER2, Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. CK5, Citoqueratina 5. EGFR, Receptor do tipo 1 do fator de crescimento epidérmico. Ki-67, marcador de proliferação celular. Fonte: autor.

MCF7 (ATCC® HTB22™) tem classificação molecular Luminal A com receptor de estrógeno positivo (RE+) e receptor de progesterona negativo (RP-) com capacidade de formar grumos e baixo potencial metastático. As células MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™) são Triplo negativas (RE-, RP- e HER2-) com alta capacidade de realizar metástase e representam pior valor prognóstico. Essas diferenças determinaram a escolha das linhagens a serem trabalhadas.

Na carcinogênese da mama, o tecido glandular mamário dá origem à massa de tecido tumoral sólida que apresenta regiões centrais irrigadas inadequadamente ou de forma insuficiente (VASCONCELOS *et al.*, 2015). Nesses locais onde há deficiência de oxigênio e nutrientes comumente ocorre o aparecimento de núcleos necróticos ou cores necróticos (ZHANG, JUN; LI; LU, 2015).

É no ambiente hipóxico que as células de câncer de mama se desenvolvem. Alguns fatores transcricionais recebem destaque, como HIF-1, pois promove a expressão de genes que permitem a adaptação das células do câncer de mama ao ambiente privado em oxigênio (NAGPAL *et al.*, 2015).

3.3 AMBIENTE HIPÓXICO

O câncer de mama é um tumor sólido que apresenta regiões centrais com pobre distribuição de oxigênio e nutrientes, que promovem desregulação metabólica com morte celular por necrose (REGO *et al*, 2014). Contudo, as células localizadas na região perinecrotica adaptam-se às condições adversas de supressão de oxigênio e nutrientes e para tal várias moléculas são recrutadas.

No campo da oncologia, existe o chamado *Warburg effect* ou efeito Warburg, em português, que se refere ao número predominante de células que obtém energia através de alta taxa de glicólise com consequente fermentação de ácido láctico no citoplasma. Associado ao efeito está alta taxa de crescimento celular e malignidade onde as células têm taxas glicolíticas aumentadas em 200 vezes quando comparadas com células ou tecidos normais (GATENBY; GILLIES, 2008).

As diferenças metabólicas são iniciadas por proto-oncogenes ativados, que se tornam oncogenes e perpetuam as características fisiológicas e as demais alterações no ambiente tumoral. O oxigênio molecular é o principal carreador dessas alterações, sendo responsável em comandar a fisiopatologia do tumor (PARKS *et al.*, 2016).

Devido a intensa atividade metabólica associada à proliferação celular e progressão tumoral, as células neoplásicas necessitam de um fornecimento melhorado de nutrientes para suportar sua bioenergética. Porém, é um grande desafio fornecer mais nutrientes quando há um cenário caótico com distanciamento de vasos e capilares sanguíneos (MCCRACKEN; EDINGER, 2013).

O Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1) é um fator de transcrição que se liga a regiões específicas do DNA chamadas de elementos responsivos à hipóxia. É formado por duas subunidades, alfa (α) e beta (β) (ZHONG *et al.*, 2015). A subunidade α é uma proteína produzida de forma constitutiva tanto por células normais quanto células tumorais e a estabilização molecular depende de baixas concentrações de oxigênio, que ocorre com o distanciamento de massa tumoral dos vasos sanguíneos (REGO *et al*, 2014).

Em condições normais de concentração de oxigênio, HIF-1 α é hiroxilado em regiões específicas denominadas Domínios de Hidroxilação de Prolina (PDH), que permite o reconhecimento pela proteína pVHL (Von Hippel Lindau), sendo degradado via ubiquitina-proteassoma (Figura 3) (CHOUDHRY; HARRIS; MCINTYRE, 2016). Na privação de oxigênio, o Fator Induzido por hipóxia transloca para o núcleo e dimeriza com a subunidade beta, tornando HIF-1 ativo e participando da transcrição de genes que fomentarão a adaptação das células aumentando a captação de nutrientes, regulando o metabolismo celular e a remoção de resíduos metabólicos (MCCRACKEN; EDINGER, 2013)

A hipóxia tumoral está relacionada com aumento de potencial invasivo pelas células neoplásicas e metástases. Clinicamente, a hipóxia está associada com pior prognóstico para o paciente com aumento da resistência à tratamentos quimio e radioterápicos. (CHOUDHRY; HARRIS; MCINTYRE, 2016; FRAGA *et al.*, 2015; RÊGO *et al.*, 2013).

A adaptação metabólica mediada por HIF-1 é relacionada com a transcrição gênica do Fator de Crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável pela formação de novos vasos; Anidrase carbônica IX (CAIX) para controlar a acidez do microambiente tumoral; Eritropoietina (EPO) para formação de novas hemoglobinas; Transportador de glicose (GLUT-1) para maior captação de glicose (FRAGA *et al.*, 2015). Em adição, hipóxia promove expressão aumentada de Galectina-3 (SEMENZA, 2015).

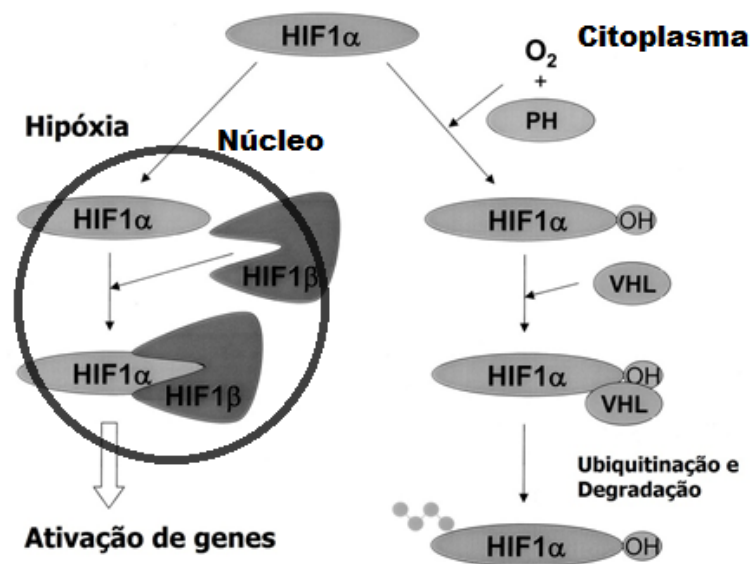


Figura 3. Regulação metabólica de HIF-1. HIF-1 α (Fator induzido por Hipóxia-1 alfa); OH (Oxigênio); PHD (Domínio de Hidroxilação de Prolina); VHL (Von Hippel Lindau); CA IX (Anidrase Carbônica); GLUT-1 (Transportador de Glicose); VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial). Fonte: (HOEBEN *et al.*, 2004), Adaptado pelo autor.

Nível elevado de HIF-1 α em carcinoma oral de células escamosas está associado com pobre prognóstico, progressão tumoral e metástase linfonodal (VASCONCELOS, 2015). No câncer de mama, a adaptação metabólica mediada por HIF-1 fomenta a proliferação celular e progressão do tumor (CHOUDHRY; HARRIS; MCINTYRE, 2016; NAGPAL *et al.*, 2015).

O microambiente do tumor, sobretudo a porção extracelular é ácida devido a liberação de metabólitos de caráter ácido, como o gás CO₂ e ácido láctico, além redução de perfusão de oxigênio graças ao maior distanciamento dos vasos e capilares sanguíneos (CHOUDHRY; HARRIS; MCINTYRE, 2016).

Proteínas localizadas na região transmembrana são responsáveis pelo controle iônico de H⁺ entre as porções intra e extracelular. No tumor, as células se beneficiam do desbalanço no pH: enquanto no ambiente intracelular, ligeiramente mais alcalino, funções como proliferação celular e fuga à apoptose são mantidas, no meio extracelular, a acidez promove degradação da matriz facilitando a invasão e metástase (ROFSTAD *et al.*, 2006).

3.4 GALECTINA-3

Galectina-3 é uma glicoproteína com aproximadamente 30 kDa que reconhece resíduos β -galactosídeos, como o poli-N-acetil-lactosamina. De modo geral, as galectinas possuem uma região comum e conservada de aminoácidos em sua estrutura. Galectina-3 possui um CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*), domínio de reconhecimento a carboidratos em sua região C-terminal e um N-terminal capaz de promover a oligomerização ou multimerização, onde se liga a outras moléculas de Gal-3 (XIN; DONG; GUO, 2015)

Entre as galectinas descritas e conhecidas (Figura 4), Gal-3 é a única do subtipo químera, pois tem a capacidade de ligar-se a outras moléculas de Gal-3, formando uma estrutura pentamérica. A pentamerização confere a capacidade de ligação à outras glicoproteínas e o reconhecimento simultâneo de diferentes carboidratos. É considerada como uma proteína multifuncional com funções dependentes de localização celular. Essa molécula encontra-se no meio extracelular, participando da adesão celular, interações célula-célula, ativação celular e quimioatração, e no meio intracelular, promovendo processamento do RNAm, regulação do ciclo celular, apoptose, crescimento celular e diferenciação (CAY, 2012; FORTUNA-COSTA *et al.*, 2014). Gal-3 é amplamente encontrada no núcleo celular, no citoplasma e na membrana celular (XU, YANGYANG *et al.*, 2016)

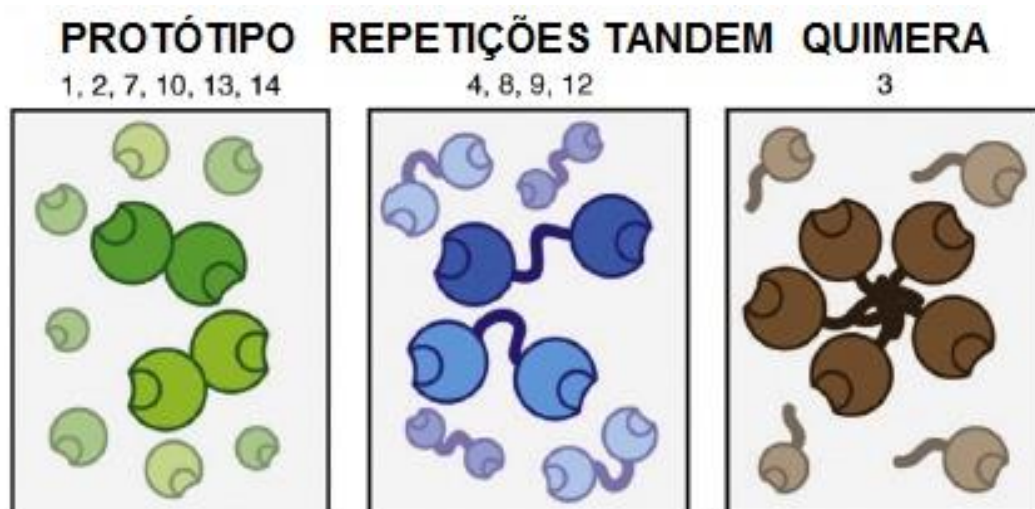


Figura 4. Classificação das Galectinas em relação ao domínio de reconhecimento de carboidratos. Fonte: V.L. Thijssen *et al.* / Biochimica et Biophysica Acta 1855 (2015)

É amplamente encontrada no organismo humano, sendo expressa por tipos variados de células, tais como: eosinófilos, neutrófilos, macrófagos ativados, células epiteliais do trato gastrointestinal e respiratório, rins e alguns neurônios sensoriais (CAY, 2012; PALAZON *et al.*, 2014). No câncer, Gal-3 desempenha funções importantes. O N-terminal está intimamente associado à progressão do tumor e angiogênese, enquanto o C-terminal promove invasão do tumor e metástase ((WESLEY *et al.*, 2013).

Além de funções dependentes de localização celular, Gal-3 exerce papéis diferentes em tipos diferentes de câncer. Super-expressão de Gal-3 está associada com promoção do câncer, como melanoma, câncer gástrico, câncer de pulmão, glioblastoma, linfoma, entre outros (SONG *et al.*, 2014a). Por outro lado, a diminuição na expressão de Gal-3 promove supressão de tumores de próstata, leucemia, pele não-melanoma, mama e carcinoma de células renais (XU, Y. *et al.*, 2016).

Devido à dualidade funcional de Gal-3 e a ampla distribuição dessa glicoproteína em diferentes tipos de tumores, este trabalho priorizou a caracterização do microambiente do câncer de mama bem como a participação de Gal-3 na sobrevivência celular, analisando linhagens com características moleculares distintas.

No desenvolvimento do tumor, Gal-3 modula diversas vias de sinalização (Ras, Raf, MEK, ERK e Notch), regulando a sobrevivência celular bem como a proliferação e migração (Figura 5). No meio extracelular, Gal-3 promove migração de células tumorais pela comunicação com integrinas. Associada à capacidade de oligomerização, Gal-3 liga-se às células endoteliais e impede a internalização de VEGFR, regulando negativamente a cascata de ativação de angiogênese (CARDOSO *et al.*, 2016).

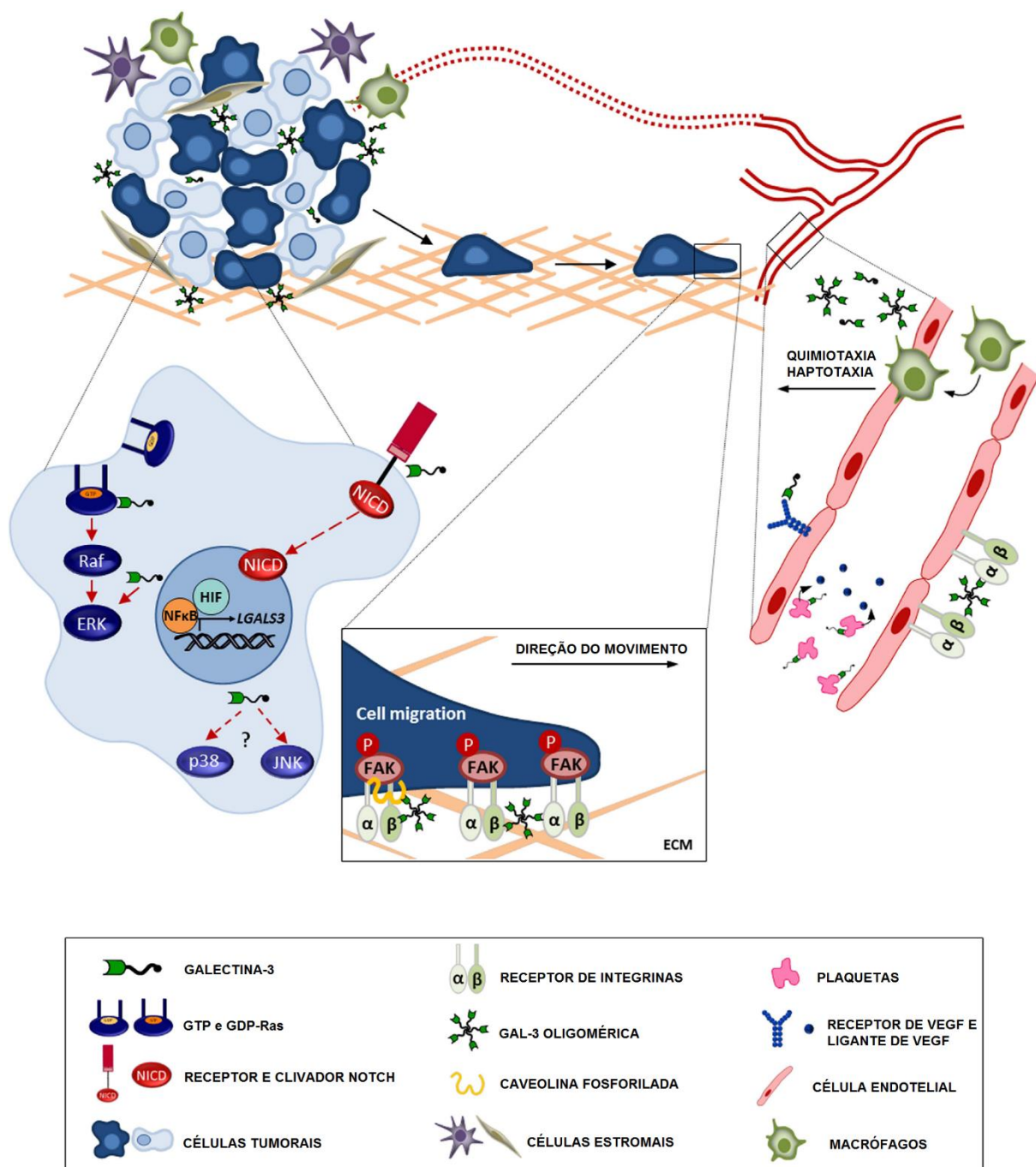


Figura 5. Funções de Galectina-3 no microambiente tumoral. Fonte: Cardoso ACF, Andrade LNS, Bustos SO e Chammas R, (2016). *Galectin-3 determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments* Front, Oncol. doi:10.3389/fonc.2016.00127. Adaptado pelo autor.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo das células

As linhagens celulares MCF-7 (Positiva para Receptor de estrógeno, Receptor de Progesterona e HER-2 e com baixa capacidade de realizar metástases) e MDA-MB-231 (Negativa para Receptor de estrógeno, Receptor de Progesterona e HER-2 e com alta capacidade de realizar metástases) foram cultivadas em meio RPMI 1640 e Leybovitz L-15, respectivamente, suplementadas com soro fetal bovino (SFB), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e bicarbonato de Sódio em estufa de atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Segundo a *American Type Culture Collection* (ATCC), o cultivo de MDA-MB-231 deve ser feito sem exposição da garrafa ao fluxo de CO₂. Sendo assim, MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas sem filtro e permaneceram bem fechadas na estufa. Para o repique das células, utilizou-se PBS-EDTA e tripsina.

