



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Antônio Felix da Silva Filho

**Estabelecimento de um Modelo *In Vitro* 3d para Avaliação do Papel das Galectinas -1 e -
3 na Autofagia do Microambiente Tumoral Pancreático**

**Recife
2019**

Antônio Felix da Silva Filho

Estabelecimento de um Modelo *In Vitro* 3D para Avaliação do Papel das Galectinas -1 e -3 na Autofagia do Microambiente Tumoral Pancreático

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.
Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

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

Coorientadora: Prof. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta

**Recife
2019**

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

Silva Filho, Antônio Felix da

Estabelecimento de um modelo in vitro 3D para avaliação do papel das galectinas-1 e -3 na autofagia do microambiente tumoral pancreático / Antônio Felix da Silva Filho. – 2019.

133 f. : il.

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

Coorientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.
Inclui referências.

1. Câncer. 2. Pâncreas – Doenças. 3. Tumores. I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orientador) II. Pitta, Maira Galdino da Rocha (coorientadora). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 393

Antônio Felix da Silva Filho

Estabelecimento de um Modelo *In Vitro* 3D para Avaliação do Papel das Galectinas -1 e -3 na Autofagia do Microambiente Tumoral Pancreático

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 11/04/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Eliane Campos Coimbra
Universidade de Pernambuco

Dra. Marina Cadena da Matta
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP

RESUMO

O câncer de pâncreas (PDAC) apresenta um perfil de malignidade caracterizado pela resistência terapêutica, decorrente entre outros fatores, de extensas áreas desmoplásicas e hipóxicas. A privação nutricional e a hipóxia são características do microambiente tumoral pancreático que estimulam respostas adaptativas. Estas respostas asseguram a sobrevivência das células neoplásicas, e dentre as mesmas, tem-se o fenômeno autofágico. Dentre as moléculas envolvidas no sucesso do estabelecimento do câncer de pâncreas, destacam-se dois membros da família das galectinas, a galectina-3 (Gal-3) e a galectina-1 (Gal-1). Portanto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a influência das Gal-1 e Gal-3 sobre o fenômeno autofágico do PDAC num modelo mimético do microambiente. Para isto, o crescimento tridimensional das linhagens Mia PaCa-2 e PANC-1 foi caracterizado em diferentes composições de matriz extracelular e dois modelos foram escolhidos. A avaliação da expressão de LC3 em cultivo bidimensional submetido a condições de privação e durações experimentais distintas, foi realizada por western blot. Para escolha do modelo fidedigno de cultivo tridimensional e confirmação da indução autofágica, foi realizada quantificação das organelas autofágicas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A caracterização da expressão de LC3 e das galectinas -1 e -3, nas células submetidas a condições de privação nutricional e hipóxia, foi analisada através de imunofluorescência e western blot dos modelos bi e tridimensional. A influência de Gal-3 sobre o processo autofágico foi analisada através de inibição por transfecção com siRNA para Gal-3, no modelo de cultivo bidimensional. Os resultados obtidos mostraram a indução da autofagia nas linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 em modelo de cultivo bidimensional quando mantidas por 24 horas em meios específicos privados de nutrientes. As análises por MET confirmaram a indução da autofagia com maior quantidade mediana de vacúolos autofágicos nos cultivos em *starving* nutricional para PANC-1 ($p = 0,0035$) e Mia PaCa-2 ($p = 0,0362$). A avaliação das expressões proteicas revelou que a expressão de Gal-3 e Gal-1 em PANC-1 aumentaram nas condições de privação nutricional associada à hipóxia, enquanto em Mia PaCa-2, houveram aumentos de Gal-1 porém não de Gal-3. Em ambas as linhagens, as expressões proteicas de LC3 apresentaram o mesmo padrão que o das galectinas. O crescimento dos esferoides a partir do cultivo das linhagens de PDAC apresentou diferentes padrões de acordo com a concentração de colágeno do tipo I na matriz extracelular. E o modelo no qual houve maior quantidade mediana de vacúolos autofágicos foi o composto por matriz com adição de colágeno do tipo I à 2mg/ml para as linhagens PANC-1 ($p = 0,0166$) e Mia PaCa-2 ($p = 0,0002$). A análise da expressão proteica

neste modelo tridimensional revelou aumento de Gal-1 e Gal-3 na condição de hipóxia isolada para PANC-1 e diminuição de ambas as proteínas na condição simultânea de privação nutricional e hipóxia para Mia PaCa-2. A inibição de Gal-3, por siRNA, no modelo bidimensional, provocou redução da expressão de LC3II e consequentemente do fluxo autofágico em todas as condições experimentais para ambas as linhagens, com exceção da condição simultânea de privação nutricional e hipóxia (H1) para PANC-1. Através dos resultados obtidos é possível concluir que a expressão das galectinas -1 e -3 é modulada pelas condições do microambiente tumoral e o desenvolvimento do tumor é influenciado pela composição da matriz extracelular. Comprovou-se que a expressão das galectinas -1 e -3 e do marcador autofágico LC3 pode apresentar diferentes padrões de acordo com o modelo utilizado no estudo. Ademais, a partir de modelo bidimensional foi provado que a expressão de Gal-3 é importante para o fluxo autofágico do câncer pancreático.

Palavras-chave: Adenocarcinoma pancreático. Cultura tridimensional. Privação nutricional. Hipóxia. LC3.

ABSTRACT

Pancreatic cancer (PDAC) presents a malignancy profile characterized by therapeutic resistance, due to, among other factors, extensive desmoplastic and hypoxic areas. Starving and hypoxia are characteristics of the pancreatic tumor microenvironment that stimulate adaptive responses. These responses assure the tumor cells survival, and between them, there is the autophagic phenomenon. Among the molecules involved in the successful establishment of pancreatic cancer, two members of the galectin family, galectin-3 (Gal-3) and galectin-1 (Gal-1), stand out. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of Gal-1 and Gal-3 on the autophagic phenomenon from PDAC in a mimetic model of the microenvironment. For this, the three-dimensional growth of the Mia PaCa-2 and PANC-1 cell lines was characterized in different extracellular matrix compositions and two models were chosen. Evaluation of LC3 expression in two-dimensional culture submitted to deprivation conditions and distinct experimental durations was performed by western blot. To select the reliable model of three-dimensional culture and confirmation of autophagic induction, quantification of the autophagic organelles was performed on the transmission electron microscopy (TEM) images. Characterization LC3, galectin -1 and -3 expression on the starved and hypoxic cells was analyzed by immunofluorescence and western blot of the bi and three-dimensional models. Gal-3 influence on the autophagic process was analyzed by inhibition by transfection with Gal-3 siRNA in the two-dimensional culture model. Results showed that the autophagy induction in PANC-1 and Mia PaCa-2 cell lines two-dimensional culture model when maintained for 24 hours in specific starved media. MET analyzes confirmed the autophagy induction with a higher median number of autophagic vacuoles in the starving cultures for PANC-1 ($p = 0.0035$) and Mia PaCa-2 ($p = 0.0362$). Evaluation of protein expression revealed that Gal-3 and Gal-1 expression in PANC-1 increased in starved/hypoxia condition, whereas in Mia PaCa-2, there were increases of Gal-1 but not of Gal-3. In both lines, LC3 expression presented the same pattern that galectins. Spheroids growth presented different patterns according to the concentration of type I collagen in extracellular matrix. The model with the highest number of autophagic vacuoles was composed of matrix containing 2 mg/ml type I collagen for PANC-1 ($p = 0.0166$) and Mia PaCa-2 ($p = 0, 0002$). Analysis of the protein profile of three-dimensional model revealed an increase in Gal-1 and Gal-3 expression for PANC-1 under hypoxia and decrease of both proteins for Mia PaCa-2 under simultaneous condition starving and hypoxia. Gal-3 siRNA inhibition, in two-dimensional model, caused reduction in the LC3II expression and consequently in autophagic flow for all the experimental conditions in both lineages, except

for the simultaneous condition of nutritional starving and hypoxia (H1) for PANC -1. So, it is possible to conclude that the Gal-1 and Gal-3 expressions is modulated by tumor microenvironment and the tumor development is influenced by the extracellular matrix composition. It has been shown that galectin -1, -3 and the autophagic marker LC3 expressions may present different patterns according to the model used. Furthermore, from a two-dimensional model it has been shown that Gal-3 expression is important for the autophagic flow of pancreatic cancer.