4.2 Ensaios de exposição em câmara de hipóxia

As células foram submetidas às condições de estudo descritas na Tabela 2. As placas em condição de normóxia foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C, enquanto as placas para condição de hipóxia foram introduzidas em câmara de hipóxia (Billupus-rothenberg – Modular Incubator Chamber) com pO₂<1,5%, em períodos de 24 horas e 48 horas. Na câmara de hipóxia, foi admitido um fluxo de gases Nitrogênio (19L/min) e CO₂ (1L/min) para remover o oxigênio. Nos ensaios com MDA-MB-231, não houve infusão de gás CO₂.

SIGLA	CONDIÇÃO
N10	Normóxia com nutrientes (10% SFB)
N1	Normóxia com privação de nutrientes (1% SFB)
H10	Hipóxia com nutrientes (10% SFB)
H1	Hipóxia com privação de nutrientes (1% SFB)

Tabela 2. Lista de condições de estudo e suas respectivas siglas. SFB: Soro Fetal Bovino

4.3 Análises de expressão gênica de gal-3 por PCR em tempo real

As células foram submetidas ao procedimento de extração de RNAm com *Trizol*[®] *ReagentLifesTechnologies*TM, onde foram homogeneizadas com auxílio do Vortex. Em seguida, as amostras ficaram 5 minutos à temperatura ambiente para separação do complexo núcleo-proteína. Cerca de 200µl de clorofórmio foram adicionados para ajudar na separação. As amostras foram então centrifugadas (14.000 RPM por 20 minutos) e a fase translúcida superior foi recuperada com auxílio de pipeta automática *Eppendorf*[®]. Em seguida, foram adicionados 500µl de Isopropanol para precipitação do RNA e as amostras permaneceram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Novamente, as células foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido com auxílio de pipeta automática. Cerca de 1 mL de etanol 75% foi adicionado e as amostras foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi delicadamente desprezado e o pellet de RNA foi diluído usando-se água livre de RNAase. A quantificação espectrofotométrica foi realizada em *NanoDrop 2000Thermo Scientific*TM. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase (30%). SuperScript III (invitrogen) foi utilizado para síntese de cDNA como descrito pelo fabricante. As reações qRT-PCR foram realizadas no StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied BiosystemsTM).

4.4 Extração de proteínas

Cerca de 1×10^6 células foram adicionadas em garrafas de cultura 25cm² e submetidas às condições de estudo. Em seguida, foi adicionado o tampão de lise - fração citoplasmática para extração de proteínas. O volume total foi recolhido e centrifugado. O sobrenadante foi classificado como fração citoplasmática e o *pellet* foi resuspendido em tampão de Lise - fração nuclear e centrifugado novamente, sendo este novo sobrenadante classificado como de fração nuclear. As frações foram homogeneizadas para dosagem de proteínas usando o kit de quantificação *Pierce*[®] *BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific*TM. Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas (Bio-RAD[®] USA) utilizando-se filtros de 570nm.

4.5 Gel de Poliacrilamida e Western Blotting

Após a extração e quantificação de proteínas, foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE 10%). Em seguida, os extratos proteicos separados foram transferidos para a membrana PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, Amershan) para o *blotting*. A membrana foi incubada com anti galectina-3 e anti beta-actina (1:1000), sendo depois utilizados os anticorpos secundários anti-rato para galectina (1:2000) e anti-camundongo para actina (1:2000) conjugados com peroxidase, respectivamente. A revelação da membrana foi realizada utilizando-se o ECL *Western Blottingsystem* da GE. A beta-actina foi utilizada como controle normalizador.

4.6 Imunofluorescência

Lamínulas de 13mm de diâmetro foram previamente autoclavadas e inseridas em placa de 24 poços para plaqueamento de 2×10^4 células por poço. Posteriormente, todas as placas foram condicionadas em estufa com CO₂ 5% a 37°C. Após a aderência das células nas lamínulas, o condicionamento foi realizado.. Ainda nos poços, as lamínulas receberam 500µl de paraformaldeído 7% para fixação das células por 15 minutos. Após fixação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com 500µl de PBS e as células foram permeabilizadas com 300µl de TRITON-X-100/PBS 0,2% por 5 minutos. Após lavagem com PBS, as lamínulas foram removidas dos poços a solução de bloqueio (PBS-BSA 5%) foi adicionada com incubação por 1 hora. Após o período de bloqueio, o anticorpo primário monoclonal anti Galectina-3 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-23938)1:100overnight. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS-BSA 0,5% por 10 minutos. O anticorpo secundário conjugado ao isotiocianato de fluoresceína FITC (*Vector Laboratories*) na diluição 1:100 foi adicionado, no escuro, em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS-BSA 0,5% por 10 minutos e contracoradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) diluído em PBS-BSA 5% por 15 minutos. As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS-BSA 0,5% por 10 minutos. O volume da última lavagem foi mantido para que não houvesse secagem das lamínulas enquanto as lâminas foram montadas.

Previamente, as lâminas permaneceram 24 horas em solução de etanol 70% para remoção de possíveis interferentes. Com as lâminas secas, adicionou-se uma gota de etelan. Com ajuda de uma agulha e uma pinça, retirou-se o excesso de PBS-BSA 0,5% em papel absorvente e a face da lamínula com célula foi colocada sobre a gota de etelan. A extremidade da lamínula foi vedada com esmalte e as lâminas foram montadas protegidas da luz. Por fim, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência FLoid® cell imaging station (Life Technologies).

4.7 Ensaios de Inibição de Gal-3

Cerca de 5×10^5 células foram inseridas em placas de 6 poços. Após o período para adesão das células às placas as células foram submetidas as condições de estudo com 25 mM de lactose ou 25 mM de sacarose ou M338 (Anticorpo monoclonal anti-gal-3 sem azida) foram adicionados em cultura. As placas foram submetidas ao condicionamento descrito no item 4.2. Por fim, as células foram processadas conforme descrito no item 4.8.

4.8 Ensaio de morte e avaliação do ciclo celular

Aproximadamente, 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de seis poços, submetidas às condições de estudo. As células passaram por processo de repique com PBS e tripsina, e foram fixadas em etanol 70% e mantidas em freezer -30°C até o procedimento de incubação com iodeto de propídeo (PI). As amostras com etanol 70% foram centrifugadas (2800 RPM durante 5 minutos). Em seguida, foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas novamente. Por fim, as amostras foram incubadas com solução PI (200µL por 30 minutos). Após o período de incubação, as amostras foram admitidas no aparelho citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6). Os processos de morte e ciclo celular foram avaliados pela incorporação de iodeto de propídio ao DNA no software BD CSampler.

4.9 Análise estatística

Todo os dados foram processados e a análise estatística dos resultados foi realizado no software GraphPad Prism 6 pelo teste Two-Way ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 - ARTIGO 1

Effect of Hypoxia and or / nutrient deprivation in galectin-3 expression in neoplastic breast cells: possible role in cell survival?

Edso Henrique Batista Barros¹, Antônio Félix da Silva Filho¹, Maíra Galdino da Rocha Pitta¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹

¹FEDERAL UNIVERSITY OF PERNAMBUCO, IMMUNOMODULATION LABORATORY AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES, 50670-910, RECIFE, PE, BRAZIL;

Corresponding author:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Rua Tereza Mélia, s/n, Cidade Universitária, UFPE Cidade Universitária / 50670-901.
Recife, PE- Brazil.
Email: moacyr.rego@gmail.com

ABSTRACT

Galectin-3 is a glycoprotein required in conditions of low oxygen tension and nutrient deprivation and is involved in cell growth and proliferation, migration, metastasis and apoptosis escape. The microenvironment of solid tumors has a distant regions of blood vessels and capillaries, making the perfusion of oxygen in that tissue low as well as the proper distribution of nutrients and effective removal of metabolites. To characterize the microenvironment of breast cancer and the influence of hypoxia and / or nutrient deprivation in Gal-3 expression, the evaluation was carried out of his transcribed by qRT-PCR, protein expression by western blotting and subcellular localization by immunofluorescence. Furthermore, the percentage of death and cell cycle were assessed. Gal-3 inhibition assays were performed to evaluate the role of this glycoprotein in survival of breast cancer cells in hypoxic microenvironment and private nutrients. The results suggest that hypoxia with nutrient deprivation determines the increase in gene expression and protein of Gal-3 and intranuclear concentration of galectin-3, however, nutrient deprivation is more limiting that hypoxia in Gal-3 modulation in microenvironment of breast cancer. The inhibition of Gal-3 by

addition of monoclonal antibody caused a significant increase of cell death. Together, these results suggest that Gal-3 promotes the survival of cells MCF-7 in adverse environment regardless of its lectin functions.

Keywords: Cancer, Starving, Glycobiology

INTRODUCTION

Cancer is a leading cause of death worldwide. Increase in the rate of cell growth, invasiveness, destruction of surrounding tissue, migration, angiogenesis, strength and avoidance of cell death are some characteristics or capabilities acquired by tumor cells (CAVALLO *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIANG *et al.*, 2015).

While a normal tissue has peculiar characteristics that are related to the function that performs this tissue, the tumor presents cellular heterogeneity present. That is, the parental tissue tumor has characteristics as well as characteristics of other tissues. Breast cancer has clinical, morphological and biological heterogeneity (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Therefore, there is a peculiar classification for this type of tumor, according to the invasiveness, histology, immunohistochemistry evaluation and tumor stage (MÁRQUEZ-ACOSTA, 2012).

In addition, solid tumors, such as breast cancer, have regions with poor distribution of oxygen and nutrients that offering resistance and reduce the effectiveness of therapeutic strategies in the fight against cancer (FURNARI *et al.*, 2015). Low oxygen pressure or tissue hypoxia promotes solid tumors via Hypoxia-Induced Factor. HIF-1 is a transcription factor that regulates the cellular response to hypoxia and acts as a key in oxygen homeostasis regulating (RÊGO *et al.*, 2013). Formed by an alpha (α) and beta (β) subunit that depends on the absence of oxygen to stabilize and become active (CARDOSO *et al.*, 2016).

The hypoxia-induced factor determines the activation of genes important in metabolic adaptation to shortage of oxygen, controlling the expression of proteins associated with angiogenesis, glycolysis, cell invasion, apoptosis, erythropoiesis, vascular tone, pH regulation and drug resistance (PARKS *et al.*, 2016).

Among the genes regulated by hypoxia there is LSGAL-3 gene that express galectin-3. Gal-3 is a glycoprotein with 32 to 35 kDa capable of recognizing β -galactoside residues. This protein has an N-terminal and a carbohydrate recognition domain which allow to regulate numerous biological functions (CALIFICE *et al.*, 2004; CARNERO; LLEONART, 2016).

It is located in the cytoplasm and nucleus where it promotes cell survival. Also, Gal-3 prevents the activation of the intrinsic apoptosis pathway and promotes cell proliferation (HANN *et al.*, 2011). In the extracellular environment, Gal-3 important modulates interactions between epithelial cells and the extracellular matrix (NAKAJIMA *et al.*, 2016). Furthermore, this galectin modulates cell adhesion and tumor progression. We propose to evaluate the Gal-3 modulation in the hypoxic microenvironment and / or deprived of nutrients and cell survival in breast cancer mediated by Gal-3.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture. MCF-7 cells (ATCC® HTB-22™) (human breast adenocarcinoma), positive estrogen receptor, negative progesterone/Her-2 receptor were grown in RPMI 1640 medium (Gibco®, UK) supplemented with serum fetal bovine (FBS) (Gibco®, UK), HEPES (Gibco®, UK) and bicarbonate of sodium in humid atmosphere oven at 37°C with 5% CO₂. For subculture of cells was used PBS-EDTA and trypsin.

Submission conditions of hypoxia and / or nutrient deprivation. The cells were subjected to the submission conditions of hypoxia and / or nutrient deprivation. N10 was control condition of the study because it has all normal cultivation conditions (21% of oxygen and 10% FBS). N1 was cultured in normoxic condition and nutrient deprivation (1% FBS). H10 was cultured in hypoxia with nutrients (1% of oxygen and 10% FBS) and H1 is the combined condition of hypoxia with nutrient deprivation. The normoxia was established in normal conditions of cultivation, as previously described. The condition of hypoxia was obtained in the hypoxic chamber (Del Mar, USA). To determine the ideal pressure of the study, was used an oxygen sensor (CAP 3000, Dräger, Germany), with pO₂<1,5%.

Extraction of mRNA and gene expression by qRT-PCR. Approximately 5x10⁵ cells were placed in plates of six wells in triplicate. For the procedure of extraction of mRNA was used the Trizol® Reagent Lifes Technologies™. After the quantification of mRNA by Nanodrop™ 2000, the synthesis of cDNA was performed using SuperScript III (Invitrogen) as described by the manufacturer. The reactions qRT-PCR were carried out with the ATGTCACCAGAAATTCCCAGTT primer. The reaction occurred in the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Extraction and protein dosage. Approximately 1x10⁶ cells were added into the 25cm² culture flasks and subject to the conditions of the study. After washing with PBS, was added to the lysis buffer for extraction of proteins. The cytoplasmic and nuclear fractions were homogenized and quantified by kit Pierce® BCA Protein

Assay Kit Thermo Scientific™. For reading samples, it was use microplate reader (Bio-RAD®, USA) using filters of 570nm.

Western blotting. After extraction and quantification of proteins were carried out analyses of proteins separated according to their molecular weight-apparent (SDS-PAGE 10%). Then, the extracts proteins separated were transferred to the membrane PVDF (Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amershan) for blotting. The membrane was incubated with the primary antibody monoclonal anti galectina-3 (Santa Cruz Biotechnology, Clone 9C4) and anti-Beta-actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). Then, was added the secondary antibodies anti-mouse (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) conjugated with peroxidase. The revelation of the membrane was carried out using the Amersham ECL Western Blotting Detection Kit. Beta-actin was used as a control normalizer.

Immunofluorescence for Gal-3. 2×10^4 cells were plated on cover slips 13mm in diameter and subjected to the conditions of the study. After fixing the cells with Paraformaldehyde 7%, procedure for detection of Gal-3 was performed. It was used the primary antibody monoclonal rat anti-Gal-3 (M3/38) (Santa Cruz Biotechnology) and secondary antibody anti-rat conjugated to Fluorescein (FITC) (Vector Laboratories). The nuclei of the cells were marked with DAPI and analyzed under fluorescence microscope (FLoid® cell imaging station (Life Technologies)).

Gal-3 inhibition assays. 5×10^5 cells were placed in 6-well plates. After the period for cell adhesion to the plates, 25 mM lactose, 25 mM sucrose and M338 (1:1000 monoclonal antibody M338 without azide) were added in culture. The plates were subjected to the conditioning described in item 2.2. Finally, the cells were processed as described in item 2.8.

Analysis Death and the cell cycle. Approximately, 5×10^5 cells were placed on six wells plates in triplicate, subject to the conditions of the study in periods of 24h and 48h. After treatment with trypsin, the cells were washed with PBS and fixed in ethanol 70%. After fixing, the cells were incubated with 20 µg/mL of Iodide of

Propídeo (PI), 200 µg/mL of RNase for 30 minutes protected from light. The samples were allowed in flow cytometer (BD Accuri™ C6) and analysed by the incorporation of propidium iodide to the DNA in the software BD CSampler™.

Statistical analysis. All the data Were processed and the statistical analysis was Performed by Two-Way ANOVA in GraphPad Prism software 6. P values: * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. # P values for comparisons between H1 and N1 conditions

RESULTS

Hypoxia combined with deprivation of nutrients promotes an increase in Gal-3 transcripts in MCF-7 cells

To assess the rate of Gal-3 expression in breast tumor microenvironment, qRT-PCR reactions were performed. The values obtained were compared with the condition control study, 24N10. Within 24 hours hypoxia combined with increased nutrient deprivation determined three (3) times the transcriptional rate of Galectin-3 (Figure 1).

In 48 hours, the level of Gal-3 transcripts remained at baseline threshold.

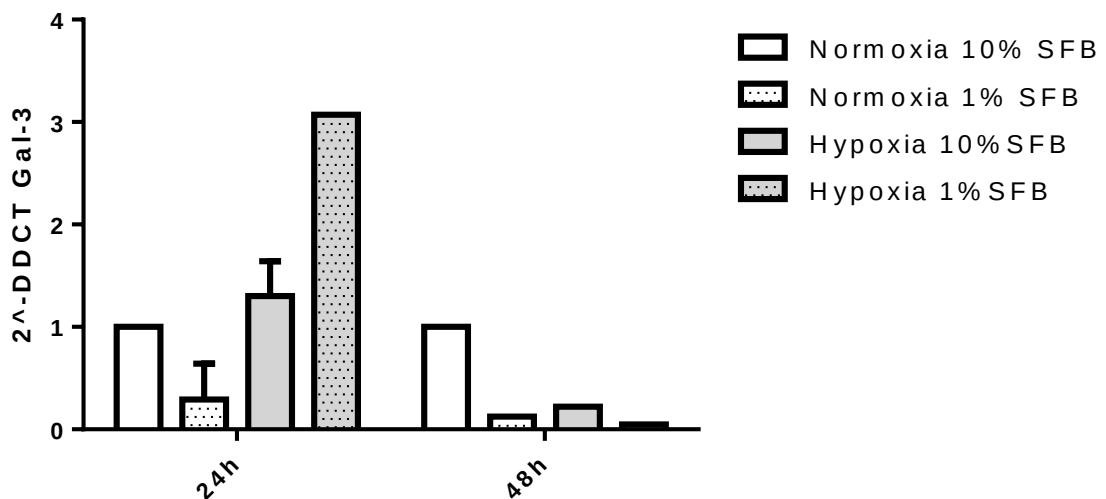


Figure 1. Analysis of Gal-3 gene expression in MCF-7 line. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Hypoxia with nutrient deprivation increases Gal-3 expression in breast cancer cells

N10 was used as control. To assess the relative quantity, β -actin was normalizer control (Figure 2A).

At time 24 hours there were no modulation of the amount of protein (Figure 2B).

However, in time of 48 hours, the relative amount of Gal-3 increases excessively in conditions where there nutrient deprivation. When isolated, nutritional deprivation determined an increase of 2.3 times relative to N10 condition (Figure 2B). When there was combination of nutrient deprivation to hypoxia, MCF-7 cells expressed Gal-3 four times more when compared with normoxia with nutrients condition.

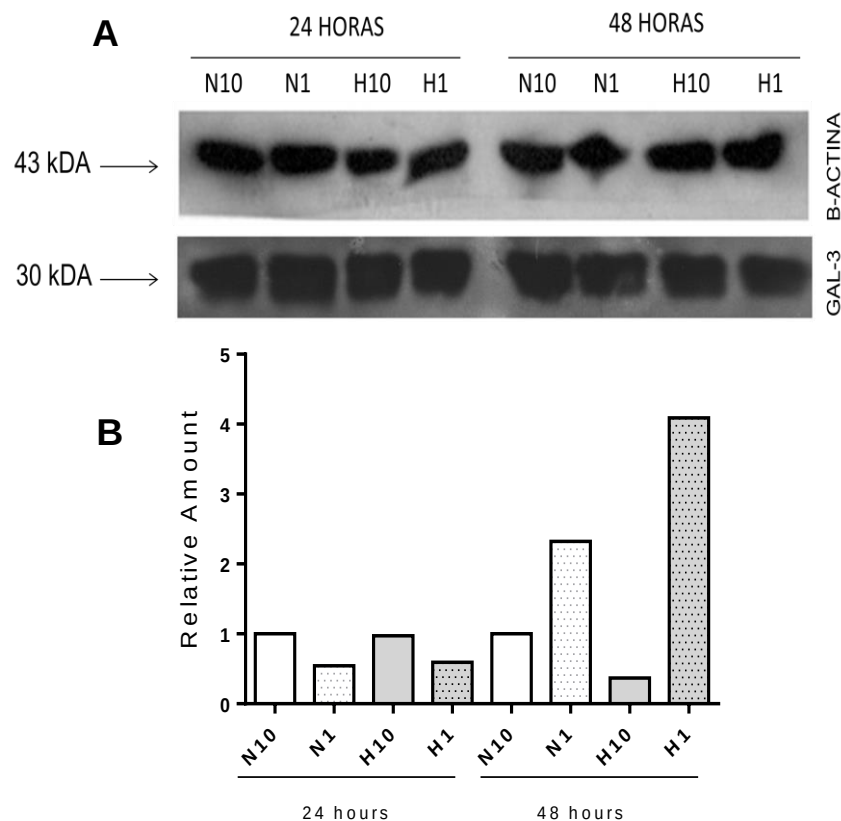


Figure 2. Analysis of Gal-3 protein expression in MCF-7 line. (A) In 24 hours, there was no modulation in the expression of Gal-3. However, in the period of 48 hours deprivation of nutrients has determined an increase in the expression 2 times, while hypoxia with deprivation of nutrients promoted increase of 4 times compared to the control (B) The relative amount of Galectin-3 was calculated from the ratio of each condition for normalizing gene, β -actin. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Hypoxia and nutrient deprivation determine the intranuclear localization of Gal-3

Immunofluorescence assays were performed for the intracellular localization of Gal-3. The pictures show large Gal-3 the distribution within the cell in the cytoplasm and in the nucleus, particularly where there was deprivation of oxygen and nutrients (Figure 3B) in a 24 hours period. Nutritional deprivation determined Gal-3 accumulation in the nucleus, as can be seen in Figure 3E. Isolated hypoxia showed similar distribution with the control (24N10) seen in Figure 3H. However, the combined condition of hypoxia and nutrient deprivation determined higher concentration of Gal-3 intranuclear (Figure 3K).

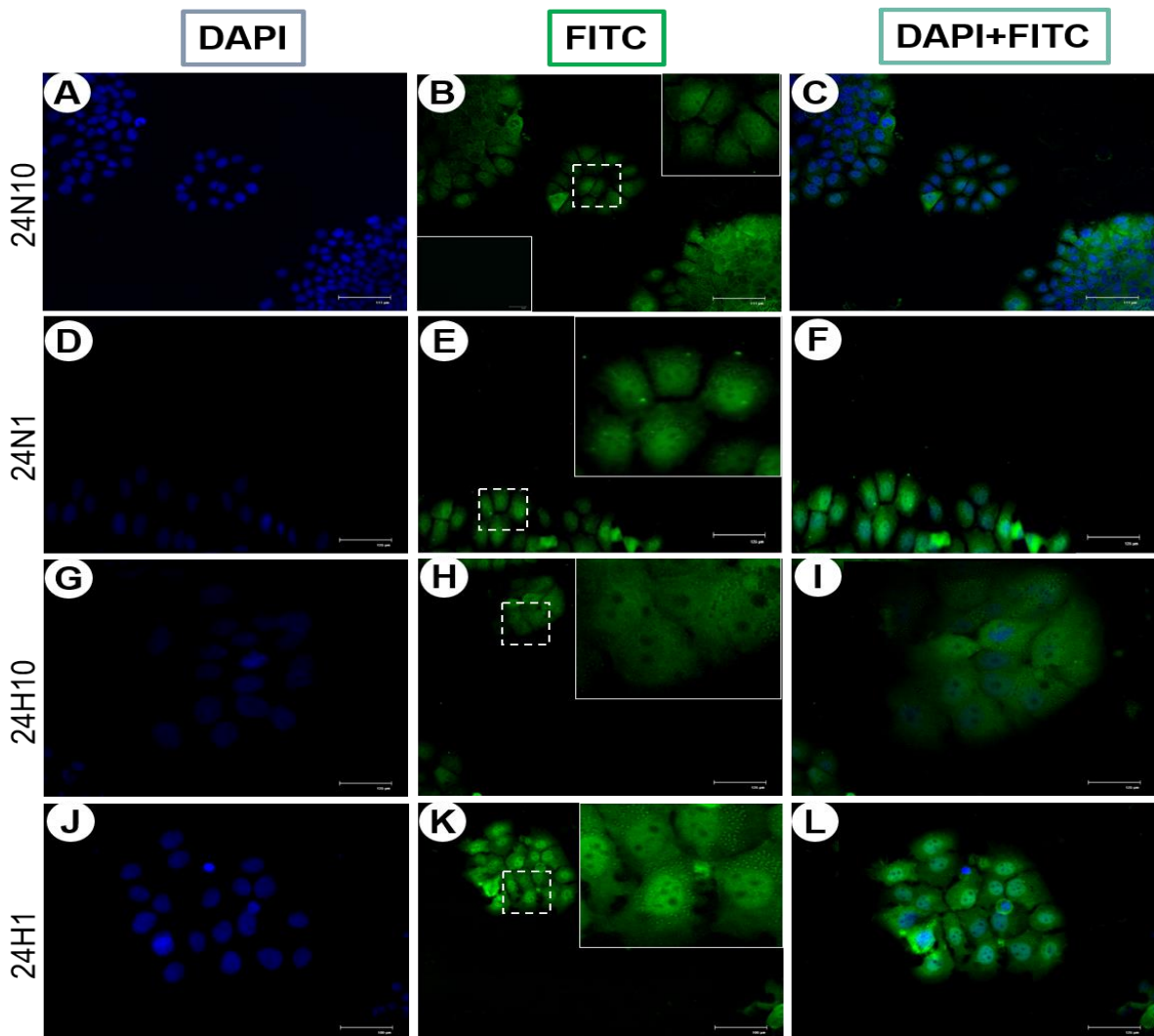


Figure 3. Immunofluorescence Assay in MCF-7 cells submits to 24 hours period. MCF-7 cells were labeled with FITC (B, E, H and K) in time of 24 hours. DAPI nuclear staining was used as control (A, D, G and J). C, F, I and L are superimposed images of DAPI and FITC (Merge). N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

In the 48 hours samples, the control condition (Figure 4B) showed cytoplasmic and nuclear staining for Gal-3, but with a higher relative amount in the cell nucleus compared with the control (24N10) (Figure 3B). The nutrient deprivation determined increase in Gal-3 nuclear as noted in 24 hours (Figure 4E). The cells subjected to hypoxia to increase the staining intranuclear Gal-3. However, the combined hypoxic condition in nutrient deprivation states Gal-3 concentration in the cell nucleus.

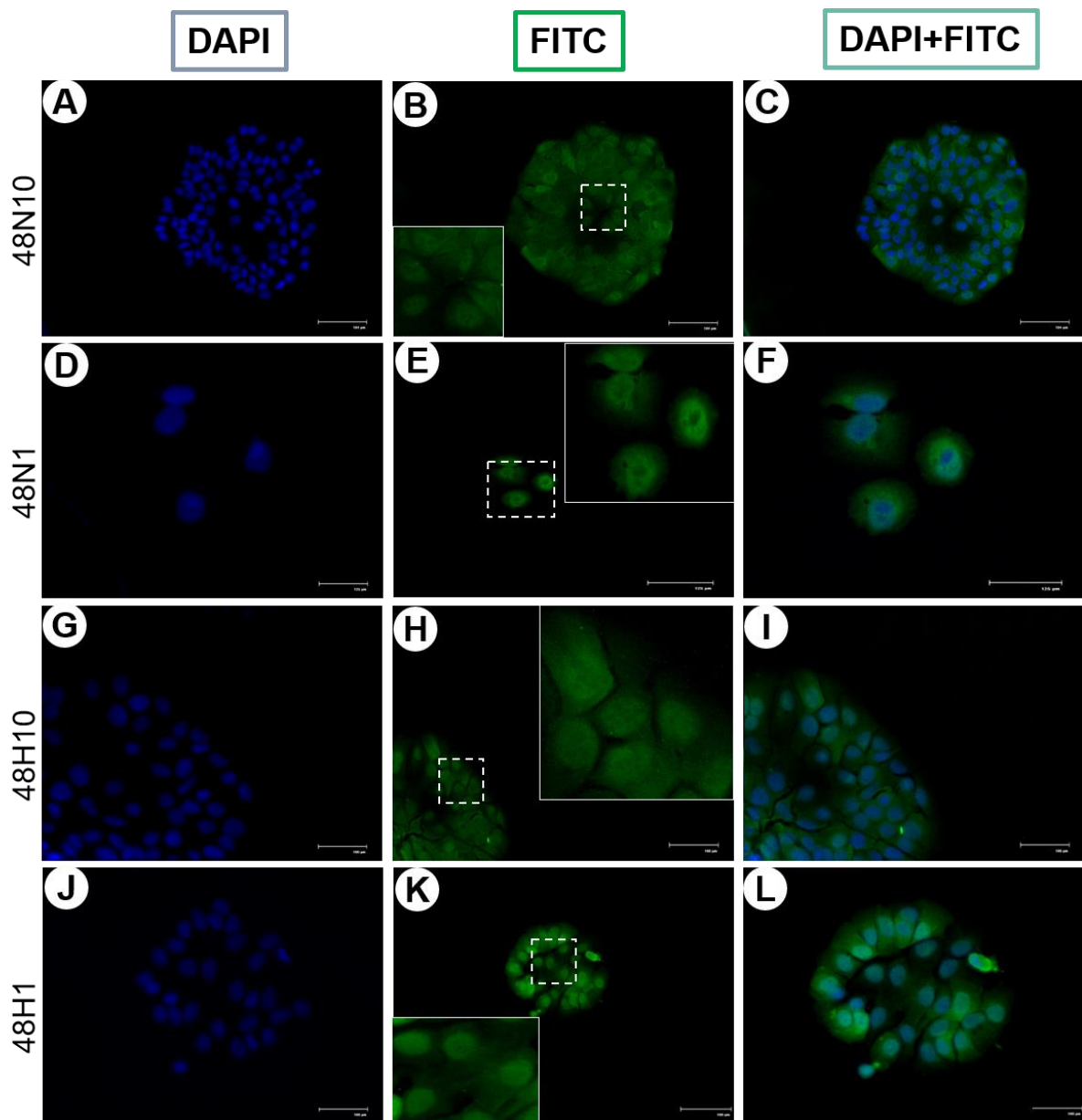


Figure 4. Immunofluorescence Assay in MCF-7 cells in a 48 hours period. MCF-7 cells were labeled with FITC (B, E, H and K) in time of 48 hours. DAPI nuclear staining was used as control (A, D, G and J). C, F, I and L are superimposed images of DAPI and FITC (Merge). N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Gal-3 role of evaluation in survival of MCF7 cells

With the addition of sugars to the conditions proposed in this study, it was possible to evaluate the percentage of death (Figure 5) as well as the cell cycle (Figure 6) in populations of MCF-7 cells by flow cytometry. Lactose (LAC) and Saccharose (SAC) were added carbohydrates in culture. Furthermore, a monoclonal antibody specific for Gal-3 (M338) was added into the cell culture.

In 24 hours, the addition of monoclonal antibody M338 determines significant ($p < 0.01$) in the population of dead cells in hypoxic condition combined with nutrient deprivation (Figure 5a). At time 48 hours, adding M338 promoted more significant percentage of cell death ($p < 0.001$) (Figure 6b).

The data obtained were compared between the conditions and the control 24N10.

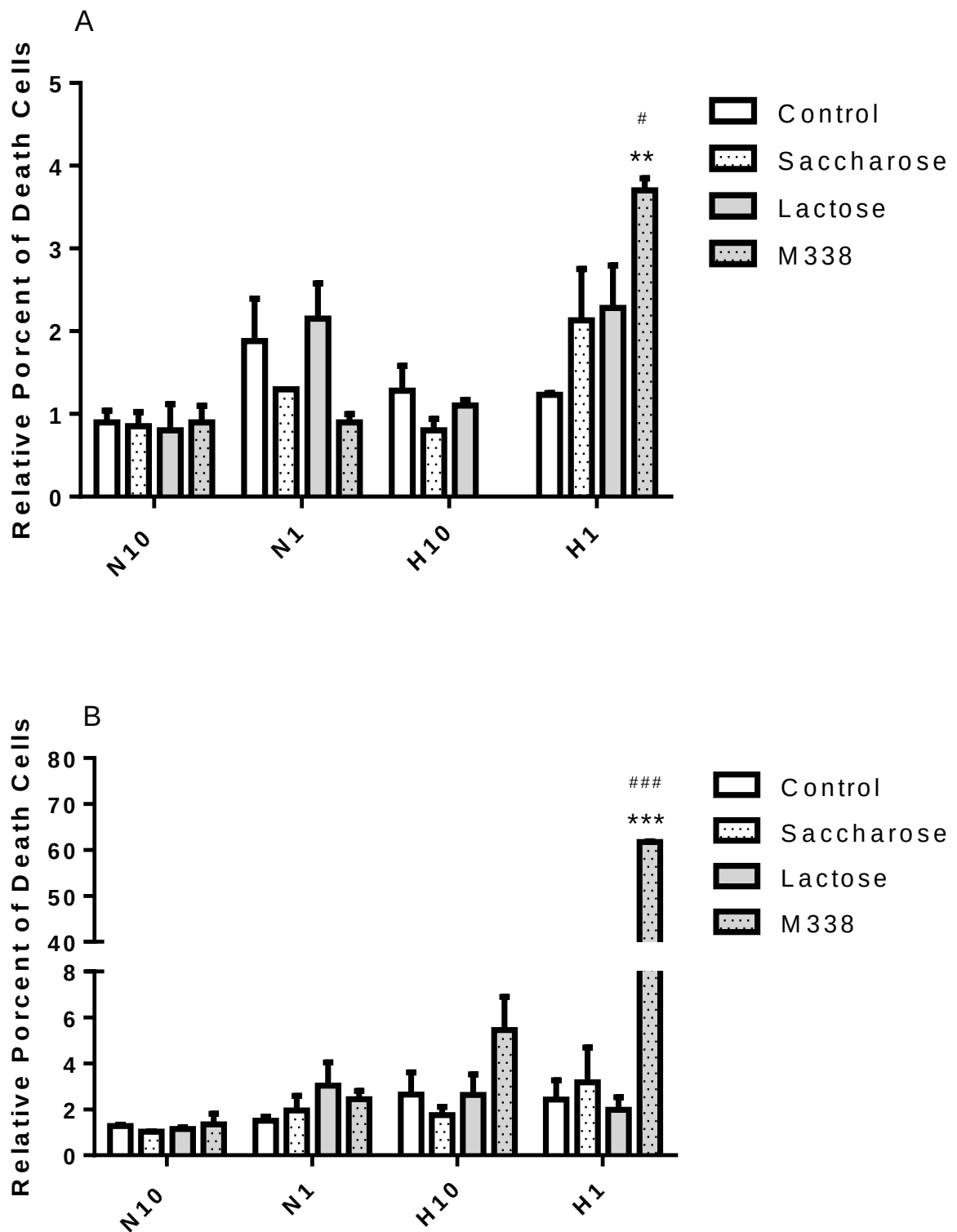


Figure 5. Analysis of cellular death in MCF-7 cells after the addition of lactose, sucrose and M338. MCF-7 cells incubated analysis with propidium iodide (PI) in time of 24 hours (A) and 48 hours (B) by flow cytometry. All comparisons were made between the conditions with control 24N10. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. # comparison between N1 and H1 in 24 and 48 hours. # $p < 0,05$ ### $p < 0,001$. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Gal-3 role of evaluation in cell cycle of MCF7 cells

Within 24 hours, the addition of monoclonal anti Gal-3 (M338) induced an increase in the arrest of cells in G0-G1 in all conditions observed while LAC and SAC no differences compared to control (Figure 6a). In the S/G2/M phases of the cell cycle, the addition of too much M338 induced reduction of cell population in time of 24 hours in all conditions observed but there was no significance (Figure 6a).