Keywords: Pancreatic adenocarcinoma. Tridimensional culture. Starving. Hypoxia. LC3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais Sítios de Novos casos e Mortes por Câncer.....	18
Figura 2 – Avaliação dos Fatores de Risco para o Desenvolvimento de PDAC.....	19
Figura 3 – Diagrama da Histologia de Lesões Precursoras e PDAC.....	24
Figura 4 – Cortes macroscópicos de PDAC e suas variantes.....	26
Figura 5 – Cortes microscópicos de PDAC e suas variantes.....	27
Figura 6 – Desmoplasia do Câncer Pancreático.....	32
Figura 7 – Representação Esquemática da Formação de Áreas Hipóxicas em Tumor Glioblastoma.....	33
Figura 8 – Via de Sinalização da Hipóxia.....	35
Figura 9 – Hidroxilação Dependente de Oxigênio Regula a Degradação e Transativação de HIF1 α	36
Figura 10 – Envolvimento de HIFs e Seus Alvos Moleculares Sobre os Hallmarkes do Câncer.....	37
Figura 11 – Processo Autofágico.....	42
Figura 12 – Hipóxia e as Vias de Indução da Autofagia.....	52
Figura 13 – Classificação das Galectinas.....	55
Figura 14 – Desenho Experimental do Estudo.....	69
Figura 15 – Estabelecimento de Modelo de Cultivo Tridimensional – PANC-1.....	71
Figura 16 – Estabelecimento de Modelo de Cultivo Tridimensional – Mia PaCa-2.....	72
Figura 17 – Caracterização da Privação Nutricional – PANC-1.....	75
Figura 18 – Caracterização da Privação Nutricional – Mia PaCa-2.....	76
Figura 19 – Organização Celular Autofágica – Cultivo Bidimensional.....	79
Figura 20 – Organização Celular Autofágica – Cultivo Tridimensional I.....	81
Figura 21 – Organização Celular Autofágica – Cultivo Tridimensional II.....	83
Figura 22 – Formação de Modelo Mimético do Microambiente Tumoral Pancreático.....	87
Figura 23 – Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Bidimensional de PANC-1.....	90
Figura 24 – Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Bidimensional de Mia PaCa-2.....	91
Figura 25 – Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Bidimensional de PANC-1.....	92

Figura 26 – Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Bidimensional de Mia PaCa-2.....	93
Figura 27 – Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Tridimensional de PANC-1.....	94
Figura 28 – Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Tridimensional de Mia PaCa-2.....	95
Figura 29 – Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Tridimensional de PANC-1.....	96
Figura 30 – Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Tridimensional de Mia PaCa-2.....	97
Figura 31 – Impacto da Inibição de Galectina-3 na Autofagia.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estimativa da Sobrevida Livre de Doença em 5 anos, por Raça nos Estados Unidos, 1975-2014.....	17
Tabela 2 – Classificação Histológica das Neoplasia Exócrinas do Pâncreas.....	25
Tabela 3 – Proteínas Participantes da Formação do Autofagossomo.....	43
Tabela 4 – Proteínas Reguladas por mTOR.....	46
Tabela 5 – Identificação das Condições Experimentais.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos Específicos	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ESTATÍSTICAS DO CÂNCER	15
2.2	CÂNCER DE PÂNCREAS	18
2.2.1	Epidemiologia	18
2.2.2	Perfil Clínico-patológico do Tumor Pancreático	22
2.2.3	Correntes Avanços Terapêuticos	28
2.3	COMPREENDENDO O MICROAMBIENTE DO CÂNCER DE PÂNCREAS	31
2.3.1	Matriz Extracelular e Desmoplasia	31
2.3.2	O Componente Hipóxico	33
2.4	AUTOFAGIA NO CÂNCER	39
2.4.1	Mecanismos Moleculares Associados	39
2.4.2	Oncogenes e Genes Supressores de Tumor no Controle da Autofagia	44
2.4.3	Autofagia: Supressão e Promoção da Progressão Tumoral	46
2.4.4	O Papel da Hipóxia na Indução Autofágica	48
2.5	GLICOBIOLOGIA	53
2.6	GALECTINAS	54
2.6.1	Galectinas: Uma Breve Introdução	54
2.6.2	Galectinas -1 e -3, Pequenas Proteínas com Grandes Funções	56
2.6.3	Galectinas no Contexto Tumoral Pancreático	58
3	MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1	CULTURA DE CÉLULAS	60
3.1.1	Cultura de PANC-1	60
3.1.2	Cultura de Mia PaCa-2	60
3.1.3	Cultura Tridimensional das Linhagens de PDAC	61
3.1.4	Cultura Líquida de Bactérias	61
3.2	TRANSFECCÃO CELULAR	61
3.2.1	Extração de DNA Plasmidial	61
3.2.2	Otimização da Transfecção	62

3.2.3 Silenciamento de Galectina-3.....	62
3.3 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA E PRIVAÇÃO NUTRICIONAL	63
3.4 TÉCNICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	64
3.4.1 Caracterização do Crescimento 3D	64
3.4.2 Imunofluorescência de Cultivo Bidimensional	64
3.4.3 Imunofluorescência de Cultivo Tridimensional	65
3.5 TÉCNICAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	65
3.5.1 Fixação e Processamento de Cultura Bidimensional para MET Convencional	65
3.5.2 Fixação e Processamento de Cultura Tridimensional para MET Convencional	66
3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA	67
3.6.1 Extração Proteica de Cultura Bidimensional.....	67
3.6.2 Extração Proteica de Cultura Tridimensional.....	67
3.6.3 Western Blott.....	67
4 RESULTADOS	70
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO MODELO TRIDIMENSIONAL	70
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRIVAÇÃO NUTRICIONAL NA INDUÇÃO AUTOFÁGICA	73
4.3 DETERMINAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL E COMPROVAÇÃO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA.....	77
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO FENÔMENO AUTOFÁGICO NO MICROAMBIENTE HIPÓXICO E PRIVADO DE NUTRIENTES	85
4.5 IMUNOMARCAÇÃO NO MICROAMBIENTE MIMÉTICO	88
4.6 IMPACTO DA INIBIÇÃO DE GAL-3 SOBRE O FLUXO AUTOFÁGICO DO CÂNCER PANCREÁTICO	98
5 DISCUSSÃO	101
6 CONCLUSÃO	106
7 PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma pancreático, a forma mais frequente de câncer de pâncreas, é um tumor sólido de origem glandular com alta agressividade. A anato-fisiologia do órgão assim como o perfil de desenvolvimento do tumor possibilitam o “sucesso” da doença e apenas 5% dos pacientes apresentam sobrevida livre de doença maior que 5 anos após o tratamento (REN; LIU; SURIAWINATA, 2019). Apesar da baixa incidência quando comparado aos demais tumores sólidos, o PDAC é responsável por taxas elevadas de mortalidade em indivíduos com idade superior à 55 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). A terapia destinada ao câncer pancreático é baseada no uso de gemcitabina ou a combinação dos fármacos ácido folínico, fluorouracila, irinotecano e oxaliplatina cujo regime é denominado de FOLFIRINOX (GUPTA; AMANAM; CHUNG, 2017).

A excessiva desmoplasia no câncer de pâncreas mantém a condição hipóxica e contribui para o mau prognóstico, através da resistência à quimioterapia e do aumento do potencial metastático (ANSARI et al., 2017; PANG; WILSON; APTE, 2017). A hipóxia ocorre quando tensão de oxigênio nos tecidos é igual ou menor à 1%. A baixa concentração de oxigênio é frequentemente acompanhada pela diminuição excessiva da disponibilidade de nutrientes, fenômeno que estabelece uma pressão seletiva sobre as células tumorais. Deste modo, a hipóxia e a privação nutricional representam algumas das características do microambiente tumoral que influenciam comportamento celular, tornando o tumor biologicamente mais agressivo (SEMENZA, 2012). No microambiente hipóxico a ausência do oxigênio propicia a estabilização do Fator Induzível por Hipóxia – 1α (HIF- 1α), o qual estimula a expressão de genes pró-tumorais (GRAHAM; UNGER, 2018).

A ativação de HIF- 1α promove consequências metabólicas em diversas vias de sobrevivência e proliferação, e mais recentemente foi descoberta influência sobre a autofagia (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009; JAWHARI; VERDIER; DEATH, 2016). A autofagia é definida pela degradação de componentes intracelulares afim de promover a sobrevivência programada das células sob estresse metabólico. Este processo garante energia na forma de ATP e de blocos de construção monoméricos, tais como aminoácidos, lipídios, açúcares e nucleosídeos (GALLUZZI et al., 2017; KIMMELMAN; WHITE, 2017).

Níveis basais de autofagia ocorrem em todas as células normais, nas quais desempenha importante papel para o turnover de proteínas não marcadas para degradação em proteassoma. Por ser geralmente encontrada em células sob estresse ou em processo de morte, a autofagia é frequentemente considerada uma via de morte, entretanto sua contribuição para a manutenção

da homeostase celular é geralmente mais aceita (GALLUZZI et al., 2017; KIMMELMAN; WHITE, 2017).

Resultados prévios do grupo de pesquisa apontaram para uma possível associação entre a privação nutricional, o estabelecimento de perfil autofágico pelas linhagens de câncer pancreático e a expressão das galectinas -1 e -3 (SILVA-FILHO et al., 2017). Gal-1 e Gal-3, proteínas com afinidade por β -galactosídeos, tem sua expressão alterada em tecidos tumorais, inclusive naqueles que acometem o trato gastrointestinal. O papel destas galectinas está relacionado à diferenciação, apoptose e regulação da proliferação celular, e pode estar associado ao desenvolvimento e resistência do PDAC ao tratamento quimioterápico convencional.

A importância de Gal-1 e -3 para o desenvolvimento de respostas adaptativas do tumor pancreático, num microambiente mimético, torna-se cada vez mais evidente no contexto científico (SONG et al., 2014; BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017). Ao mesmo tempo, há a necessidade de se desenvolver novas medidas terapêuticas para o câncer pancreático. Esta demanda deve fomentar a realização de pesquisas que visam a compreensão dos mecanismos moleculares de adaptação do tumor, como a autofagia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a influência das galectinas -1 e -3 sobre processos autofágicos desencadeados no microambiente tumoral pancreático.

1.1.2 Objetivos Específicos

Estabelecer um modelo *in vitro* que mimetize com mais fidedignidade o microambiente tumoral do pâncreas;

Caracterizar o modelo bidimensional e tridimensional quanto a expressão de marcadores autofágicos;

Avaliar a influência exercida pela inibição de Gal-3 sobre a atividade autofágica característica em tumores de pâncreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTATÍSTICAS DO CÂNCER

O câncer é caracterizado por modificações moleculares significativas da maquinaria de proliferação, diferenciação e morte celular. As células transformadas malignamente tendem à formação de tumores hematológicos ou sólidos, sendo os últimos classificados de acordo com sua origem tecidual em sarcomas (mesenquimal) e carcinomas (epitelial) (INCA, 2019). Embora compartilhem algumas características em comum, a maioria dos casos de câncer diferem de acordo com sua origem, comportamento e suscetibilidade terapêutica, o que dificulta a busca por tratamentos de eficácia global (REN et al., 2019).