At time 48 hours, the addition monoclonal antibody M338 determined increase in the recruitment of cells (arrested) in the G0-G1 phase. Hypoxia with nutrient deprivation determines a significant increase of cells in phases S / G2 / M cell cycle ($p < 0.001$) (Figure 6b)

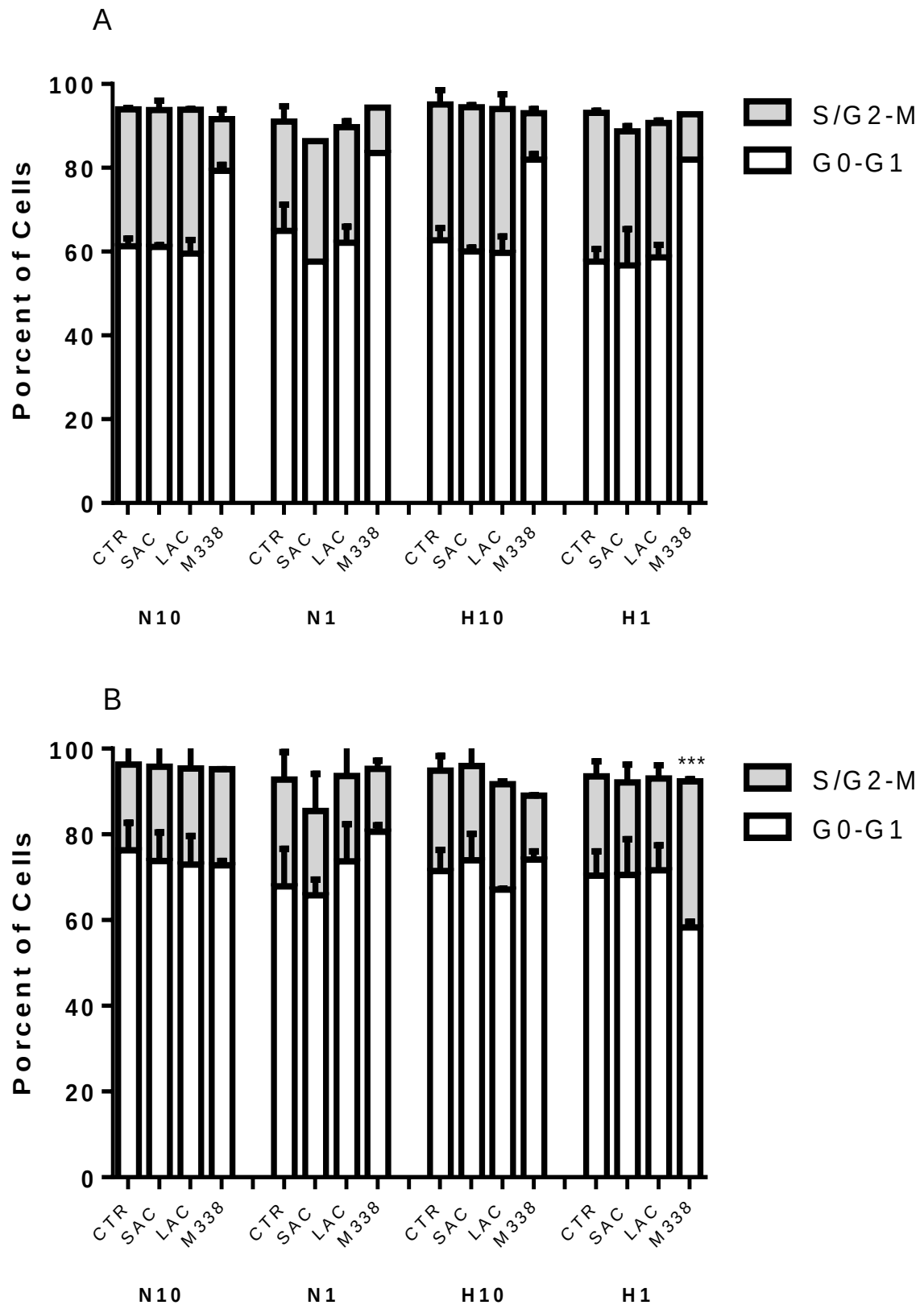


Figure 6. Cell cycle analysis in MCF-7 cells with the addition of lactose, sucrose and M338. MCF-7 cells incubated analysis with propidium iodide (PI) in time of 24 hours and 48 hours by flow cytometry. (A) Analysis of cells at the 24 hours; (B) Analysis of cells at the 48 hours. All comparisons were made between the conditions with control 24N10.*** p <0,001. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Nutrient deprivation determines increase of death in breast cancer cells.

In MCF-7 cells, cell death analysis by flow cytometry study allows to evaluate the control condition (N10) caused a rate of $8.6 \pm 1.6\%$ of dead cells in 24 hours (24N10), while $4.2 \pm 3\%$ cells died within 48 hours (48N10) (Figure 7). Comparing the percentage rates of cell death between the conditions in the period of 24 hours, we observed that the nutritional deprivation (24N1) isolated accounts for $19\% \pm 15$ dead cells, while 24H10 has $12.6\% \pm 4$, followed by 9.4% in combined condition of hypoxia and nutrient deprivation (24H1).

Within 48 hours, it was observed that the nutritional deprivation promoted the highest percentage of death when compared to oxygen deprivation (Figure 7). You can see that the lack of nutrients associated with increased exposure time of cells to the hostile environment, increases the percentage of death, which can be featured in in 48H1. This condition promoted the highest percentage of death cells with 25% .

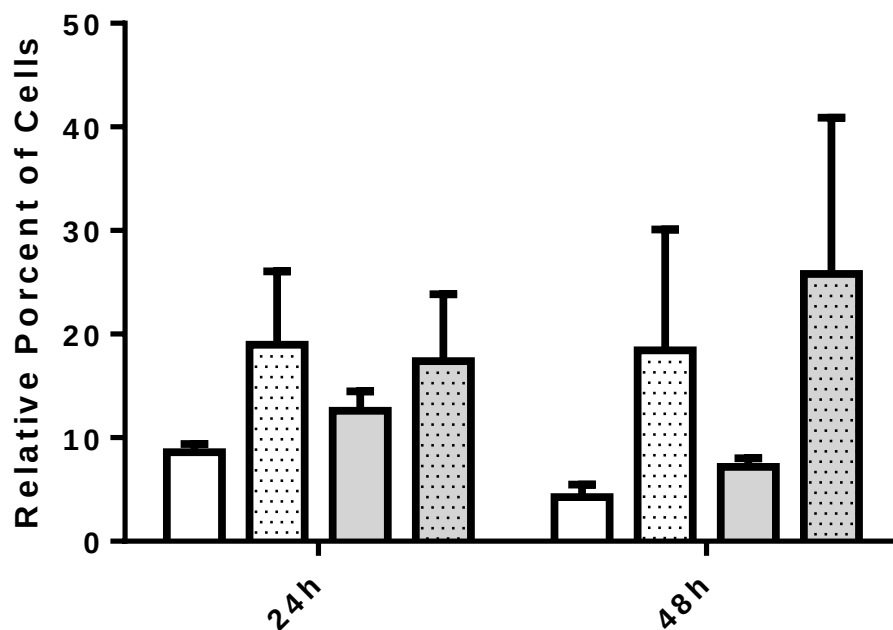


Figure 7. Analysis of death by incorporation of propidium iodide in MCF-7 cells in periods of 24 hours and 48 hours. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

Nutrient deprivation determines a reduction of MCF-7 cells in G0-G1 phases

The characterization of events in the cell cycle and its kinetics were assessed by flow cytometry. The data for each condition were compared with the control (24N10). At time 24 hours, N1 promoted a reduction of cells in S/G2/M phases of the cell cycle ($p < 0,05$). The cells subjected to hypoxia determined significant reduction in the population of cells in S / G2 / M ($p < 0,05$).

In 48 hours, the population submitted to hypoxia achieved percentage increase in G0-G1 and in S-G2-M both compared to the control (48N10) (Figure 8B) but no significance. The nutrient deprivation determined reduction in the population of cells in G0-G1 at normal oxygen concentration and hypoxic conditions but no significance.

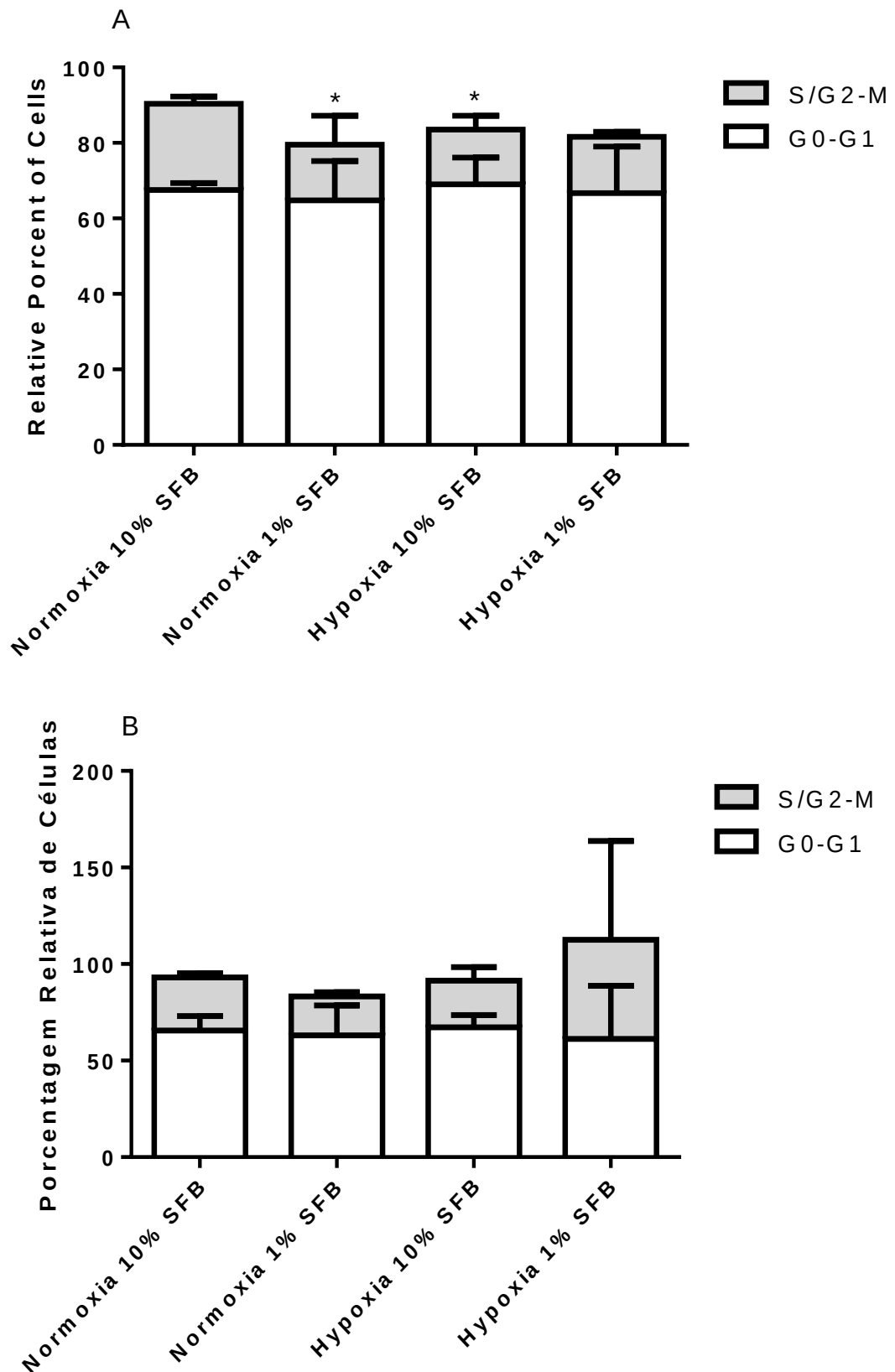


Figure 8. Cell cycle analysis on MCF-7 cells in periods of 24 hours and 48 hours. MCF-7 cells incubated analysis with propidium iodide (PI) in time of 24 hours (**A**) and 48 hours (**B**) by flow cytometry. All comparisons were made between the conditions with control 24N10. * $p < 0,05$. N10 (normoxia with 10% Fetal Bovine Serum); N1 (normoxia with 1% Fetal Bovine Serum); H10 (Hypoxia with 10% Fetal Bovine Serum); H1 (Hypoxia with 1% Fetal Bovine Serum).

DISCUSSION

In this study, we investigated the profile of galectina-3 in the survival of cells of breast cancer lines MCF-7 (receptor estrogen positive) and MDA-MB-231 (triple negative), and the involvement of this glycoprotein in the survival cell.

The microenvironment of solid tumors presents distant regions of vessels and blood capillaries, hindering the perfusion of oxygen in tissue, as well as the appropriate distribution of nutrients and the efficient removal of metabolites (CARDOSO, A. C. F. et al., 2016; CARNERO; LLEONART, 2016; ZENG et al., 2007). Tumor cells ensure the perpetuation of his lineage through a metabolic adaptation mediated by the expression of several genes, which allows the immortality of mobile phone (CARNERO; LLEONART, 2016).

Gal-3 is a glycoprotein widely distributed and expressed by many types of lineages of tumor: breast (RÊGO et al., 2013), esophagus (LIANG, N. et al., 2015), kidneys (XU, Y. et al., 2016), stomach (SUBHASH; HO, 2016), thyroid (HARAZONO et al., 2015), among others (SONG, L.; TANG, J. Wu, et al., 2014). Galectin-3 is present in the cytoplasm, nucleus and plasma membrane, and may migrate to the mitochondria or be secreted to the extracellular medium (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014). Their functions are dependent on subcellular location and of the pathology in Which it is inserted, being requested for Promoting or suppressing tumor growth, apoptosis or escape from apoptosis, for example (SONG *et al.*, 2014b; ZHANG, HAO *et al.*, 2014).

The analysis of gene expression in cells MCF-7 demonstrated the expression of transcripts of Galectina-3. Hypoxia with deprivation of nutrients promoted higher expression of transcripts of Gal-3 with an increase of 3 (three) times in relation to the control 24N10. The data obtained indicate that the gene expression of Gal-3 is an immediate recourse to adaptation of cells in conditions of hypoxia and deprivation of nutrients. Other researchers have observed overexpression of transcripts of Gal-3 in their models (HANN *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2016).

In the same experimental model, using cells NG97ht (glioblastoma), it was observed that the transcripts of Gal-3 increased in the deprivation of nutrients, reaching the highest values in 24 hours with a reduction at 48 hours (IKEMORI et al.,

2014). In accordance with previous results obtained by our research group, in cells Mia PaCa-2 (pancreatic cancer), it was observed that deprivation of nutrition has determined the increase of transcripts of Gal-3 in 48 hours; unlike, in PANC-1 (pancreatic cancer), hypoxia isolated promoted increase in the requisition of Gal-3 with increase in the relative amount of transcripts of this glycoprotein.

Galectin-3 is a glycoprotein required for cellular stress situations (hypoxia and nutrient deprivation) being activated via HIF-1 and NF-kB (Cardoso, A. C. F. et al, 2016;.. IKEMORI et al, 2014).

To assess modulation Gal-3 expression, we performed Western blotting assays. Our results confirm the overexpression of Gal-3, indicating that hypoxia with deprivation of nutrients promotes modulating the levels of transcripts and Gal-3 protein in the 24 hours. Together, these results indicate that tumor microenvironment hypoxic and / or deprived of nutrients modulates the expression of Gal-3 in breast cancer cells.

Because of the duality of functional Gal-3, we performed immunofluorescent assays to detect and determine the subcellular localization of this glycoprotein in breast tumor microenvironment.