A complexidade e a quantidade de alterações genéticas determinam o desenvolvimento e a progressão tumoral, os quais podem ser influenciados pelo estilo de vida de cada indivíduo, incluindo dieta, tabagismo e realização de atividades físicas. Outros fatores de risco podem ser cruciais para o surgimento da doença e associados a cada tipo tumoral, como a gastrite por *Helicobacter pylori* para o câncer gástrico e a pancreatite crônica para o câncer pancreático (KIRKEGARD; MORTENSEN; CRONIN-FENTON, 2017; SMITH; NADELLA; OSBORNE, 2017).

A medida que as populações crescem, envelhecem e adquirem hábitos menos saudáveis, os números associados ao câncer aumentam significativamente (INCA, 2019). Segundo dados do GLOBOCAN (2018), estima-se que houveram 18,1 milhões de novos casos de câncer (17 milhões do tipo pele não-melanoma), 9,6 milhões de mortes por câncer e 42 milhões de pessoas que vivem com câncer (dentro de 5 anos de diagnóstico) em 2018 no mundo. Nos Estados Unidos, estima-se que houveram 1.735,350 novos casos e 609.640 mortes por câncer em 2018. A taxa de incidência de câncer é 20% maior nos homens do que nas mulheres, enquanto a taxa de mortalidade é 40% maior (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

A incidência e mortalidade provocadas pelo câncer aumentaram em todo o mundo nos últimos anos. Isto se deve, entre outros fatores, à prevalência e distribuição dos fatores de risco relacionados, especialmente aqueles de cunho socioeconômico (TORRE et al., 2015; BRAY et al., 2018). Estima-se que aproximadamente, metade dos diagnósticos e casos de morte por câncer ocorreram na Ásia, seguida da Europa (23,4% dos novos casos e 20,3% dos óbitos) e América (21% dos novos casos e 14,4% dos óbitos). Entretanto, as taxas de mortalidade na Ásia (57,3%) e África (7,3%) ainda superam as taxas de incidência (48,4% e 5,8%, respectivamente), ao contrário dos demais continentes (BRAY et al., 2018).

Mesmo diante de melhoramentos tecnológicos direcionados ao diagnóstico do câncer, a porcentagem de pacientes que alcançam 5 anos livres da doença varia de acordo com o órgão primário no qual o tumor se desenvolve e sua evolução (YANG; LIN, 2017). Por exemplo, enquanto mais de 90% pacientes diagnosticados com linfoma, câncer de testículo e melanoma, entre 2008 e 2014, apresentaram sobrevida livre de doença maior que 5 anos, apenas 9% daqueles diagnosticados com câncer pancreático atingiram este tempo de sobrevida (Fig. 1) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Ocupando o segundo lugar no ranking das causas de morte no país, o câncer representa um grande obstáculo para os serviços de saúde e para o orçamento destinado aos mesmos (INCA, 2019). A estimativa para o Brasil em 2019, aponta a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão aproximadamente 420 mil casos. O perfil epidemiológico observado assemelha-se à América Latina e Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres foram os mais frequentes. No Brasil os tipos mais frequentes em homens são próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, são os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) (INCA, 2019).

Há uma tendência de crescimento da incidência do câncer no país e a mesma acompanha a atual transição epidemiológica, com crescimento contínuo do número de casos a medida que a população envelhece. A análise da situação do câncer no Brasil mostra que a diferença no risco absoluto e na sobrevida por câncer existe entre as diversas regiões brasileiras. E o grande desafio reside na minimização das disparidades de incidência em todas as localidades e em todos os estratos sociais (CASTRO, 2007).

Tabela 1. Estimativa da Sobrevida Livre de Doença em 5 anos, por Raça nos Estados Unidos, 1975-2014. As taxas são ajustadas para a expectativa de vida normal e são baseadas em casos diagnosticados nas áreas do SEER 9 de 1975 a 1977, 1987 a 1989 e 2008 a 2014, todos seguidos até 2015. O erro padrão está entre 5 e 10 pontos percentuais.

	All races			White			Black		
	1975-77	1987-89	2008-14	1975-77	1987-89	2008-14	1975-77	1987-89	2008-14
All sites	49	55	69	50	57	70	39	43	63
Brain & other nervous system	23	29	35	22	28	33	25	32	41
Breast (female)	75	84	91	76	85	92	62	71	83
Colon & rectum	50	60	66	50	60	67	45	52	58
Colon	51	60	65	51	61	66	45	52	55
Rectum	48	58	69	48	59	69	44	52	66
Esophagus	5	9	21	6	11	22	4	7	13
Hodgkin lymphoma	72	79	88	72	80	89	70	72	86
Kidney & renal pelvis	50	57	75	50	57	75	49	55	77
Larynx	66	66	62	67	67	64	58	56	51
Leukemia	34	43	65	35	44	66	33	35	58
Liver & intrahepatic bile duct	3	5	19	3	6	18	2	3	15
Lung & bronchus	12	13	20	12	13	20	11	11	18
Melanoma of the skin	82	88	94	82	88	94	57†	79†	66†
Myeloma	25	27	52	24	27	52	29	30	54
Non-Hodgkin lymphoma	47	51	74	47	51	75	49	46	69
Oral cavity & pharynx	53	54	68	54	56	70	36	34	50
Ovary	36	38	48	35	38	47	42	34	39
Pancreas	3	4	9	3	3	9	2	6	9
Prostate	68	83	99	69	84	99	61	71	97
Stomach	15	20	32	14	18	31	16	19	33
Testis	83	95	97	83	96	97	73†‡	88†	92
Thyroid	92	94	98	92	94	99	90	92	97
Urinary bladder	72	79	78	73	80	79	50	63	64
Uterine cervix	69	70	69	70	73	71	65	57	57
Uterine corpus	87	82	83	88	84	85	60	57	63

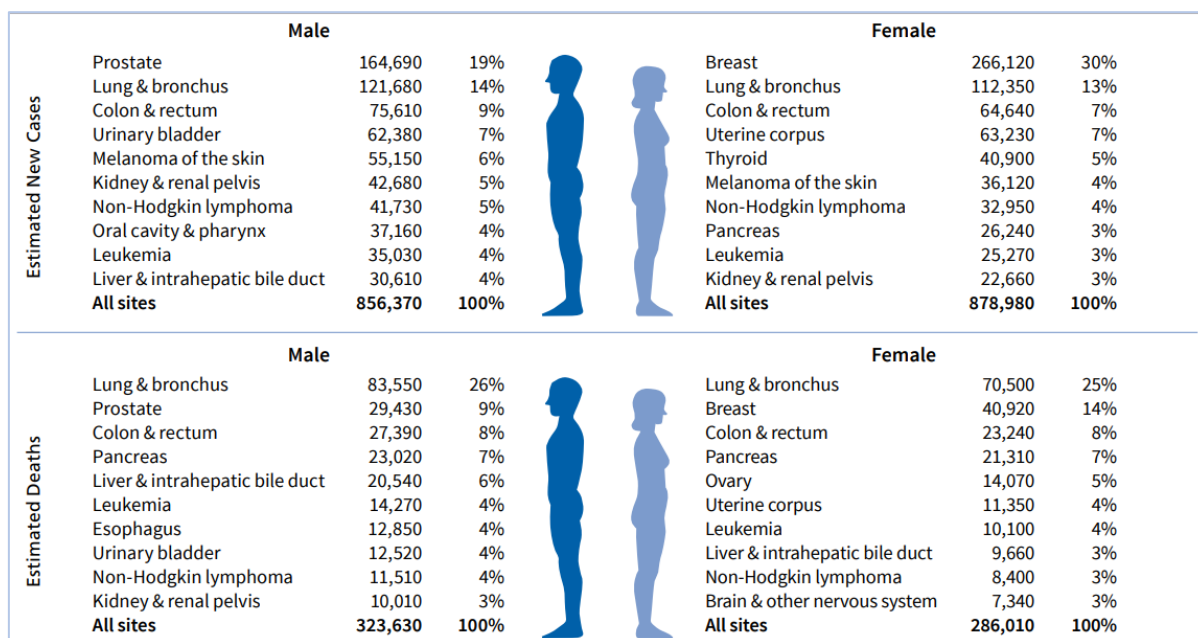
Fonte: American Cancer Society, 2019.

2.2 CÂNCER DE PÂNCREAS

2.2.1 Epidemiologia

O PDAC representa uma das formas mais agressivas de câncer a acometer a população mundial (ILIC; ILIC, 2016). Sua incidência varia entre regiões e populações. Em 2018, 458 mil novos casos de câncer pancreático foram registrados em todo o mundo, representando 2,5% de todos os casos e representando a 12º forma mais comum de câncer. O PDAC causou a morte de aproximadamente 432 mil indivíduos e ocupando a 7º posição no ranking de mortes por câncer em ambos os sexos (GLOBOCAN, 2019). A estimativa de casos de sobrevida maior que 5 anos é menor do que 5% devido ao diagnóstico tardio. As taxas de mortalidade são correlacionadas positivamente com a idade, pois 90% dos casos são diagnosticados a partir dos 55 anos, e a doença é ligeiramente mais comum em homens do que em mulheres (Figura 1) (BOSETTI et al., 2012; MCGUIGAN et al., 2018).

Figura 1. Principais Sítios de Novos casos e Mortes por Câncer. As estimativas foram arredondadas para os 10 casos mais incidentes/de maior mortalidade. Os casos excluem os cânceres basocelulares e de células escamosas e o carcinoma in situ, exceto a bexiga urinária. O ranking é baseado em projeções modeladas e podem diferir dos dados observados mais recentes.

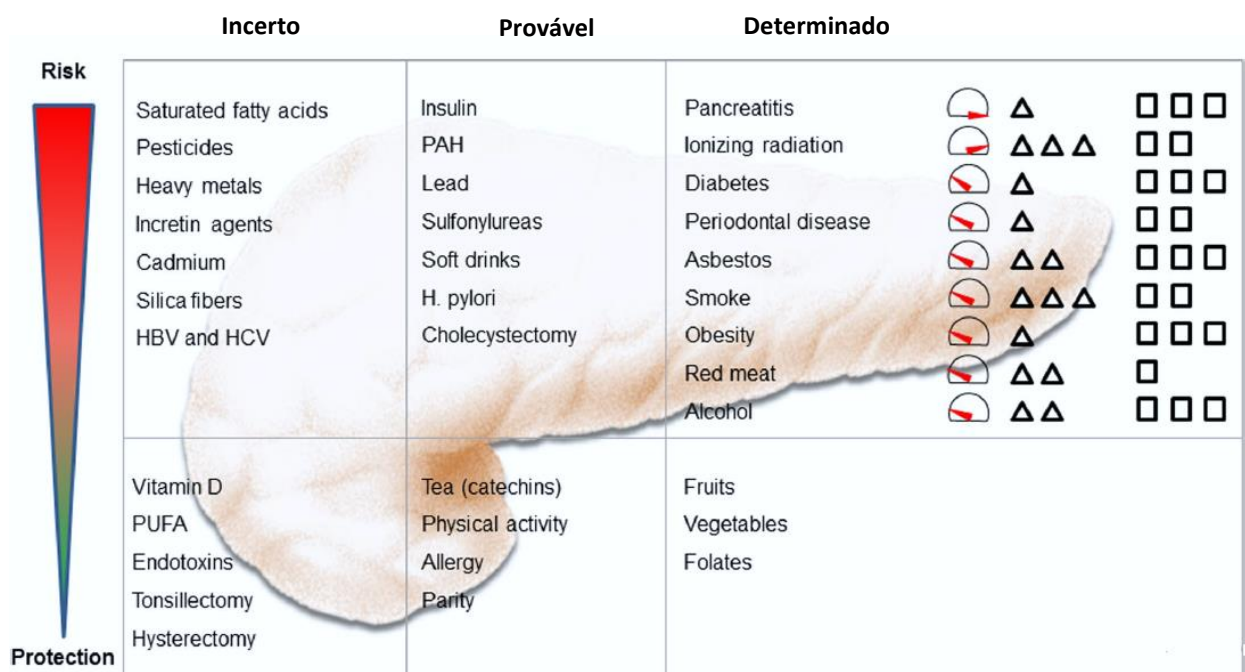


Fonte: American Cancer Society, 2019.

Os fatores de risco que influenciam a incidência do PDAC ao longo do mundo incluem fatores modificáveis e não modificáveis. Fatores modificáveis incluem: tabagismo, etilismo, obesidade, fatores dietéticos e exposição a substâncias tóxicas. Fatores não modificáveis incluem: sexo, idade, etnia, diabetes mellitus, histórico familiar de câncer pancreático, fatores genéticos, infecções crônicas, grupo sanguíneo não-O e pancreatite crônica. (Figura 2) (BARONE et al., 2016).

Mais de mil milhões de pessoas praticam o fumo em todo o mundo e este representa o fator ambiental mais importante para o câncer de pâncreas. Em estudo desenvolvido no Reino Unido (2011), foi observado que aproximadamente 29% dos casos de PDAC estavam associados à prática do fumo (COLEMAN et al., 2011). O risco do acometimento por câncer de pâncreas aumenta de acordo com o tempo de fumo e quantidade de cigarros fumados diariamente. Este risco é 1.8 maior para fumantes e 1.2 para ex-fumantes em comparação à indivíduos que nunca fumaram (LUGO et al., 2018).

Figura 2. Avaliação dos Fatores de Risco para o Desenvolvimento de PDAC. Estratificação dos fatores de risco de acordo com a significância dos resultados encontrados nos estudos analisados. Os fatores estão organizados em incerto, provável e determinado. Os medidores indicam as chances de desenvolvimento da doença em relação ao fator associado, e as formas geométricas apontam o nível de influência deste fator na iniciação (triângulo) e promoção (quadrado) do câncer pancreático.



Fonte: Barone, 2016.

Outro importante fator para o desenvolvimento de PDAC câncer pancreático é a obesidade. A obesidade é frequentemente associada a doenças cardiovasculares e diabetes, mas ainda pode causar outras complicações gastrointestinais (ILIC; ILIC, 2016). Meta-análises vem demonstrando a relação entre o IMC ou a obesidade e a incidência de adenocarcinoma pancreático. De acordo com estudo da American Cancer Society o risco de incidência por PDAC entre indivíduos homens e mulheres obesos em comparação com aqueles de corpo de massa normal foi de $RR=2.08$ (CALLE et al., 2003). Em meta-análise de 2011, Parkin e colaboradores comprovam que 12% dos casos de PDAC analisados possuem relação com elevado índice de massa corpórea (PARKIN; BOYD; WALKER, 2011). Além disso, foi observado que a inatividade física pode contribuir para o desenvolvimento da neoplasia (JIAO et al., 2010; AUNE et al., 2012).

A influência do consumo de determinados alimentos para o desenvolvimento de PDAC tem sido constante alvo de pesquisas científicas, as quais exibem resultados contraditórios (ILIC; ILIC, 2016). No que se refere ao consumo de carne vermelha ou processada, estudos desenvolvidos na Europa com 685 casos e na China com 323 não demonstraram correlação entre o consumo deste alimento e o desenvolvimento do tumor (ROHRMANN et al., 2013; LIU et al., 2014). Outros trabalhos apresentam que a associação é sexo específica, havendo relação para homens, porém não para mulheres. Contudo, um número maior de estudos indica o aumento do risco de câncer pancreático em aproximadamente duas vezes caso haja o consumo de carne vermelha (STOLZENBERG-SOLOMON et al., 2007; LIGHTSEY, 2012; PALUSZKIEWICZ et al., 2012; DI MASO et al., 2013). É possível que carcinógenos na carne e compostos nitrogenados, que são usados como conservantes, estejam envolvidos no aumento do risco para o câncer de pâncreas (BEANEY et al., 2017).

Aproximadamente, o dobro do risco para o desenvolvimento do câncer pancreático é observado nos casos associados à diabetes mellitus tipo I e II. Diabetes mellitus está presente em 50 a 80% dos pacientes portadores de PDAC e também pode representar um sinal da doença (STEVENS; RODDAM; BERAL, 2007; BATABYAL et al., 2014; HAUGVIK et al., 2015). O risco de PDAC pode chegar a seis vezes no primeiro ano após o diagnóstico e diminui com o passar dos anos a partir do momento do diagnóstico, entretanto 30% dos pacientes ainda podem desenvolver o tumor dentro de duas décadas (BATABYAL et al., 2014; BOSETTI et al., 2014). Mesmo em casos onde não há diabetes, é relatado resistência à insulina devido à síndrome paraneoplásica ou disfunção das células beta pancreáticas e ainda metabolismo de glicose anormal (SAH et al., 2013). Estes fatores podem explicar a associação entre as doenças, contudo os mecanismos moleculares envolvidos ainda são pouco compreendidos.

Diversas síndromes hereditárias podem estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão do câncer pancreático. Aproximadamente, 10% da incidência do tumor de pâncreas deve-se a transmissão familiar de genes mutados ou alterados (SCHNEIDER et al., 2011). As desordens associadas ao PDAC incluem mola-melanoma múltiplo atípico familiar, síndrome de Peutz-Jeghers, pancreatite hereditária, carcinoma colorretal hereditário não-poliposo, câncer de mama e ovário hereditários, fibrose cística, ataxia telangiectasia e polipose adenomatosa familiar (RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019). Indivíduos com mutações ou deleção dos genes PRSS1, K-ras, p16, p53 e BRCA2 possuem maior risco de PDAC (LAL et al., 2000; NGAMRUENGPHONG; CANTO, 2016). Como apresentado por Klein e colaboradores, o risco por PDAC devido à histórico familiar da doença em si aumenta com o número de parentes portadores. Indivíduos com dois parentes de primeiro grau com PDAC possuem 6 vezes mais chances de desenvolverem o tumor, enquanto aqueles com três ou mais detêm 14 à 32 vezes (KLEIN, 2013).

A associação entre o câncer de pâncreas e pancreatite, especialmente crônica ou recorrente, é reconhecida na literatura desde o início da segunda metade do século XX (CAMARA et al., 2016). Aproximadamente 4% dos pacientes com pancreatite crônica desenvolvem PDAC e 1,34% dos casos de PDAC podem ser atribuídos à pancreatite crônica (MALKA et al., 2002; DUELL et al., 2012)

Outros fatores associados ao PDAC incluem o uso de aspirina, infecções e exposição ocupacional a determinados pesticidas (ILIC; ILIC, 2016; RAWLA; SUNKARA; GADUPUTI, 2019).

2.2.2 Perfil Clínico-patológico do Tumor Pancreático

O adenocarcinoma ductal invasivo de pâncreas é a forma mais comum de câncer neste órgão, correspondendo a aproximadamente 85% dos casos, e por isso é frequentemente tido como sinônimo de câncer pancreático (AGRAWAL, 2017). Apesar de agrupados com a mesma denominação (câncer de pâncreas), o PDAC difere dos demais tipos, como o acinar e o endócrino (Tabela 2) (ADSAY et al., 2005).

Os PDACs são caracterizados pela comum formação glandular e manutenção da diferenciação celular. Entretanto, suas células são propensas à infiltração e rápida disseminação tecidual (KLOPPEL; LUTTGES, 2004). Tais capacidades são refletidas em dores nas costas, um dos sinais mais comuns da doença, já em estágio avançado, causadas pelo neurotropismo característico. Entre os fatores determinantes do prognóstico desfavorável, encontram-se o comportamento biológico das células tumorais e o microambiente tumoral rico em hormônios secretados pelas ilhotas de Langerhans (ADSAY et al., 2005).