In MCF-7 cells, our results indicate the widespread diffusion of Gal-3 in the intracellular compartment, being found in BOTH the nucleus and the cytoplasm. However, we note that removing the nutritional supplementation (Fetal Bovine Serum), Gal-3 was more staining with fluorescent intensity in the nucleus, BOTH in the presence of oxygen (N1) and in hypoxia (H1). In relation to time, we observe that the 24-hour period provides a fluorescent intensity higher than the period of 48 hours, but with the deprivation of nutrition leading to greater concentration of nuclear Gal-3. The data suggest that Gal-3 subcellular localization is modulated in the microenvironment of breast cancer. Nutrient deprivation was limiting for Gal-3 nuclear concentration in MCF-7 cells.

Gal-3 nuclear expression in prostate cancer was associated with a decrease in cell proliferation and overexpression cytoplasmic anti apoptotic effects, increased cell growth and proliferation, invasion and angiogenesis (Califice et al., 2004; FUNASAKA; RAZ; NANGIA- MAKKER, 2014).

Several authors have employed efforts in the inhibition of Gal-3 assessing effects such as inhibition of anchorage independent growth, invasion and tumor progression (IKEMORI et al, 2014; LU et al, 2016; Xu, Y. et al, 2016). To evaluate the influence of this biomolecule in several diseases, including cancer. In order to evaluate the Gal-3 participation in survival of breast cancer cells, we inhibited extracellular Galectin-3 with the addition of lactose, sucrose and a monoclonal antibody.

Gal-3 is a lectin with the ability to Recognize residues of β -galactosides and has N-terminus rich in glycine, proline and lysine and a C-terminal that represents the domain of recognition for carbohydrates (CRD) (CARDOSO *et al.*, 2016; SANT'ANA *et al.*, 2011). Lactose and sucrose are recognized by the C-terminal Gal-3 (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014), due to the presence of the CRD whereas antibodies bind to the N-terminus of the molecule.

Our findings indicate that the addition of monoclonal antibody M338 (hybridoma) in MCF-7 cells increased the percentage of cell death, hypoxia and nutrient deprivation to the condition responsible for the significant increase in 24 hours. At 48 hours, H1 determined a percentage of 61% dead cells. After the inhibition of Gal-3 extracellular also we evaluated the cell cycle, where we observed that the addition of M338 promoted an increase in the percentage of cells in G0-G1 (arrested) in 24 hours. In 48 hours, the inhibition of Gal-3 determined a significant increase of cells in phases S / G2 / M. Our results suggest that Gal-3 participates in cell survival mechanisms, favoring the maintenance of tumor cells in hypoxic microenvironment private nutrients.

In tumor development, Gal-3 modulates diverse signaling pathways (Ras, Raf, MEK, ERK and Notch), regulating cell survival and proliferation and migration. In the extracellular environment, Gal-3 promotes tumor cell migration by communicating with integrins. Associated oligomerization capacity, Gal-3 binds to endothelial cells and prevents internalization VEGFR negatively regulates angiogenesis cascade activation (Cardoso et al., 2016).

Abreu, C.A., et al (2014) observed that inhibition of Gal-3 promoted retinal ganglion cell neuroprotection (MARY; MARTINEZ, [S.D.]). Moreover, Gal-3 inhibition induced cell death in cells NG97ht and reduce tumor growth (IKEMORI et al., 2014).

Gal-3 inhibition of migration promoted reduction potential SKOV3 cells (ovarian carcinoma) cells with increased susceptibility to apoptosis (LU et al., 2016). XU et al (2016) evaluated the antitumor effects of Gal-3 inhibition in renal cells and concluded that the Gal-3 inhibition promoted reduction in the proliferation of renal cells as well as a reduction in migration ability, besides inducing apoptosis (programmed cell death) arrested with the cell cycle in G1 phase (Xu, Y. et al., 2016). Gal-3 inhibition determined higher percentage of death in gastric cancer cells (Subhash; HO, 2016). In GH3 pituitary tumor cells, the inhibition of Gal-3 promoted increase in the percentage of apoptotic cells (Huang et al., 2014).

Moreover, HANN and colleagues, using an in vivo experimental model evaluated the Gal-3 effects on tumor growth and concluded that Galectin-3 is overexpressed in pancreatic cancer cell lines, and that inhibition of Gal-3 promotes moderate reduction in proliferation and migration, but failed to associate Gal-3 modulation of malignant transformation of epithelial cells of the pancreas (HANN et al., 2011).

Our results indicate that hypoxia combined with nutrient deprivation determined the highest percentage of cell death in MCF-7 cells (SONG, S. et al, 2012;. XU, J.; ANCIRO; PALLI, 2015). The H1 condition is the largest cellular stress, mimicking the tumor central regions with poor distribution of oxygen and nutrients due to accelerated growth and replication of tumor cells coupled with poor vascularization in this environment (CARDOSO, A. C. F. et al., 2016). However, when evaluating hypoxia and nutrition deprivation in isolation, we found that nutrient deprivation has higher impact on the population of dead cells, ie, the death rate in N1 condition was greater than H10 in periods of 24 and 48 hours. However, when evaluating hypoxia and nutrition deprivation in isolation, we found that nutrient deprivation have greater impact on the population of dead cells suggesting that the rate of death in N1 condition was greater than H10 in periods of 24 and 48 hours.

Using hybrid cells (human / murine) NG97ht, IKEMORI and collaborators (2014), assessed cell death by incorporation of propidium iodide by flow cytometry. The authors concluded that the condition of hypoxia combined with deprivation of nutrients favors the increase in the percentage of dead cells with discrepancies between the conditions of isolation (IKEMORI et al., 2014).

According to the previous results obtained by our research group to characterize the microenvironment of pancreatic cancer, Silva-Filho et al, 2015 used Mia PaCa-2 and PANC-1 strains and evaluated the percentage of dead cells, concluding that combined with hypoxia condition nutrient deprivation determines the greatest rate of cell death. Assessing the cell cycle in MCF-7 cells, we found that nutrient deprivation reduced the population of cells in G0-G1 phase in both the 24-hour period and 48 hours. These findings suggest that Gal-3 participates in cell cycle modulation.

Galectin-3 is dysregulated in the microenvironment of many types of cancer. Although Gal-3 expression is also associated with participation in physiological events, hypoxia and nutrient deprivation may represent favorable conditions for increased migration, invasion and survival of cancer cells mediated by Gal-3. Our results indicate that Gal-3 can be used as a target for therapeutic strategies to fight cancer, both target molecule as sensitizer molecule.

CONCLUSIONS

In our study, we found that hypoxia with nutrient deprivation induced death of MCF-7 cells and dysregulation of the cell cycle. Moreover, the absence of oxygen and nutrients in breast cancer microenvironment determined increase in gene and protein expression of Gal-3, indicating that this glycoprotein is inserted into the metabolic adaptation of tumor cells.

We note that Gal-3 is widespread intracellularly with normal distribution of oxygen and nutrients, which was found in the cytoplasm and in the nucleus. However, hypoxia and nutrient deprivation determined increase in Gal-3 nuclear concentration, suggesting the participation of this molecule in survival to hypoxic tumor microenvironment and private nutrients.

Gal-3 extracellular inhibition promoted population increase of dead cells and disrupting the cell cycle in hypoxia with nutrient deprivation, supporting the hypothesis of Gal-3 participation in the MCF-7 breast cancer cell survival.

ACKNOWLEDGMENT

The financial support of CAPES.

REFERENCES

- ARTHMAR, Cristina *et al.* Mortalidade por câncer de mama em hospital de referência em oncologia , Vitória , ES Breast cancer mortality among. v. 16, n. 3, p. 582–591 , 2013.
- BABU, R. L. *et al.* Effect of estrogen and tamoxifen on the expression pattern of AP-1 factors in MCF-7 cells: Role of c-Jun, c-Fos, and Fra-1 in cell cycle regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 380, n. 1-2, p. 143–151 , 2013.
- BARTON MD, Mary Kay. Bevacizumab in neoadjuvant chemotherapy increases the pathological complete response rate in patients with triple-negative breast cancer. **CA: a cancer journal for clinicians** v. 00, n. 00, p. 4–5 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639119>>.
- BERARDI, Damián E. *et al.* Myoepithelial and luminal breast cancer cells exhibit different responses to all-trans retinoic acid. **Cellular Oncology** , 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13402-015-0230-z>>.
- CALIFICE, Stéphane *et al.* Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene** v. 23, n. 45, p. 7527–7536 , 2004.
- CARDOSO, Ana Carolina Ferreira *et al.* Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology** v. 6, n. May, p. 1–12 , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00127>>.
- CARNERO, Amancio; LLEONART, Matilde. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. **Inside the Cell** v. 1, n. 2, p. 96–105 , 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/icl3.1039>>.
- CARVALHO, Renato S *et al.* Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response. v. 15, n. 7, p. 840–850 , 2014.
- CAVALLO, Federica *et al.* 2011: The immune hallmarks of cancer. 2011, [S.l: s.n.], 2011. p.319–326. 0092-8674 (Print). .
- CAY, Tugce. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the

literature. **Turkish Journal of Pathology** v. 28, n. 1, p. 1 , 2012.10185615.

CHOUDHRY, Hani; HARRIS, Adrian L.; MCINTYRE, Alan. The tumour hypoxia induced non-coding transcriptome. **Molecular Aspects of Medicine** v. 47-48, p. 35–53 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.01.003>>.

CIRQUEIRA, Magno Belém *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina** v. 39, p. 499–503 , 2011.

CRUCHO, Carina I.C. *et al.* Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate Research** v. 402, p. 124–132 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862151400367X>>.

CYTOBIOLOGICA, E T *et al.* The glycomic profile of invasive ductal carcinoma of the breast is altered in patients with hypoxic regions : implications for tumor behavior. v. 52, n. 2, p. 96–103 , 2014.

DALZIEL, Martin *et al.* Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. **Science (New York, N.Y.)** v. 343, n. 6166, p. 1235681 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385630>>.1095-9203 (Electronic)r0036-8075 (Linking).

DE OLIVEIRA, Joana T. *et al.* Hypoxia up-regulates galectin-3 in mammary tumor progression and metastasis. **PLoS ONE** v. 10, n. 7 , 2015.

FORTUNA-COSTA, Anneliese *et al.* Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. **Frontiers in Oncology** v. 4, n. June, p. 1–9 , 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fonc.2014.00138/full>>.

FRAGA, Avelino *et al.* Hypoxia and Prostate Cancer Aggressiveness: A Tale With Many Endings. **Clinical Genitourinary Cancer** v. 2, p. 1–7 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558767315000713>>.

FUNASAKA, Tatsuyoshi; RAZ, Avraham; NANGIA-MAKKER, Pratima. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in Cancer Biology** v. 27, p. 30–38 , 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.03.004>>.1044-579x.

FURNARI, Frank B. *et al.* Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. **Nature Reviews Cancer** v. 15, n. 5, p. 302–310

, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3918>>.

GAILLARD, Hélène; GARCÍA-MUSE, Tatiana; AGUILERA, Andrés. Replication stress and cancer. **Nature Reviews Cancer** v. 15, n. 5, p. 276–289 , 2015.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3916>>.

GATENBY, Robert A.; GILLIES, Robert J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer** v. 8, n. 1, p. 56–61 , 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2255>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059462>>.1474-1768 (Electronic)r1474-175X (Linking).

GRANADOS-PRINCIPAL, Sergio *et al.* Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research** v. 17, n. 1, p. 1–16 , 2015. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/17/1/25>>.

GUSTERSON, Barry a.; STEIN, Torsten. Human breast development. **Seminars in Cell and Developmental Biology** v. 23, n. 5, p. 567–573 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.013>>.1083-3021 (Print)r1083-3021 (Linking).

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert a. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell** v. 144, n. 5, p. 646–674 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.0026201009680.

HANN, Alexander *et al.* Comprehensive analysis of cellular galectin-3 reveals no consistent oncogenic function in pancreatic cancer cells. **PLoS ONE** v. 6, n. 6 , 2011.1932-6203 (Electronic)r1932-6203 (Linking).

HARAZONO, Yosuke *et al.* Extracellular galectin-3 programs multidrug resistance through Na⁺ / K⁺ -ATPase and P-glycoprotein signaling. v. 6, n. 23 , 2015.

HIRANO, Kiyoko *et al.* Enhanced expression of the β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase 4 gene impairs tumor growth of human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** p. 1–6 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15006415>>.

HOEBEN, Ann *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.

Pharmacological reviews v. 56, n. 4, p. 549–580 , 2004.0031-6997.

HUANG, C. X. *et al.* Reduction of galectin-3 expression reduces pituitary tumor cell progression. **Genetics and Molecular Research** v. 13, n. 3, p. 6892–6898 , 2014.1676-5680 (Electronic)r1676-5680 (Linking).

IKEMORI, Rafael Yamashita *et al.* Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival. **PLoS ONE** v. 9, n. 11, p. e111592 , 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111592>>.

KUO, P.; LE, Q.-T. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. **Glycobiology** v. 24, n. 10, p. 921–925 , 2014. Disponível em: <<http://www.glycob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/cwu062>>.

LAUBLI, H. *et al.* Lectin Galactoside-binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-associated Immunomodulatory Ligand for CD33-related Siglecs. **Journal of Biological Chemistry** v. 289, n. 48, p. 33481–33491 , 2014. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.593129>>.

LIANG, Ning *et al.* Effect of galectin-3 on the behavior of Eca109 human esophageal cancer cells. **Molecular Medicine Reports** v. 11, n. 2, p. 896–902 , 2015.

LU, Huaiwu *et al.* Galectin-3 regulates metastatic capabilities and chemotherapy sensitivity in epithelial ovarian carcinoma via NF- κ B pathway. **Tumor Biology** , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-016-5004-3>>.1327701650.

MARIA, Ana; MARTINEZ, Blanco. IS TO (n GY on A -e ND di te H d IS m TO an P us A cr TH ip O t) L IS TO (n GY on A -e ND di te H d IS m TO an P us A cr TH ip O t) L. , [S.d.].

MÁRQUEZ-ACOSTA, Gonzalo. Cáncer de mama. , 2012.

MCCRACKEN, Alison N.; EDINGER, Aimee L. *Nutrient transporters: The Achilles' heel of anabolism* .**Trends in Endocrinology and Metabolism**. [S.l: s.n.]. , 2013

MEDICAL, Continuing *et al.* Take free quizzes online at [acsjournals . com](http://acsjournals.com) / ce Risk Factors , Pathophysiology , and Treatment of Hot Flashes in Cancer. v. 63, n. 3 , 2013.

MORE, Shyam K. *et al.* N-glycans and metastasis in galectin-3 transgenic mice.

Biochemical and Biophysical Research Communications v. 460, n. 2, p. 302–307 , 2015. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15004659>>.

NAGPAL, Neha *et al.* HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF β -signaling in hypoxic microenvironment.

Scientific Reports v. 5, p. 9650 , 2015. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/srep09650>>.

NAKAJIMA, Kosei *et al.* Galectin-3 cleavage alters bone remodeling: Different outcomes in breast and prostate cancer skeletal metastasis. **Cancer Research** v. 76, n. 6, p. 1391–1402 , 2016.

NUNNEY, L; MUIR, B. Peto ' s paradox and the hallmarks of cancer : constructing an evolutionary framework for understanding the incidence of cancer. p. 1–7 , 2015.

PALAZON, Asis *et al.* Review HIF Transcription Factors , Inflammation , and Immunity. **Immunity** v. 41, n. 4, p. 518–528 , 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>>.

PARKS, Scott K. *et al.* Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. **Molecular Aspects of Medicine** v. 47-48, p. 3–14 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2015.12.001>>.

PORUK, Katherine E. *et al.* Breast cancer recurrence after nipple-sparing mastectomy: one institution's experience. **American Journal of Surgery** v. 209, n. 1, p. 212–217 , 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2014.04.001>>.

RAOUF, Afshin *et al.* The biology of human breast epithelial progenitors. **Seminars in Cell & Developmental Biology** v. 23, n. 5, p. 606–612 , 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.04.009>>.

RÊGO, Moacyr Jesus Barreto De Melo *et al.* Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. **Medical Molecular Morphology** v. 46, n. 2, p. 92–96 , 2013.

ROFSTAD, E K *et al.* Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. **Cancer Research** v. 66, n. 13, p.

6699–6707 , 2006.0008-5472 (Print)r0008-5472.

RUST, Steven *et al.* Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a “triple negative” breast cancer cell type. **Molecular cancer** v. 12, n. 1, p. 11 , 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.1476-4598.

SAMANTA, Debangshu *et al.* Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 111, n. 50, p. E5429–E5438 , 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1421438111>>.

SANT’ANA, Juliana Moreira De Almeida *et al.* Expressão de galectina-3 e beta-catenina em lesões pré-malignas e carcinomatosas de língua de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 47, n. 1, p. 49–56 , 2011.

SEMENZA, Gregg L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research** , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915001925>>.

SIEGEL, Rebecca *et al.* Cancer Statistics , 2014. v. 64, n. 1, p. 9–29 , 2014.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. Cancer Statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** v. 65, n. 1, p. 5–29 , 2015.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians** v. 66, n. 1, p. 7–30 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>>.0017-9124.

SONG, Lin *et al.* Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta** v. 431, p. 185–191 , 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.019>>.

SONG, Lin *et al.* *Galectin-3 in cancer* .**Clinica Chimica Acta**. [S.l: s.n.]. , 2014b

SUBHASH, Vinod Vijay; HO, Bow. Galectin 3 acts as an enhancer of survival responses in H. pylori-infected gastric cancer cells. **Cell Biology and Toxicology** p. 23–35 , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10565-016-9315->

3>.1056501693.