No momento do diagnóstico, é comum que o PDAC já tenha ultrapassado o parênquima pancreático e atingido sítios externos ao pâncreas, como fígado e peritônio, não sendo mais passível de ressecção cirúrgica (BORTESI et al., 2011). Outros fatores também são determinantes para a irresssecabilidade do tumor, como o acometimento linfonodal excessivo, o envolvimento de vasos principais, e o estado clínico do paciente. O seu estadiamento neste contexto é frequentemente T3N1M1, onde o T3 indica que o tumor atingiu um tamanho crítico, mas ainda não atingiu vasos e nervos. N1 afirma que há linfonodos próximos acometidos pelo tumor, um indício de agressividade. Já M1 indica que o tumor atingiu outros órgãos (LUCHINI; CAPELLI; SCARPA, 2016).

O PDAC é mais frequente (60 a 70%) na cabeça do pâncreas e estruturas próximas, especialmente o ducto biliar comum (BOSMAN et al., 2010; HRUBAN; KLIMSTRA, 2014). A invasão do ducto biliar comum e do ducto pancreático produz estenose que resulta em dilatação proximal de ambos os sistemas ductais. Esta proximidade/similaridade impossibilita a distinção entre o PDAC e tumores que afetam o ducto biliar comum, podendo ser chamado de adenocarcinoma pancreaticobiliar. Ao mesmo tempo, as células pancreáticas podem invadir e ulcerar o duodeno ou ampola duodenal, impossibilitando a distinção com tumores próprios do órgão (ADSAY et al., 2005).

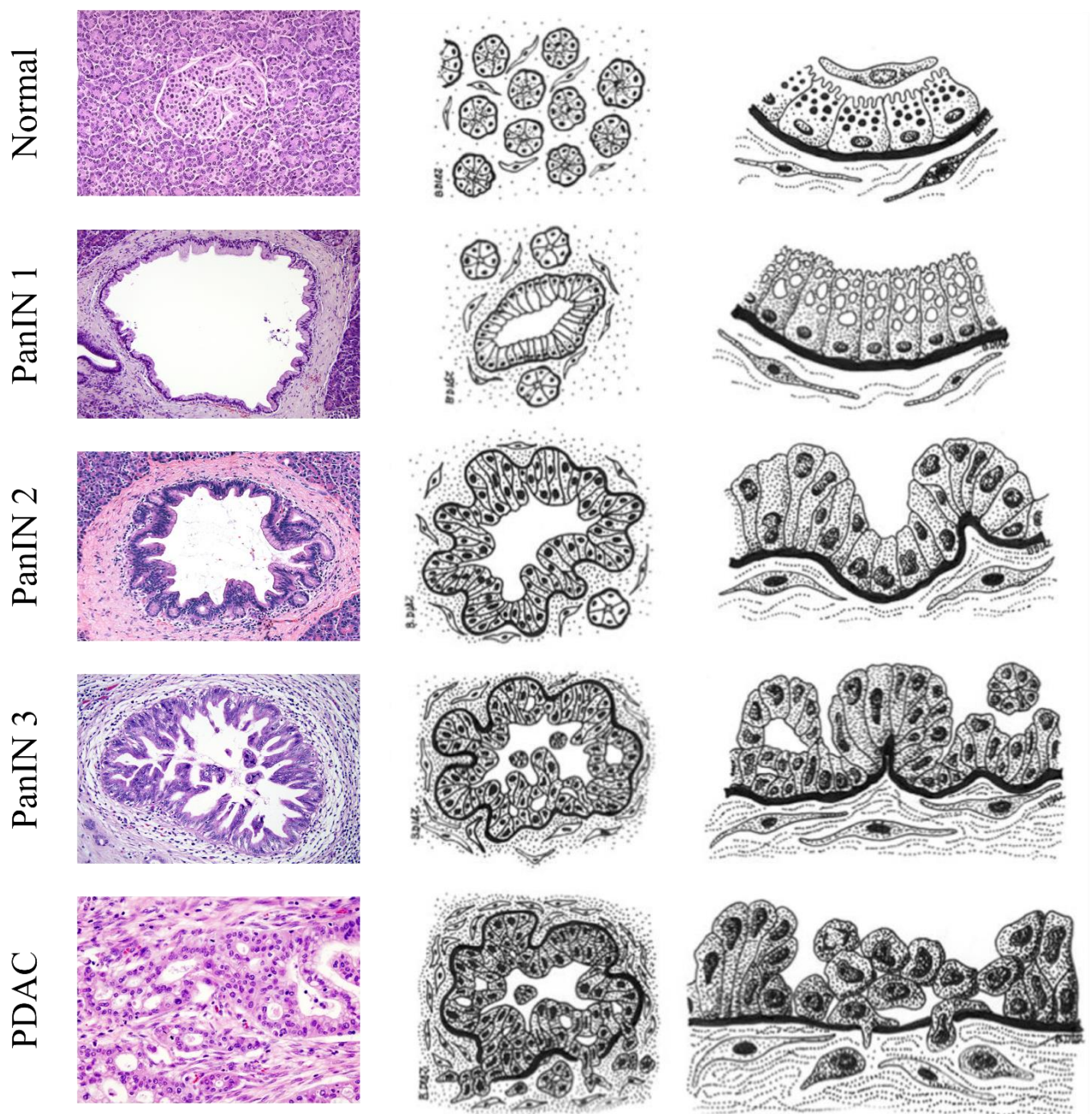
Microscopicamente, não há diferença entre os carcinomas da cabeça, corpo e cauda do pâncreas (KUMAR; ASTER; ABBAS, 2015). A aparência é normalmente de um adenocarcinoma pouco a moderadamente diferenciado, formando estruturas tubulares ou

aglomerados, demonstrando um padrão de desenvolvimento agressivo e profundamente invasivo (KOSMAHL et al., 2005). A invasão linfática e de grandes vasos é comumente observada, e algumas vezes podem haver áreas microcísticas, principalmente em tumores maiores (HRUBAN; KLIMSTRA, 2014).

O câncer pancreático geralmente se desenvolve na forma de esferas sólidas bem definidas, com acometimento do peritônio visceral (carcinomatose intra-abdominal) e formação multinodular (HRUBAN; KLIMSTRA, 2014). O excessivo componente desmoplásico está presente dificultando o diagnóstico histológico. Isto acontece por que a amostra possui uma porcentagem celular representativa muito pequena em relação ao tecido em análise. A extensa desmoplasia pode estar acompanhada de um aspecto esclerótico impedindo a distinção da fibrose causada por pancreatite crônica tanto por radiografia quanto cirurgicamente (FERDEK; JAKUBOWSKA, 2017).

Os ductos, local de origem da maioria das neoplasias pancreáticas, constituem o componente de menor complexidade do pâncreas (BROSENS et al., 2015). Evidências científicas apontam para o desenvolvimento do PDAC a partir de uma lesão intraductal proliferativa. Segundo alguns estudos, esta lesão sofreria inúmeros rearranjos moleculares devido ao acúmulo de mutações e precederia o adenocarcinoma pancreático. Anteriormente classificada como hiperplasia ou displasia, este possível estágio neoplásico passou a ser denominado como PanIN com base em critérios morfológicos por um grupo especializado de pesquisadores (YAMAGUCHI et al., 2017). De acordo com as características cito e histológicas, as lesões PanIN podem ser subgrupadas. Aquelas que possuem um componente mucinoso metaplásico são denominadas lesão ductal em PanIN-1A/mucinoso, e ainda compartilham as algumas características moleculares iniciais da carcinogênese. Algumas possuem pouca ou nenhuma atipia histológica, porém mostram algumas dobras de mucosa, estas são classificadas como PanIN 1B. As lesões são definidas como PanIN 2 quando há algum grau de atipia citológica e substancial estratificação celular e PanIN 3 quando há formações papilares irregulares, atipia citológica, mitoses, necrose e perda polaridade das células (Figura 3) (ADSAY et al., 2005).

Figura 3. Diagrama da Histologia de Lesões Precursoras e PDAC. O modelo de progressão do pâncreas exócrino normal para o PDAC é descrito como diagramas de secções de tecido reais e representativas (coluna da esquerda e central) e as suas ampliações correspondentes (coluna da direita). O pâncreas exócrino normal é formado por ácinos pancreáticos cercados por tecido estromal contendo fibroblastos e células estreladas pancreáticas. Lesões de PANIN são caracterizadas por um epitélio colunar parecido com o epitélio ductal. As lesões de PanIN-2 são caracterizadas por hiperplasia (proliferação celular excessiva), que leva a protrusões papilares no lúmen. O PanIN-3 é a lesão precursora mais avançada e apresenta extensa hiperplasia com protrusões papilares no lúmen, perda de polaridade epitelial e núcleos de formato anormal que se acumulam. No PDAC, as células tornam-se mesenquimais e invasivas, atravessam a membrana basal e migram através do estroma. A integridade da membrana basal é a principal característica histológica que diferencia o PanIN-3 e o PDAC.



Fonte: modificado de Cornish et al, 2011 e Yuen and Diaz, 2014.

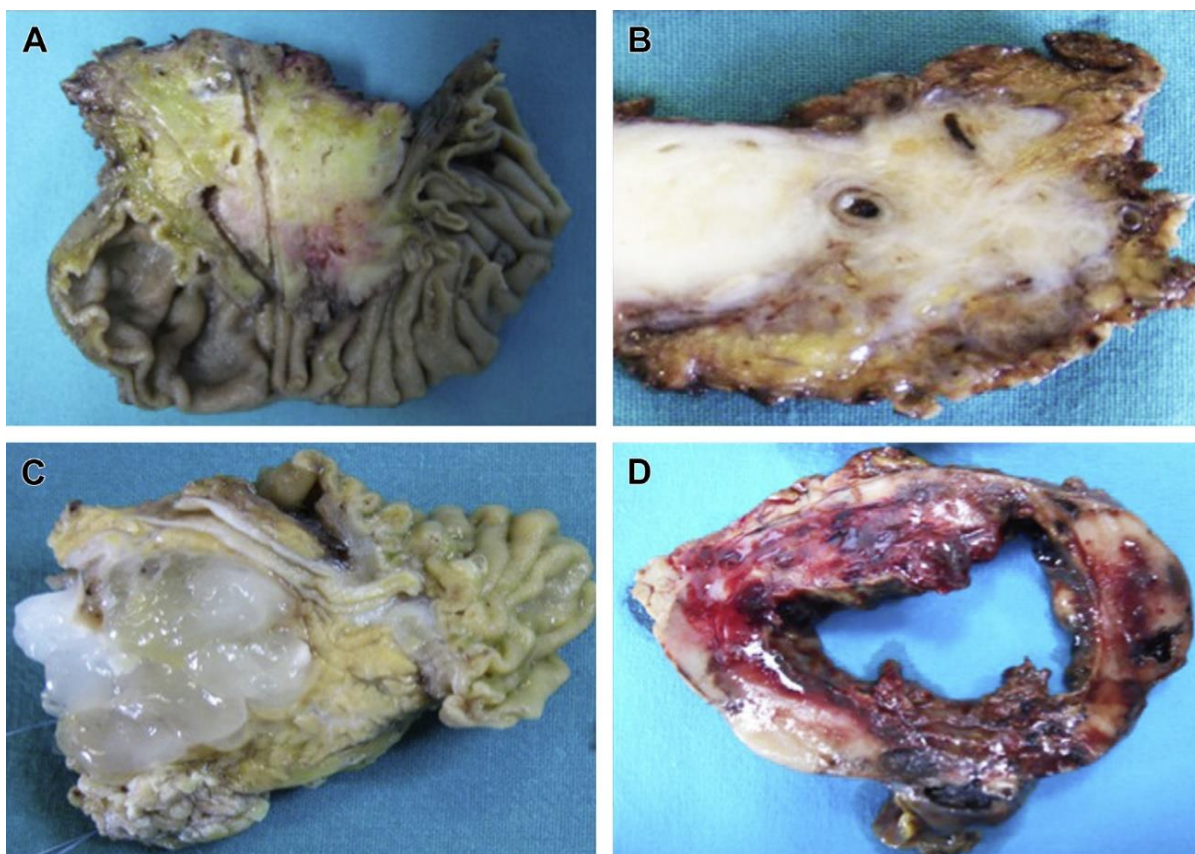
Além das lesões que podem precede-lo, o câncer de pâncreas também possui variações cito e histológicas que permitem a distinção de outras formas variantes (Tabela 2). Entre estes se encontram o carcinoma adenoescamoso, carcinoma coloide, carcinoma indiferenciado ou anaplásico e o carcinoma medular. Outras formas apresentam características mistas com numerosos focos necróticos (Figura 4 e 5) (LUCHINI; CAPELLI; SCARPA, 2016).

Tabela 2. Classificação Histológica das Neoplasia Exócrinas do Pâncreas.

Serous neoplasms
• Serous cystadenoma
--Microcystic serous cystadenoma
--Macrocystic serous cystadenoma
• Solid serous adenoma
• Von Hippel–Lindau syndrome-associated serous cystic neoplasm
• Serous cystadenocarcinoma
Mucinous cystic neoplasms
• Mucinous cystic neoplasm
• Mucinous cystic neoplasm with an associated invasive carcinoma
Intraductal neoplasms
• Intraductal papillary mucinous neoplasm
-- Intraductal papillary mucinous neoplasm
-- Intraductal papillary mucinous neoplasm with an associated invasive carcinoma
• Intraductal oncocytic neoplasms
-- Intraductal oncocytic neoplasm
-- Intraductal oncocytic neoplasm with an associated invasive carcinoma
• Intraductal tubular neoplasms
-- Intraductal tubulopapillary neoplasm
-- Intraductal tubulopapillary neoplasm with an associated invasive carcinoma
Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN)
Invasive carcinomas of ductal type
• Ductal (tubular) adenocarcinoma
• Adenosquamous carcinoma
• Colloid (mucinous non-cystic) adenocarcinoma
• Hepatoid carcinoma
• Medullary carcinoma
• Signet ring cell carcinoma
• Undifferentiated carcinoma
• Undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells
Acinar cell neoplasms
• Acinar cell carcinoma
• Acinar cell cystadenocarcinoma
• Mixed acinar carcinomas

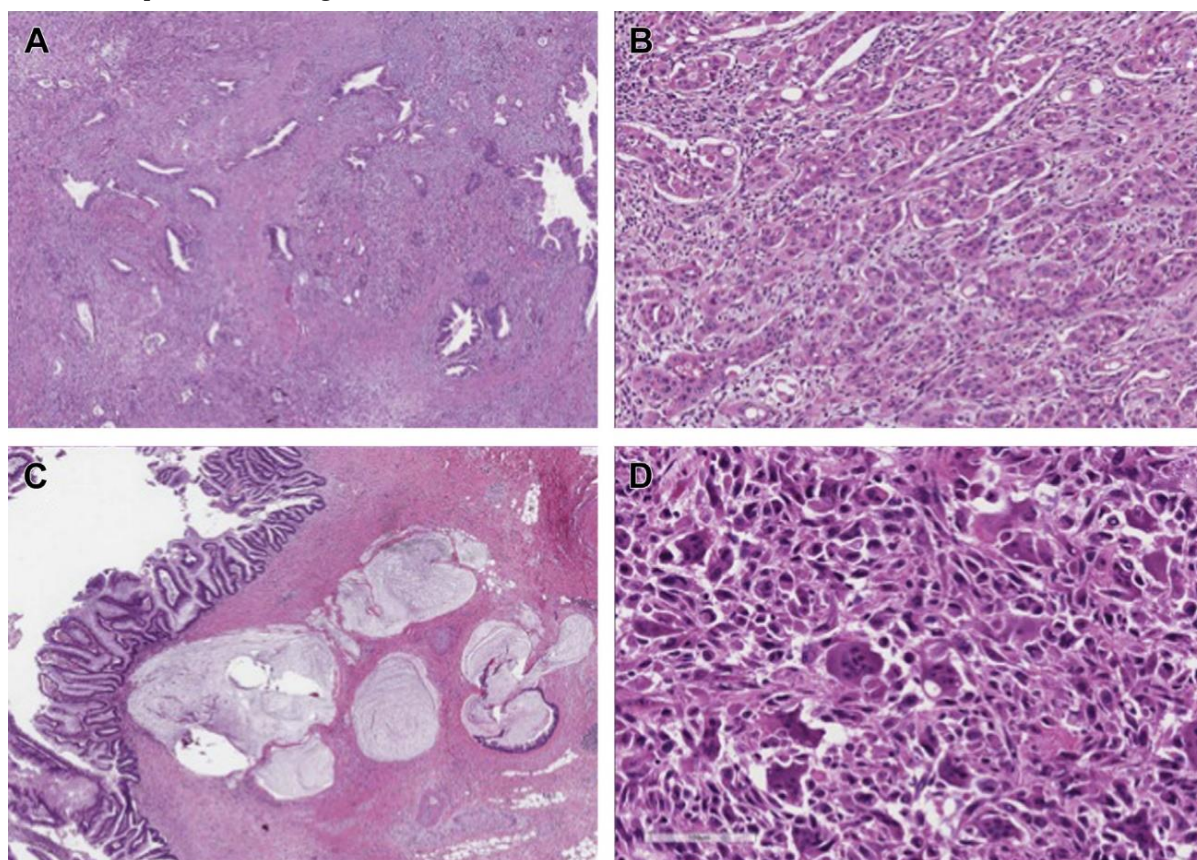
Fonte: Collisson et al, 2019.

Figura 4. Cortes macroscópicos de PDAC e suas variantes. O adenocarcinoma pancreático convencional é geralmente representado por massas firmes, duras, escleróticas e mal definidas, que substituem a arquitetura lobular normal da glândula. A superfície de corte geralmente é esbranquiçada. A) Neste caso, um adenocarcinoma de cabeça de pâncreas invade o ducto biliar comum e o ducto de pancreático principal. B) A variante adenoescamosa é geralmente composta por uma firme massa multinodular acinzentada, muitas vezes com tamanho maior que o convencional no momento do diagnóstico. C) O carcinoma coloide pode ser distinguido por grandes grupos de mucina, geralmente decorrentes de associação com neoplasia papilar mucinosa intraductal do tipo intestinal (NPMI). D) O carcinoma indiferenciado ou anaplásico é maior que o adenocarcinoma convencional, mas possui características macroscópicas muito semelhantes.



Fonte: Luchini, 2016.

Figura 5. Cortes microscópicos de PDAC e suas variantes. A) A maioria das lesões de PDAC é composta de estruturas ductais e glandulares, bem ou moderadamente desenvolvidas, que invadem o parênquima pancreático adjacente. Nesta imagem está presente o típico padrão de crescimento aleatório, bem como reação estromal desmoplásica excessiva. B) Pelo menos 30% do carcinoma adenoescamoso é composto por componente escamoso e ductal bem diferenciados. Esta imagem apresenta a diferenciação escamosa evidente. C) O carcinoma coloidal é caracterizado pela presença de grandes conjuntos de mucina estromal com células neoplásicas suspensas em pelo menos 80% da neoplasia. Nesta imagem, pode ser visualizada a associação típica com o NPMI do tipo intestinal. D) O carcinoma indiferenciado não exibe diferenciação definitiva; A variante carcinoma indiferenciado com células gigantes do tipo osteoclasto (UCOCGC) é composta por 2 tipos celulares: células do fuso e pleomórficas, as reais células neoplásicas, e células gigantes do tipo osteoclasto, que podem ter mais de 20 núcleos cada, porém sem um comportamento maligno. Aumentos A – 4x, B – 10x, C – 2x, D – 20x.