TAKAHASHI, Ryou-u; MIYAZAKI, Hiroaki; OCHIYA, Takahiro. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. **Cancers** v. 7, n. 2, p. 598–616 , 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6694/7/2/598/>>.8133542251.

VASCONCELOS, Marcelo Gadelha *et al.* Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** n. April, p. 1–8 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239115002621>>.

WESLEY, Umadevi V. *et al.* Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling. **Brain Research** v. 1496, p. 1–9 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.12.008>>.1872-6240 (Electronic)r0006-8993 (Linking).

WHO | Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

XIN, Ming; DONG, Xin-Wen; GUO, Xiu-Li. Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 69, p. 179–185 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332214001851>>.

XU, Y. *et al.* Antitumor effects of galectin-3 inhibition in human renal carcinoma cells. **Experimental Biology and Medicine** v. 0, p. 1–9 , 2016. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1535370216630839>>.1535-3699.

XU, Yangyang *et al.* Antitumor effects of galectin-3 inhibition in human renal carcinoma cells. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)** , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846978>>.

ZENG, Yan *et al.* HIF-1 α is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research** v. 22, n. 12, p. 1851–1861 , 2007.0884-0431 (Print)r0884-0431 (Linking).

ZHANG, Hao *et al.* Galectin-3 as a Marker and Potential Therapeutic Target in Breast

Cancer. **PLoS ONE** v. 9, n. 9, p. e103482 , 2014. Disponível em:
<<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103482>>.2013121342.

ZHANG, Jun; LI, Liyuan; LU, Yi. Effects of Hypoxia, Surrounding Fibroblasts, and p16 Expression on Breast Cancer Cell Migration and Invasion. **Journal of Cancer** v. 6, n. 5, p. 430–437 , 2015. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v06p0430.htm>>.

ZHONG, Rui *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1 α in radiation-induced autophagic cell death in breast cancer cells. **Tumor Biology** , 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3425-z>>.

5.2 - RESULTADOS OBTIDOS COM A LINHAGEM MDA-MB-231

Para avaliar o perfil de galectina-3 em linhagem de câncer de mama, MDA-MB-231, foi realizada a caracterização do microambiente tumoral *in vivo*. Para tal, foram avaliados a expressão de transcritos de Gal-3 e localização subcelular, bem como as análises de morte e ciclo celular por citometria de fluxo.

Privação de nutrientes aumenta a expressão gênica de Gal-3 em células MDA-MB-231

Para avaliar a taxa de expressão de Gal-3 no microambiente tumoral da mama, reações qRT-PCR foram realizadas. Os valores obtidos foram comparados com a condição controle do estudo, 24N10. No período de 24 horas, não houve variação na expressão de transcritos de Gal-3. Porém, no período de 48 horas, a privação de nutrientes determinou aumento em 1,5 vezes a taxa transcricional de Gal-3 (Figura 6), porém outros experimentos precisam ser realizados para confirmação dos resultados

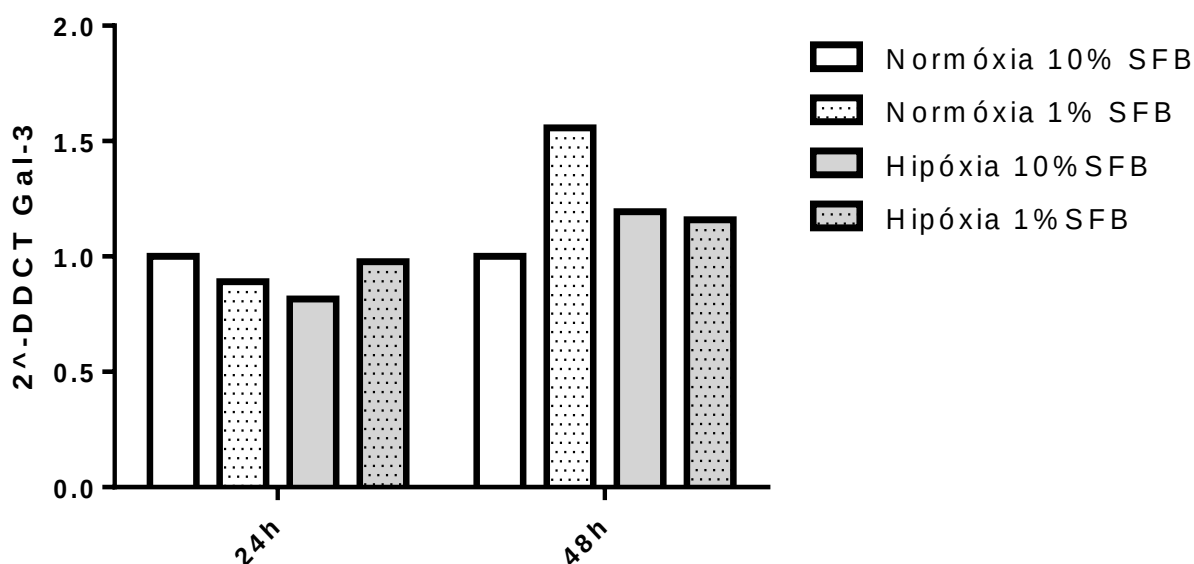


Figura 6. Análise de expressão gênica de Gal-3 em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas. N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); N1 (normóxia com 1% de Soro Fetal Bovino); H10 (hipóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); H1 (hipoxia com 1% de Soro Fetal de Bovino).

Hipóxia determina aumento intracelular de gal-3

Devido à dualidade funcional de Galectina-3, foram realizados os ensaios de localização subcelular por imunofluorescência.

No período de 24 horas, houve marcação nuclear e citoplasmática para Gal-3, porém sem discrepâncias entre os compartimentos (Figura 7). A condição de hipóxia isolada (24H10) promoveu aumento na fluorescência para Gal-3, porém o aumento foi visto tanto no núcleo quanto no citoplasma. Em hipóxia com privação de nutrientes, houve menor intensidade de fluorescência vistos simultaneamente no citoplasma e núcleo celular.

. Em 48 horas, houve maior intensidade de fluorescência nas condições normóxicas 48N10 e 48N1 (normóxia com privação de nutrientes). Quando as células foram submetidas à hipóxia, houve redução de fluorescência tanto no núcleo quanto no citoplasma nas condições 48H10 e 48H1 (Figura 8).

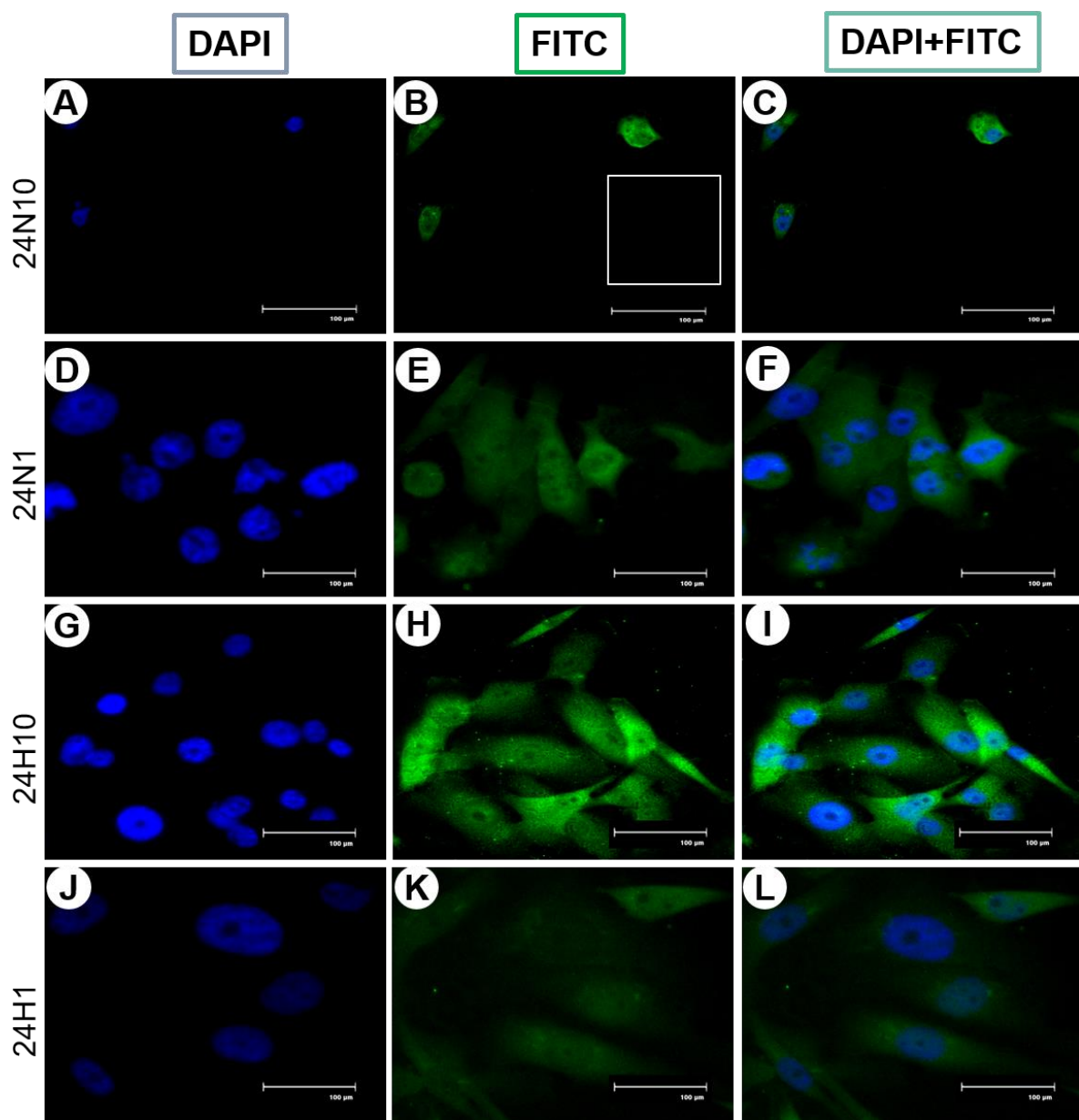


Figura 7. Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 em período de 24 horas. As células MDA-MB-231 foram marcadas com FITC (B, E, H e K). DAPI foi utilizado para marcação de DNA nuclear. (A, D, G e J). Sobreposição de marcação FITC e DAPI (C, F, I e L). N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); N1 (normóxia com 1% de Soro Fetal Bovino); H10 (hipóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); H1 (hipóxia com 1% de Soro Fetal de Bovino).

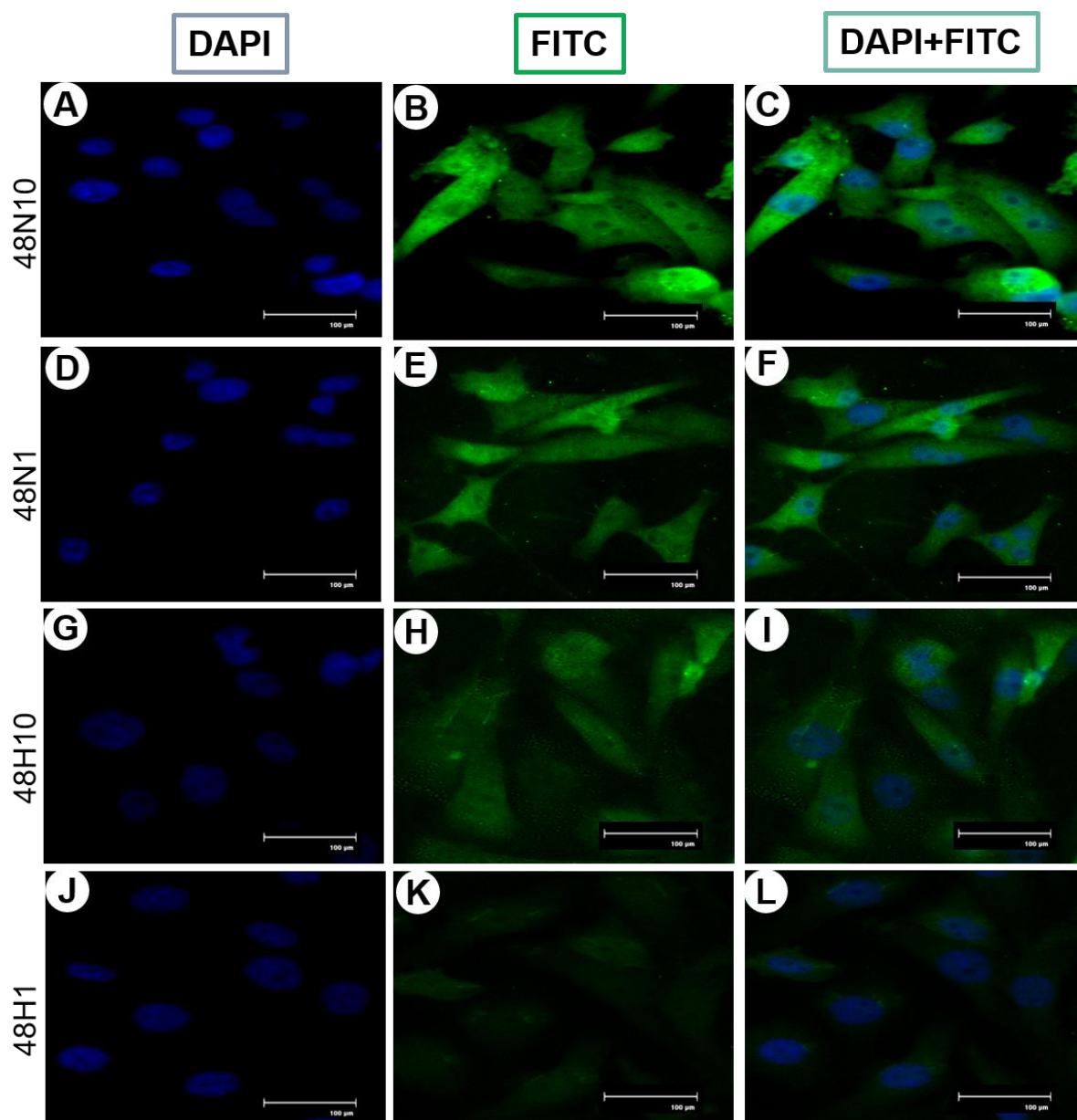


Figura 8. Ensaio de imunofluorescência em células MDA-MB-231 em período de 48 horas. As células MDA-MB-231 foram marcadas com FITC (B, E, H e K). DAPI foi utilizado para marcação de DNA nuclear. (A, D, G e J). Sobreposição de marcação FITC e DAPI (C, F, I e L). N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); N1 (normóxia com 1% de Soro Fetal Bovino); H10 (hipóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); H1 (hipóxia com 1% de Soro Fetal de Bovino).

Privação de nutrientes promoveu aumento no percentual de células mortas em linhagem MDA-MB-231

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar, quantitativamente, o percentual de células mortas, por incorporação de iodeto de propídeo. Todas as condições foram comparadas com o controle intraexperimental, 24N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino). Para tal, a estratégia de *gate* utilizada encontra-se na Figura 9.

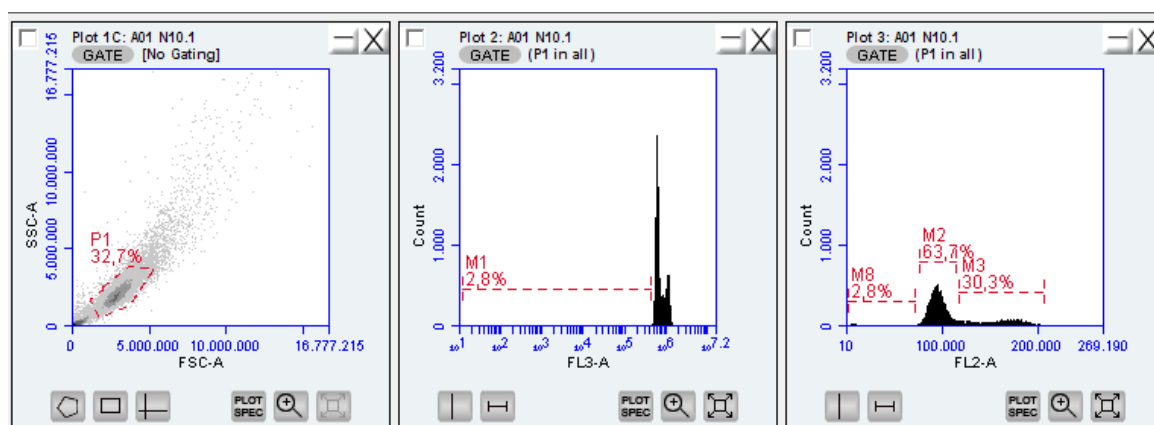


Figura 9. Estratégia utilizada para delimitar e analisar população de células (Gate). Fonte: banco de imagens do autor.

Em 24 horas (Figura 10), a privação de nutrientes determinou o maior percentual relativo de células mortas ($p < 0,001$), seguida da condição combinada de hipóxia com privação nutricional ($p < 0,01$).

No período de 48 horas, a privação de nutrientes promoveu aumento significativo ($p < 0,001$) de células mortas quando comparadas ao controle. Em comparação entre as condições, a hipóxia protegeu as células com redução significativa ($p < 0,01$) do percentual de morte em relação à privação de nutrientes, visto em H1 (Hipóxia 1% SFB). Estes resultados indicam que privação nutricional (N1) exerce maior influência sobre a morte de células MDA-MB-231 que a própria hipóxia com privação de nutrientes (H1) (Figura 10).

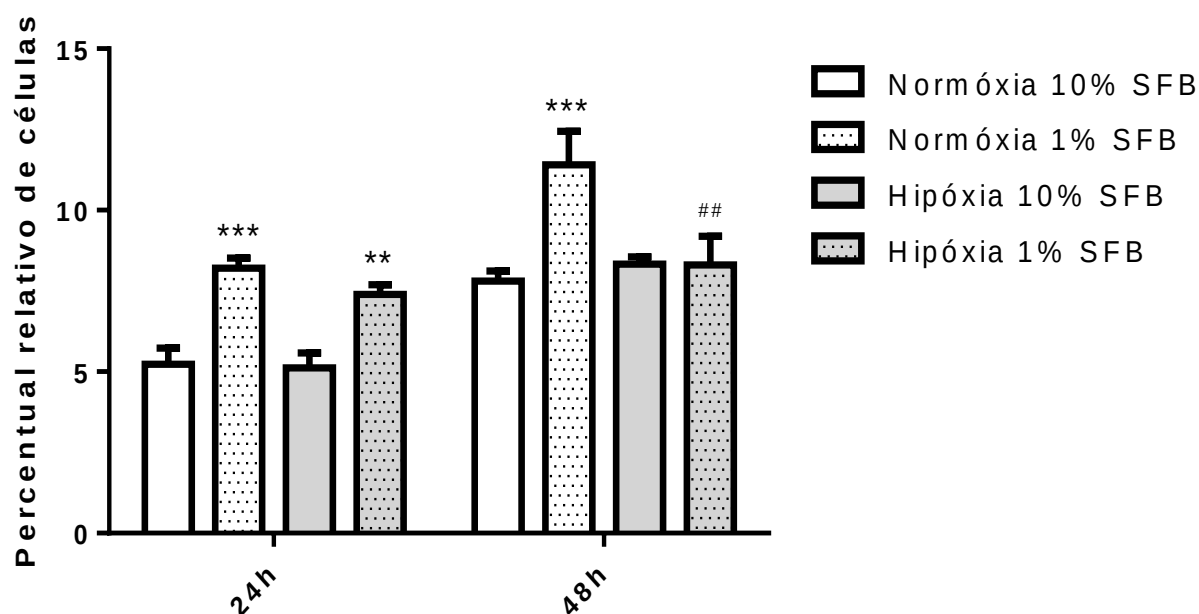


Figura 10. Análise de morte por incorporação de iodeto de propídio em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas. Todos os dados foram comparadas entre as condições o controle 24N10. ** $P < 0,01$. *** $p < 0,001$. # Comparação entre N1 e H1 em 24 e 48 horas. ## $P < 0,01$. N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); N1 (normóxia com 1% de Soro Fetal Bovino); H10 (hipóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); H1 (hipoxia com 1% de Soro Fetal de

Hipóxia com privação de nutrientes e Hipóxia isolada determinaram redução de células em G0-G1 em 24 horas e 48 horas, respectivamente

A caracterização dos eventos no ciclo celular e a sua cinética foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados de cada condição foram comparados com o controle intraxperimental, 24N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino).

No período de 24 horas, a privação de nutrientes (normóxia 1% SFB) promoveu redução significativa de percentual de células em fases S/G2/M do ciclo celular ($p < 0,05$). A hipóxia isolada contribuiu com uma redução significativa de células em G0-G1 ($p < 0,05$). Porém, foi a condição combinada de hipóxia com privação de nutrientes (hipóxia 1% SFB) que promoveu maior significância na redução de células em fases G0-G1 ($p < 0,001$) e S/G2/M ($p < 0,05$). Na comparação entre condições, a hipóxia promoveu redução significativa do percentual de células em fases G0-G1 ($p < 0,001$) e S/G2/M ($p < 0,001$) do ciclo celular (Figura 11a).

No tempo de 48 horas, a hipóxia promoveu redução significativa da população de células tanto em G0-G1 ($p < 0,001$) quanto em S/G2/M ($p < 0,001$). A condição combinada hipóxia com privação de nutrientes também determinou redução no percentual de células em G0-G1 ($p < 0,001$) (Figura 11b).

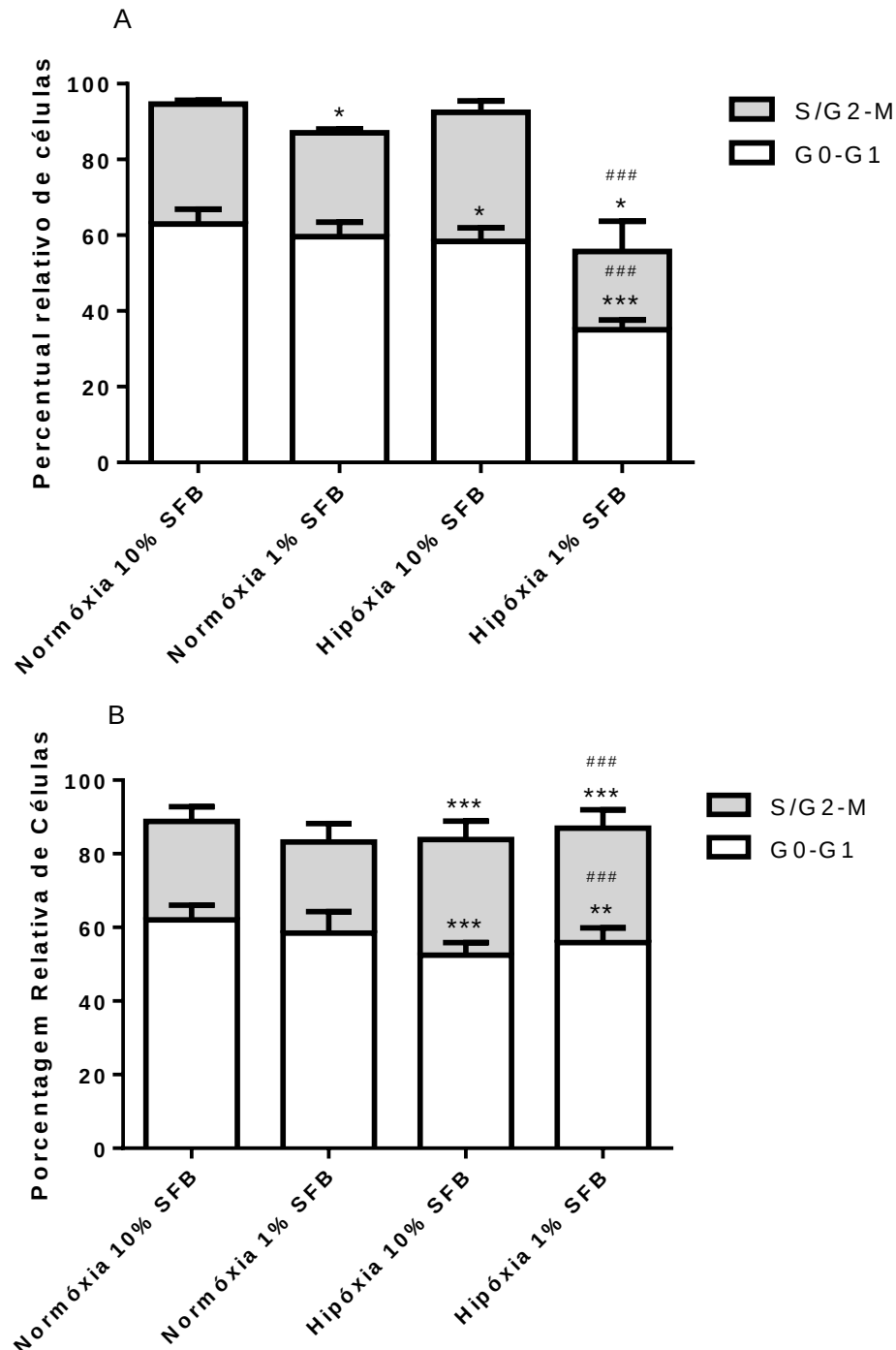


Figura 11. Análise de ciclo celular por incorporação de iodeto de propídio em células MCF-7 em períodos de 24 horas e 48 horas. (A) tempo de 24 horas (B) tempo de 48 horas. Todos os dados foram comparadas entre as condições o controle 24N10.* $p < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $p < 0,001$. # Comparação entre N1 e H1 em 24 e 48 horas. ### $P < 0,001$. N10 (normóxia com 10% de Soro Fetal Bovino); N1 (normóxia com 1% de Soro Fetal Bovino); H10 (hipóxia com 10% de Soro Fetal

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, investigamos o perfil de galectina-3 na sobrevivência de células do câncer de mama bem como a modulação de Gal-3 no microambiente hipóxico e/ou privado de nutrientes, em linhagens MCF-7 (receptor estrógeno positivo) e MDA-MB-231 (triplo negativo), e a participação dessa glicoproteína na sobrevivência celular.

O microambiente dos tumores sólidos apresenta regiões distantes de vasos e capilares sanguíneos, dificultando a perfusão de oxigênio nesse tecido, bem como a distribuição adequada de nutrientes e a remoção eficaz de metabólitos (CARDOSO *et al.*, 2016; CARNERO; LLEONART, 2016; ZENG *et al.*, 2007). As células tumorais garantem a perpetuação de sua linhagem por meio de uma adaptação metabólica mediada pela expressão de diversos genes, o que permite a imortalidade celular (CARNERO; LLEONART, 2016).

Gal-3 é uma glicoproteína amplamente difundida e expressa por vários tipos de linhagens tumorais: de mama (RÊGO *et al.*, 2013), esôfago (LIANG *et al.*, 2015), rins (XU, YANGYANG *et al.*, 2016), estômago (SUBHASH; HO, 2016), tireoide (HARAZONO *et al.*, 2015), entre outros (SONG, LIN *et al.*, 2014). Galectina-3 está presente no citoplasma, núcleo e membrana plasmática, podendo migrar para a mitocôndria ou ser secretada para o meio extracelular (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014). Suas funções são dependentes de localização subcelular e da patologia em que está inserida, sendo requisitada para promoção ou supressão tumoral, apoptose ou fuga de apoptose, por exemplo (SONG *et al.*, 2014a; ZHANG, HAO *et al.*, 2014).

A análise de expressão gênica em células MCF-7 e MDA-MB-231 comprovou a expressão de transcritos de Galectina-3. Em células MCF-7, a hipóxia com privação de nutrientes promoveu maior expressão de transcritos de Gal-3 com aumento de 3 (três) vezes em relação ao controle, 24N10. Em células MDA-MB-231, a privação de nutrientes determinou aumento em 1,5 vezes o valor do transcrito de Gal-3 em relação ao controle. Os dados obtidos indicam que a expressão gênica de Gal-3 é um recurso imediato para adaptação das células em condições de hipóxia e

privação de nutrientes. Outros pesquisadores observaram superexpressão de transcritos de Gal-3 em seus modelos (HANN *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2016).

No mesmo modelo experimental, utilizando células NG97ht (glioblastoma), foi observado que os transcritos de Gal-3 aumentaram na privação de nutrientes, atingindo os maiores valores em 24 horas com redução em 48 horas (IKEMORI *et al.*, 2014). De acordo com resultados prévios, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, em células Mia PaCa-2 (adenocarcinoma pancreático), foi observado que privação nutricional determinou aumento de transcritos de Gal-3 em 48 horas; ao contrário, em PANC-1 (câncer epitelióide pancreático), a hipóxia isolada promoveu aumento na requisição de Gal-3 com acréscimo na quantidade relativa de transcritos dessa glicoproteína.

Galectina-3 é uma glicoproteína requisitada em situações de estresse celular (hipóxia e privação de nutrientes), sendo ativada via HIF-1 e NF- κ B (CARDOSO *et al.*, 2016; IKEMORI *et al.*, 2014).

Para avaliar a modulação de expressão de Gal-3, realizamos ensaios de Western Blotting. Nossos resultados confirmam a superexpressão de Gal-3, indicando que em condição combinada hipóxia com privação de nutrientes houve modulação em níveis de transcritos e proteicos de Gal-3 em 24 horas e 48 horas, respectivamente. Juntos, esses resultados indicam que o microambiente tumoral hipóxico e/ou privado de nutrientes modula a expressão de Gal-3 em células de câncer de mama.

Devido à dualidade funcional de Gal-3, nós realizamos ensaios de imunofluorescência para detectar e determinar a localização subcelular dessa glicoproteína no microambiente tumoral da mama.

Em células MCF-7, nossos resultados indicam ampla difusão de Gal-3 no compartimento intracelular, sendo encontrado tanto no núcleo quanto citoplasma. Porém, observamos que ao remover a suplementação nutricional (Soro Fetal Bovino), Gal-3 foi marcada com mais intensidade fluorescente no núcleo, tanto na presença de oxigênio (N1) quanto na hipóxia (H1). Quanto ao tempo, observamos que o período de 24 horas fornece intensidade fluorescente maior que o período de 48 horas, porém com a privação nutricional determinando maior concentração

nuclear de Gal-3. Em células MDA-MB-231, não observamos relação entre as condições propostas pelo estudo e localização subcelular de Gal-3. Houve ampla distribuição entre as condições tanto no citoplasma quanto no núcleo. Quando a intensidade fluorescente para Gal-3 diminuiu ou aumentou, ocorreu de forma simultânea nos dois compartimentos (citoplasma e núcleo). Os dados obtidos sugerem que a localização subcelular de Gal-3 é modulada no microambiente do câncer de mama. Privação de nutrientes foi limitante para concentração nuclear de Gal-3 em células MCF-7, enquanto a hipóxia determinou maior concentração intracelular de Gal-3 em células MDA-MB-231.

Expressão nuclear de Gal-3 no câncer de próstata foi associada com diminuição da proliferação celular e superexpressão citoplasmática com efeitos anti apoptóticos, aumento da proliferação e crescimento celular, invasão e angiogênese (CALIFICE *et al.*, 2004; FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014).

Diversos autores têm empregado esforços na inibição de Gal-3 avaliando efeitos como inibição de crescimento independente de ancoragem, invasão e progressão tumoral (IKEMORI *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2016; XU, YANGYANG *et al.*, 2016) para avaliar a influência dessa biomolécula em diversas patologias, incluindo o câncer. Com o objetivo de avaliar a participação de Gal-3 na sobrevivência de células do câncer de mama, inibimos Galectina-3 extracelular com adição de lactose, sacarose e um anticorpo monoclonal.

Gal-3 é uma lectina com capacidade de reconhecer resíduos β -galactosídeos e possui um N-terminal rico em glicina, prolina e lisina e um C-terminal que representa o domínio de reconhecimento para carboidratos (CRD) (CARDOSO *et al.*, 2016; SANT'ANA *et al.*, 2011). Lactose e sacarose são reconhecidos pelo C-terminal de Gal-3 (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014), devido a presença do CRD enquanto anticorpos ligam-se N-terminal da molécula.

Nossos achados indicam que a adição de anticorpo monoclonal M338 (hibridoma) em células MCF-7 aumentam o percentual de morte celular, sendo a hipóxia com privação de nutrientes, a condição responsável pelo aumento significativo em 24 horas. No período de 48 horas, H1 determinou um percentual de 61% de células mortas. Após a inibição de Gal-3 extracelular, também avaliamos o

ciclo celular, onde observamos que a adição de M338 promoveu aumento no percentual de células em G0-G1 (arrasto) no período de 24 horas. Em 48 horas, a inibição de Gal-3 determinou aumento significativo de células em fases S/G2/M. Nossos resultados sugerem que Gal-3 participa de mecanismos de sobrevivência celular, favorecendo a manutenção de células tumorais no microambiente hipóxico e privado de nutrientes de maneira independente de função-lectina, ou seja, a sobrevivência celular mediada por Gal-3 ocorre via N-terminal.

No desenvolvimento do tumor, Gal-3 modula diversas vias de sinalização (Ras, Raf, MEK, ERK e Notch), regulando a sobrevivência celular bem como a proliferação e migração (Figura 5). No meio extracelular, Gal-3 promove migração de células tumorais pela comunicação com integrinas. Associada à capacidade de oligomerização, Gal-3 liga-se às células endoteliais e impede a internalização de VEGFR, regulando negativamente a cascata de ativação de angiogênese (CARDOSO *et al.*, 2016).

ABREU, CA., e colaboradores (2014) observaram que a inibição de Gal-3 promoveu neuroproteção de células ganglionares da retina (MARIA; MARTINEZ, [S.d.]). Porém, a inibição de Gal-3 induziu morte celular em células NG97ht, além de reduzir o crescimento tumoral (IKEMORI *et al.*, 2014). Também em modelo *in vitro*, a inibição de Gal-3 promoveu redução de potencial migratório em células SKOV3 (carcinoma ovariano) com maior susceptibilidade das células à apoptose (LU *et al.*, 2016). Avaliando os efeitos antitumorais da inibição de Gal-3 em células renais, XU e colaboradores (2016) concluíram que a inibição de Gal-3 promoveu redução na proliferação das células tumorais bem como redução na capacidade migratória, além de induzir apoptose (morte celular programada) com arrasto no ciclo celular em fase G1 (XU, YANGYANG *et al.*, 2016). No câncer de estômago, a inibição de Gal-3 determinou maior percentual de morte (SUBHASH; HO, 2016). Já em células de tumor pituitário GH3, a inibição de Gal-3 promoveu aumento no percentual de células em apoptose (HUANG *et al.*, 2014).