Fonte: Luchini, 2016.

Apesar de importante para a compreensão da morfologia do PDAC, a classificação histológica deste tumor não possui relação direta com o método terapêutico utilizado. Afinal, há poucas opções de tratamento químico, com efetividade, para a doença. Diante deste contexto, classificações baseadas em aspectos moleculares, como expressão de marcadores genéticos específicos, padrões de alterações genômicas e expressão de fatores de transcrição, estão sendo propostas (COLLISSON et al., 2019).

2.2.3 Correntes Avanços Terapêuticos

O período médio de sobrevida para a maioria dos casos de PDAC é de 20-22 meses e apenas 5% dos pacientes possuem tumores ressecáveis. A taxa de pacientes que apresentam sobrevida livre de doença por 5 anos é de 10% no grupo de pacientes passíveis de cirurgia e 25% para aqueles que realizam a combinação com a quimioterapia (WANEBO et al., 2000; RAUFI et al., 2019).

De um modo geral, o tumor é definido como não ressecável quando há envolvimento das veias porta e mesentéricas superiores e infiltração na base da artéria mesentérica celiaca ou superior (TEWARI, 2016).

A primeira droga a apresentar resultados contra o PDAC foi Fluorouracil (5-FU), um inibidor irreversível da timidilato sintase, utilizado como terapia de primeira linha para tumores ressecáveis e não ressecáveis até a metade da década de 90 (ROTHENBERG et al., 1996; GUPTA; AMANAM; CHUNG, 2017). Contudo, a realização de testes posteriores inviabilizou o 5-FU como única opção terapêutica devido à alta toxicidade e ausência de responsividade. Em estudo publicado na *Journal of Clinical Oncology*, DeCaprio e colaboradores (1991) obtiveram resposta terapêutica efetiva em apenas 7% dos 42 pacientes tratados 5-FU e leucovorina. Leucovorina é uma forma reduzida de ácido fólico que melhora a eficácia do 5-FU através da estabilização do complexo fluorouracil-TS (DECAPRIO et al., 1991). Diversos estudos já foram desenvolvidos com base na combinação de 5-FU com outros terápicas, como citoxano, metotrexato, vincristina ou mitomicina C porém, com exceção do FOLFIRINOX, nenhuma destas mostrou resultados significativos quando comparados à monoterapia com 5-FU (TEAGUE; LIM; WANG-GILLAM, 2015).

O primeiro fármaco a apresentar resultados melhores que o 5-FU foi a gemcitabina, que assim como outros análogos de pirimidina (5-FU e capecitabine), promove a substituição da citidina durante a replicação do DNA, induzindo o processo apoptótico (LAU; CHEUNG, 2017). Em estudo randômico realizado com 126 pacientes diagnosticados com câncer pancreático avançado, os autores observaram resposta clínica benéfica em 24% dos pacientes que receberam gemcitabina, enquanto apenas 5% daqueles que foram tratados com 5-FU mostraram alguma melhora. A média do tempo de sobrevivência e a porcentagem de pacientes vivos em 12 meses foram de 5.65 meses e 18% para pacientes tratados com gemcitabina, respectivamente, e 4.41 meses e 2% para os tratados com 5-FU (PROST; YCHOU; AZRIA, 2002).

Diante dos avanços clínicos obtidos com o uso da gemcitabina, a FDA (Food and Drug Administration) decidiu que este medicamento passaria a ser a monoterapia de primeira linha para o tratamento do câncer pancreático avançado. Entretanto, estudos posteriores mostraram resultados controversos quanto ao uso da gemcitabina, levantando a discussão a respeito da efetiva melhora clínica dos pacientes em termos de qualidade global de vida e sobrevivência, quando em comparação ao 5-FU (GUPTA; AMANAM; CHUNG, 2017).

Desde 1997 gemcitabina vem sendo combinada com outros quimioterápicos, como 5-FU, cisplatina, docetaxel, oxaliplatin e irinotecan, com a finalidade de se alcançar uma resposta terapêutica mais eficaz (LEE; PARK, 2016). Embora os resultados encontrados nos primeiros estágios dos estudos tenham sido encorajadores, testes clínicos de terceira fase não trouxeram benefícios significativos quanto à sobrevida dos pacientes para a maioria dos medicamentos testados (BERLIN et al., 2002; LI et al., 2014). Todavia, um estudo de terceira fase com 569 pacientes conduzido pelo Instituto Nacional do Câncer para Ensaios Clínicos no Canadá provou os benefícios da monoterapia com erlotinib em comparação à gemcitabina. O tratamento com erlotinib promoveu aumento da sobrevida global (6,24 vs 5,91 meses), um ano de sobrevida (23% vs 18%) e sobrevida livre de progressão (WANG et al., 2016). Wang e colaboradores (2016) realizaram meta-análise para explorar a eficácia e segurança da combinação de gemcitabina com erlotinib em pacientes com câncer de pâncreas avançado. Foram incluídos 24 estudos com 1.742 doentes diagnosticados e tratados simultaneamente com gemcitabina e erlotinib. E apesar dos resultados favoráveis ao uso da terapia combinada, alguns efeitos adversos foram identificados, como erupções cutâneas, reações gastrointestinais e hematológicas (WANG et al., 2016).

Outro quimioterápico sendo testado para o tratamento do PDAC com resultados benéficos é nab-paclitaxel. Nab-paclitaxel é uma combinação do fármaco paclitaxel e a proteína albumina inseridos em nanopartículas. O paclitaxel representa um membro do grupo dos taxanos, o qual impede a conclusão da mitose através da desconfiguração do fuso mitótico (MOLE-BAJER; BAJER, 1983; BORAZANCI; VON HOFF, 2014). Ao participar do IMPACT (Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma Clinical Trial) Von Hoff et al (2013) submeteu 861 pacientes diagnosticados com PDAC ao tratamento randômico simultâneo de gemcitabina com paclitaxel ou apenas gemcitabina. O tratamento com o fármaco provocou um aumento significativo da sobrevida global (8,1 vs 6,7), a droga apresentou um perfil de toxicidade previsível, sustentável e semelhante ao FOLFIRINOX (VON HOFF et al., 2013). Em abril de 2017 o nab-paclitaxel foi aprovado pela Anvisa para tratamento do PDAC no Brasil.

FOLFIRINOX (uma combinação de ácido fólico, fluorouracila infusional, leucovorina, irinotecano e oxaliplatina) foi introduzida na prática clínica em 2010 devido os resultados do ensaio de fase II/III (PRODIGE 4/ACCORD 11) comparando FOLFIRINOX com agente único de gemcitabina como primeiro tratamento de linha para pacientes com PDAC metastático. A sobrevivência global média, a sobrevida livre de doença e as taxas de resposta objetiva foram superiores com FOLFIRINOX em relação à gemcitabina e melhoramento da qualidade de vida. Contudo, FOLFIRINOX também foi associado a aumento da toxicidade, principalmente neutropenia febril e diarreia (SUKER et al., 2016; KLAIBER et al., 2018).

O quadro terapêutico do câncer pancreático ainda é deficiente em múltiplos aspectos, havendo a necessidade por tratamentos individualizados que considerem as características do microambiente tumoral do pâncreas.

2.3 COMPREENDENDO O MICROAMBIENTE TUMORAL PANCREÁTICO

2.3.1 Matriz Extracelular e Desmoplasia

Nos últimos anos, avanços terapêuticos têm sido relatados para diversos tipos de câncer como melanoma, pulmão e colorretal, porém como visto no tópico anterior, tais avanços não são tão expressivos no contexto do câncer pancreático, o qual se mantém como uma doença letal. A falha das terapias alvo-específicas mais convencionais em promover um melhoramento nas respostas frente ao tratamento do câncer se mantém como uma questão para os oncologistas (YAUCH; SETTLEMAN, 2012; GUPTA; AMANAM; CHUNG, 2017). Este desafio pode ser explicado em parte pelas diversas influências exercidas pelo microambiente sobre as células neoplásicas (LIU; LIAO; ZHAO, 2017).

Existe relevante discrepância entre os resultados obtidos durante os testes pré-clínicos e os testes em pacientes portadores de PDAC. Revelando que os mecanismos subjacentes da comunicação microambiente-célula tumoral devem ser estudados e ainda permanecem obscuros devido à natureza heterogênea do estroma tumoral (LIU; LIAO; ZHAO, 2017).

O estroma do câncer pancreático é uma complexa estrutura formada por componentes celulares e acelulares, tais como: fibroblastos, miofibroblastos, células estreladas do pâncreas, células do sistema imune, vasos sanguíneos, e proteínas solúveis, incluindo citocinas e fatores de crescimento, sendo a matriz extracelular (MEC) o componente mais abundante (FEIG et al., 2012). Os componentes da MEC incluem colágeno, fibronectina, proteoglicanos, ácido hialurônico, assim como enzimas catalíticas e proteinases. De modo geral, a heterogeneidade do estroma deste tumor é dinâmica, havendo modificações do perfil molecular de acordo com a progressão da lesão (NEESSE et al., 2011; WEHR et al., 2011).

A produção do estroma é promovida pela ativação de múltiplas vias de sinalização nas células neoplásicas, das quais participam diversos fatores de crescimento incluindo o fator de transformação do crescimento β (TGF β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF/Met), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Estas cascatas de sinalização mediadas por receptor levam à secreção dos componentes da MEC citados anteriormente (AZMI, 2012).