Por outro lado, HANN e colaboradores, utilizando um modelo experimental *in vivo*, avaliaram os efeitos de Gal-3 no crescimento tumoral e concluíram que Galectina-3 é superexpressa em linhagens de câncer pancreático e que a inibição de Gal-3 promove moderada redução na proliferação e migração, porém não

conseguiram associar a modulação de Gal-3 com a transformação maligna de células epiteliais do pâncreas (HANN *et al.*, 2011).

Nossos resultados indicam que a hipóxia combinada com privação de nutrientes determinou o maior percentual de morte de células MCF-7 e a hipóxia isolada induziu maior população de células mortas em MDA-MB-231. A condição H1 representa o maior estresse celular, mimetizando as regiões centrais do tumor com pobre distribuição de oxigênio e nutrientes devido ao crescimento acelerado e replicação das células tumorais somada à vascularização deficiente nesse ambiente (CARDOSO *et al.*, 2016). Porém, quando avaliamos hipóxia e privação nutricional de maneira isolada, observamos que a privação de nutrientes tem maior impacto sobre a população de células mortas, ou seja, a taxa de morte na condição N1 foi maior que H10 nos períodos de 24 e 48 horas.

Em células MDA-MB-231, a privação de nutrientes determinou aumento significativo na população de células mortas, seguida da hipóxia com privação de nutrientes em período de 24 horas. Privação de nutrientes determinou o maior percentual de células mortas no período de 48 horas com valor significativo.

Utilizando células híbridas (humano/murino) NG97ht, IKEMORI e colaboradores (2014), avaliaram morte celular pela incorporação de iodeto de propideo, por citometria de fluxo. Os autores concluíram que a condição de hipóxia combinada com privação de nutrientes favorece o aumento no percentual de células mortas com discrepâncias entre as condições de maneira isolada (IKEMORI *et al.*, 2014)

De acordo com os resultados prévios, obtidos pelo nosso grupo de pesquisa na caracterização do microambiente do câncer de pâncreas, SILVA-FILHO *et al.*, 2015 utilizaram linhagens Mia PaCa-2 e PANC-1 e avaliaram o percentual de células mortas, concluindo que a condição combinada de hipóxia com privação de nutrientes determina a maior taxa de morte celular.

Avaliando o ciclo celular em células MCF-7, observamos que a privação de nutrientes reduziu a população de células em fases G0-G1 tanto no período de 24 horas quanto em 48 horas. Em células MDA-MB-231, hipóxia com privação de nutrientes determinou redução significativa de células em fases G0-G1. Esses

achados sugerem que Gal-3 participa da modulação do ciclo celular.

Galectina-3 é desregulada no microambiente de diversos tipos de câncer. Embora a expressão de Gal-3 também está associada à participação em eventos fisiológicos, hipóxia e privação de nutrientes podem representar condições favoráveis para o aumento de migração, invasão e sobrevivência de células neoplásicas mediadas por Gal-3. Nossos resultados indicam que Gal-3 pode ser utilizada como alvo de estratégias terapêuticas de combate ao câncer, tanto molécula-alvo quanto molécula sensibilizante.

7 CONCLUSÕES

- Hipóxia com privação de nutrientes determinou aumento da expressão de transcritos de Gal-3 no período de 24 horas em células MCF-7.
- Na linhagem MDA-MB-231, hipóxia isolada determinou aumento da expressão de transcritos de Gal-3 no período de 48 horas.
- Ensaio de Western blotting indicou que hipóxia com privação de nutrientes determinou aumento de Gal-3 no período de 48 horas em células MCF-7, corroborando os resultados obtidos na expressão gênica.
- A privação de nutrientes determinou maior concentração nuclear de Gal-3 tanto na presença de oxigênio como em condição de hipóxia nos tempos avaliados em células MCF-7.
- A localização subcelular de Gal-3 variou de acordo com as condições do estudo.
- Inibição de Gal-3 por adição de anticorpo monoclonal M338 induziu aumento de morte celular em condição combinada hipóxia com privação de nutrientes em células MCF-7, sugerindo a participação de Gal-3 na sobrevivência de células do câncer de mama
- Inibição de Gal-3 por adição de anticorpo monoclonal M338 determinou aumento significativo de células em Fases S/G2/M em condição combinada hipóxia e privação de nutrientes em células MCF-7

8 PERSPECTIVAS

- Realizar ensaios de inibição de Gal-3 em células MDA-MB-231
- Interferir no modelo experimental utilizando siRNA (RNA de interferência) para silenciamento gênico de galectina-3.

REFERÊNCIAS

- ARTHMAR, Cristina *et al.* Mortalidade por câncer de mama em hospital de referência em oncologia , Vitória , ES Breast cancer mortality among. v. 16, n. 3, p. 582–591 , 2013.
- BABU, R. L. *et al.* Effect of estrogen and tamoxifen on the expression pattern of AP-1 factors in MCF-7 cells: Role of c-Jun, c-Fos, and Fra-1 in cell cycle regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 380, n. 1-2, p. 143–151 , 2013.
- BARTON MD, Mary Kay. Bevacizumab in neoadjuvant chemotherapy increases the pathological complete response rate in patients with triple-negative breast cancer. **CA: a cancer journal for clinicians** v. 00, n. 00, p. 4–5 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639119>>.
- BERARDI, Damián E. *et al.* Myoepithelial and luminal breast cancer cells exhibit different responses to all-trans retinoic acid. **Cellular Oncology** , 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13402-015-0230-z>>.
- CALIFICE, Stéphane *et al.* Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene** v. 23, n. 45, p. 7527–7536 , 2004.
- CARDOSO, Ana Carolina Ferreira *et al.* Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology** v. 6, n. May, p. 1–12 , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00127>>.
- CARNERO, Amancio; LLEONART, Matilde. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution. **Inside the Cell** v. 1, n. 2, p. 96–105 , 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/icl3.1039>>.
- CARVALHO, Renato S *et al.* Characterization of LGALS3 (galectin-3) as a player in DNA damage response. v. 15, n. 7, p. 840–850 , 2014.
- CAVALLO, Federica *et al.* 2011: The immune hallmarks of cancer. 2011, [S.l: s.n.], 2011. p.319–326. 0092-8674 (Print). .
- CAY, Tugce. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: a review of the

literature. **Turkish Journal of Pathology** v. 28, n. 1, p. 1, 2012.10185615.

CHOUDHRY, Hani; HARRIS, Adrian L.; MCINTYRE, Alan. The tumour hypoxia induced non-coding transcriptome. **Molecular Aspects of Medicine** v. 47-48, p. 35–53, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.01.003>>.

CIRQUEIRA, Magno Belém *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina** v. 39, p. 499–503, 2011.

CRUCHO, Carina I.C. *et al.* Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate Research** v. 402, p. 124–132, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862151400367X>>.

CYTOBIOLOGICA, E T *et al.* The glycomic profile of invasive ductal carcinoma of the breast is altered in patients with hypoxic regions : implications for tumor behavior. v. 52, n. 2, p. 96–103, 2014.

DALZIEL, Martin *et al.* Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. **Science (New York, N.Y.)** v. 343, n. 6166, p. 1235681, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385630>>.1095-9203 (Electronic)r0036-8075 (Linking).

DE OLIVEIRA, Joana T. *et al.* Hypoxia up-regulates galectin-3 in mammary tumor progression and metastasis. **PLoS ONE** v. 10, n. 7, 2015.

FORTUNA-COSTA, Anneliese *et al.* Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. **Frontiers in Oncology** v. 4, n. June, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fonc.2014.00138/full>>.

FRAGA, Avelino *et al.* Hypoxia and Prostate Cancer Aggressiveness: A Tale With Many Endings. **Clinical Genitourinary Cancer** v. 2, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558767315000713>>.

FUNASAKA, Tatsuyoshi; RAZ, Avraham; NANGIA-MAKKER, Pratima. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in Cancer Biology** v. 27, p. 30–38, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcan.2014.03.004>>.1044-579x.

FURNARI, Frank B. *et al.* Heterogeneity of epidermal growth factor receptor

signalling networks in glioblastoma. **Nature Reviews Cancer** v. 15, n. 5, p. 302–310 , 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3918>>.

GAILLARD, Hélène; GARCÍA-MUSE, Tatiana; AGUILERA, Andrés. Replication stress and cancer. **Nature Reviews Cancer** v. 15, n. 5, p. 276–289 , 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3916>>.

GATENBY, Robert A.; GILLIES, Robert J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer** v. 8, n. 1, p. 56–61 , 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2255>\n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059462>>.1474-1768 (Electronic)r1474-175X (Linking).

GRANADOS-PRINCIPAL, Sergio *et al.* Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research** v. 17, n. 1, p. 1–16 , 2015. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/17/1/25>>.

GUSTERSON, Barry a.; STEIN, Torsten. Human breast development. **Seminars in Cell and Developmental Biology** v. 23, n. 5, p. 567–573 , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2012.03.013>>.1083-3021 (Print)r1083-3021 (Linking).

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell** v. 144, n. 5, p. 646–674 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.0026201009680.

HANN, Alexander *et al.* Comprehensive analysis of cellular galectin-3 reveals no consistent oncogenic function in pancreatic cancer cells. **PLoS ONE** v. 6, n. 6 , 2011.1932-6203 (Electronic)r1932-6203 (Linking).

HARAZONO, Yosuke *et al.* Extracellular galectin-3 programs multidrug resistance through Na⁺ / K⁺ -ATPase and P-glycoprotein signaling. v. 6, n. 23 , 2015.

HIRANO, Kiyoko *et al.* Enhanced expression of the β 4-N-acetylgalactosaminyltransferase 4 gene impairs tumor growth of human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** p. 1–6 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15006415>>.

HOEBEN, Ann *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.

Pharmacological reviews v. 56, n. 4, p. 549–580 , 2004.0031-6997.

HUANG, C. X. *et al.* Reduction of galectin-3 expression reduces pituitary tumor cell progression. **Genetics and Molecular Research** v. 13, n. 3, p. 6892–6898 , 2014.1676-5680 (Electronic)r1676-5680 (Linking).

IKEMORI, Rafael Yamashita *et al.* Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival. **PLoS ONE** v. 9, n. 11, p. e111592 , 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111592>>.

KUO, P.; LE, Q.-T. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. **Glycobiology** v. 24, n. 10, p. 921–925 , 2014. Disponível em: <<http://www.glycob.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/glycob/cwu062>>.

LAUBLI, H. *et al.* Lectin Galactoside-binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-associated Immunomodulatory Ligand for CD33-related Siglecs. **Journal of Biological Chemistry** v. 289, n. 48, p. 33481–33491 , 2014. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M114.593129>>.

LIANG, Ning *et al.* Effect of galectin-3 on the behavior of Eca109 human esophageal cancer cells. **Molecular Medicine Reports** v. 11, n. 2, p. 896–902 , 2015.

LU, Huaiwu *et al.* Galectin-3 regulates metastatic capabilities and chemotherapy sensitivity in epithelial ovarian carcinoma via NF-κB pathway. **Tumor Biology** , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-016-5004-3>>.1327701650.

MARIA, Ana; MARTINEZ, Blanco. IS TO (n GY on A -e ND di te H d IS m TO an P us A cr TH ip O t) L IS TO (n GY on A -e ND di te H d IS m TO an P us A cr TH ip O t) L. , [S.d.].

MÁRQUEZ-ACOSTA, Gonzalo. Cáncer de mama. , 2012.

MCCRACKEN, Alison N.; EDINGER, Aimee L. *Nutrient transporters: The Achilles' heel of anabolism* .**Trends in Endocrinology and Metabolism**. [S.l: s.n.]. , 2013

MEDICAL, Continuing *et al.* Take free quizzes online at [acsjournals . com](http://acsjournals.com) / ce Risk Factors , Pathophysiology , and Treatment of Hot Flashes in Cancer. v. 63, n. 3 , 2013.

MORE, Shyam K. *et al.* N-glycans and metastasis in galectin-3 transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 460, n. 2, p. 302–307 , 2015. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15004659>>.

NAGPAL, Neha *et al.* HIF-inducible miR-191 promotes migration in breast cancer through complex regulation of TGF β -signaling in hypoxic microenvironment.

Scientific Reports v. 5, p. 9650 , 2015. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/srep09650>>.

NAKAJIMA, Kosei *et al.* Galectin-3 cleavage alters bone remodeling: Different outcomes in breast and prostate cancer skeletal metastasis. **Cancer Research** v. 76, n. 6, p. 1391–1402 , 2016.

NUNNEY, L; MUIR, B. Peto ' s paradox and the hallmarks of cancer : constructing an evolutionary framework for understanding the incidence of cancer. p. 1–7 , 2015.

PALAZON, Asis *et al.* Review HIF Transcription Factors , Inflammation , and Immunity. **Immunity** v. 41, n. 4, p. 518–528 , 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>>.

PARKS, Scott K. *et al.* Hypoxia optimises tumour growth by controlling nutrient import and acidic metabolite export. **Molecular Aspects of Medicine** v. 47-48, p. 3–14 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2015.12.001>>.

PORUK, Katherine E. *et al.* Breast cancer recurrence after nipple-sparing mastectomy: one institution's experience. **American Journal of Surgery** v. 209, n. 1, p. 212–217 , 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2014.04.001>>.

RAOUF, Afshin *et al.* The biology of human breast epithelial progenitors. **Seminars in Cell & Developmental Biology** v. 23, n. 5, p. 606–612 , 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.04.009>>.

RÊGO, Moacyr Jesus Barreto De Melo *et al.* Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. **Medical Molecular Morphology** v. 46, n. 2, p. 92–96 , 2013.

ROFSTAD, E K *et al.* Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. **Cancer Research** v. 66, n. 13, p. 6699–6707 , 2006.0008-5472 (Print)r0008-5472.

RUST, Steven *et al.* Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a “triple negative” breast cancer cell type. **Molecular cancer** v. 12, n. 1, p. 11 , 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.1476-4598.

SAMANTA, Debangshu *et al.* Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 111, n. 50, p. E5429–E5438 , 2014. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1421438111>>.

SANT’ANA, Juliana Moreira De Almeida *et al.* Expressão de galectina-3 e beta-catenina em lesões pré-malignas e carcinomatosas de língua de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 47, n. 1, p. 49–56 , 2011.

SEMENZA, Gregg L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research** , 2015. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915001925>>.

SIEGEL, Rebecca *et al.* Cancer Statistics , 2014. v. 64, n. 1, p. 9–29 , 2014.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. Cancer Statistics, 2015. **CA Cancer J Clin** v. 65, n. 1, p. 5–29 , 2015.

SIEGEL, Rebecca L; MILLER, Kimberly D; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians** v. 66, n. 1, p. 7–30 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742998>>.0017-9124.

SONG, Lin *et al.* Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta** v. 431, p. 185–191 , 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.019>>.

SONG, Lin *et al.* *Galectin-3 in cancer* .**Clinica Chimica Acta**. [S.l: s.n.]. , 2014b

SUBHASH, Vinod Vijay; HO, Bow. Galectin 3 acts as an enhancer of survival responses in H. pylori-infected gastric cancer cells. **Cell Biology and Toxicology** p. 23–35 , 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10565-016-9315-3>>.1056501693.

TAKAHASHI, Ryou-u; MIYAZAKI, Hiroaki; OCHIYA, Takahiro. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. **Cancers** v. 7, n. 2, p. 598–616 , 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6694/7/2/598/>>.8133542251.

VASCONCELOS, Marcelo Gadelha *et al.* Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** n. April, p. 1–8 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239115002621>>.

WESLEY, Umadevi V. *et al.* Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling. **Brain Research** v. 1496, p. 1–9 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.12.008>>.1872-6240 (Electronic)r0006-8993 (Linking).

WHO | Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

XIN, Ming; DONG, Xin-Wen; GUO, Xiu-Li. Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 69, p. 179–185 , 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332214001851>>.

XU, Y. *et al.* Antitumor effects of galectin-3 inhibition in human renal carcinoma cells. **Experimental Biology and Medicine** v. 0, p. 1–9 , 2016. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1535370216630839>>.1535-3699.

XU, Yangyang *et al.* Antitumor effects of galectin-3 inhibition in human renal carcinoma cells. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)** , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846978>>.

ZENG, Yan *et al.* HIF-1 α is a regulator of galectin-3 expression in the intervertebral disc. **Journal of bone and mineral research : the official journal of**

the American Society for Bone and Mineral Research v. 22, n. 12, p. 1851–1861 , 2007.0884-0431 (Print)r0884-0431 (Linking).

ZHANG, Hao *et al.* Galectin-3 as a Marker and Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. **PLoS ONE** v. 9, n. 9, p. e103482 , 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103482>>.2013121342.

ZHANG, Jun; LI, Liyuan; LU, Yi. Effects of Hypoxia, Surrounding Fibroblasts, and p16 Expression on Breast Cancer Cell Migration and Invasion. **Journal of Cancer** v. 6, n. 5, p. 430–437 , 2015. Disponível em: <<http://www.jcancer.org/v06p0430.htm>>.

ZHONG, Rui *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1 α in radiation-induced autophagic cell death in breast cancer cells. **Tumor Biology** , 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3425-z>>.