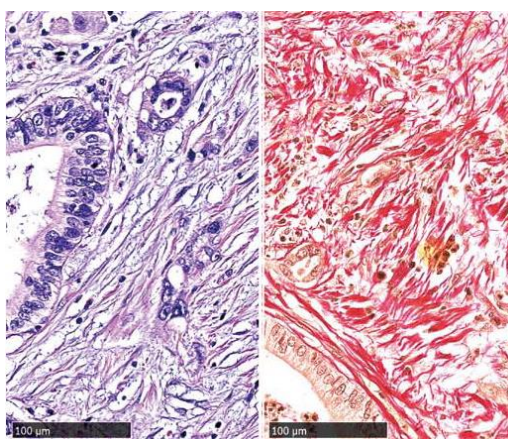
Outra via de sinalização envolvida na produção de MEC é a cascata “sonic hedgehog” (SHH). Proteínas da via SHH são capazes de se ligar a receptores Patched 1, o que provoca a inibição parcial da proteína transmembrana Smoothened (SMO), resultando na ativação da família Gli de fatores de transcrição e produção de MEC (TIAN et al., 2009). A via SHH é

super expressa nas células neoplásicas de tumores pancreáticos humanos enquanto que a sinalização a jusante é confinada ao compartimento estromal, formando um eixo de sinalização parácrina de células neoplásicas para estromais (FEIG et al., 2012).

A excessiva produção de MEC no câncer é denominada desmoplasia, fenômeno que provoca a distorção da arquitetura tecidual. As células estreladas do pâncreas têm sido vistas como células mesenquimais essenciais para a progressão do PDAC e atuantes na regulação desmoplásica (ANSARI et al., 2017; PANG; WILSON; APTE, 2017). Normalmente localizadas entre o ácino das glândulas pancreáticas e o endotélio vascular, estas células transitam entre dois estágios metabólicos distintos, os estágios quiescente e ativado. Quando em quiescência, as células estreladas do pâncreas armazenam vitamina A e são caracterizadas pela presença de desmina e proteína ácida fibrilar glial. Após ativação, estas células apresentam fenótipo semelhante a miofibroblastos e secretam quantidades excessivas de colágeno I, III, fibronectina e enzimas de remodelamento da matriz, tais como metaloproteinases (Figura 6) (OMARY et al., 2007; FEIG et al., 2012).

A desmoplasia provoca a modificação da configuração vascular, distorcendo e comprimindo os vasos a ponto de reduzir a perfusão e consequentemente impedindo a distribuição dos fármacos (MPEKRIS et al., 2017). Alguns estudos têm provado que a redução do componente estromal pode promover o melhoramento da resposta à quimioterapia convencional (CHAUHAN et al., 2013; MURPHY et al., 2017; POLYDOROU et al., 2017). A inibição farmacológica da via SHH tem sido relatada como determinante para o melhoramento do “delivery” de gemcitabina, devido à provável redução da MEC (MPEKRIS et al., 2017).

Figura 6. Desmoplasia do Câncer Pancreático. (A). Células tumorais pancreáticas, organizadas em conjuntos ou ductos, cercadas pela MEC desmoplásica. (B) Coloração com vermelho sirius mostrando as fibras colágenas do estroma desmoplásico do PDAC.

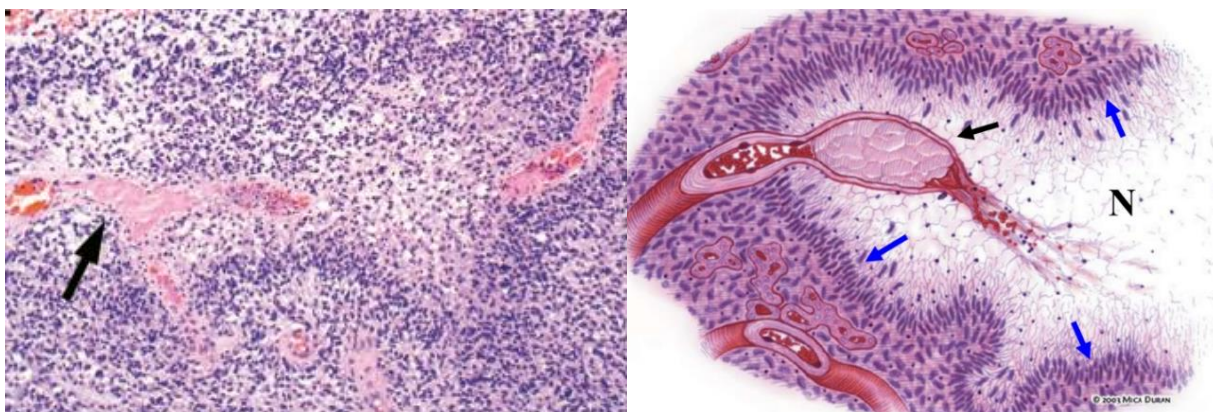


2.3.2 O Componente Hipóxico

Em massas tumorais crescentes, a difusão de oxigênio a partir dos vasos sanguíneos alcança cerca de $1\text{-}2\text{mm}^3$, não havendo, deste modo, suprimentos necessários à excessiva taxa de divisão mitótica tumoral. A manutenção curta ou prolongada de baixas tensões teciduais de oxigênio é denominada hipóxia (BERTOUT et al., 2009; OSINSKY; ZAVELEVICH; VAUPEL, 2009; SILVA-FILHO et al., 2017). A hipóxia pode ser encontrada em graus distintos de extensão na maioria dos tumores sólidos, podendo ser agravada pela presença de anormalidades funcionais e estruturais em vasos recém-formados (Figura 7) (BRAT et al., 2004; LIU; SEMENZA; ZHANG, 2015).

Os primeiros estudos a identificar a presença de regiões hipóxicas em tumores sólidos foram realizados em 1955 por Thomlinson e Gray, com agulhas de aferição gasosa em tumores pulmonares (THOMLINSON; GRAY, 1955). Mais tarde, outros cientistas identificaram regiões de baixas tensões de oxigênio através do uso de agulhas de polarografia, em câncer de útero, cérebro, cabeça e pescoço, próstata e pâncreas (OKUNIEFF; FENTON; CHEN, 2005).

Figura 7. Representação Esquemática da Formação de Áreas Hipóxicas em Tumor Glioblastoma. Vaso-oclusão/colapso e trombose intravascular (seta preta) levam a formação de áreas hipóxicas perivascularares (setas azuis). A hipóxia provoca a migração próxima e distante da vaso-oclusão/colapso e trombose devido à falta de vasos sanguíneos funcionais. Células tumorais que não migram sofrem apoptose ou necrose, eventualmente deixando uma zona necrótica central crescente (N).



Fonte: Brat, 2004.

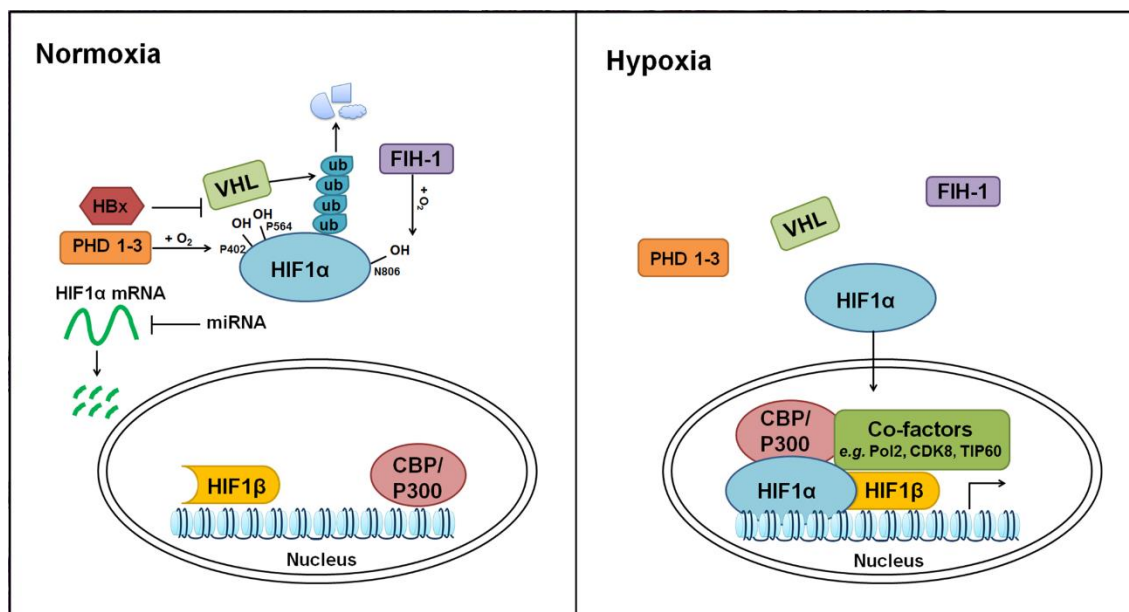
Em condições hipóxicas ocorre a estabilização dos fatores de transcrição denominados de fatores induzíveis por hipóxia 1 e 2 (HIF-1 e HIF-2, respectivamente), os quais possibilitam a adaptação tumoral ao microambiente adverso através da regulação de mais de 1000 genes (SEMENZA, 2012). O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico constituído de duas

subunidades, uma expressa constitutivamente, HIF1- β (também conhecida como receptor nuclear aril hidrocarboneto) e HIF-1 α , superexpresso em tumores sólidos comumente hipóxicos, como mama, útero, cérebro, ovário, cólon, rim, próstata e pâncreas (GILKES; SEMENZA, 2013).

A ativação e estabilização de HIF-1 α são reguladas pelos níveis teciduais de oxigênio através de seu domínio de degradação oxigênio-dependente (ODD), além de dois domínios de transativação (N-TAD e C-TAD) (KITADA et al., 2003). Em condições de normóxia, prolinas hidroxilases (PHD1, PHD2 e PHD3) realizam a hidroxilação de dois resíduos de prolina (P402 e P564) presentes no ODD de HIF-1 α (BERTOUT et al., 2009). A hidroxilação das prolinas é uma etapa fundamental para a degradação do fator de transcrição, uma vez que permite o reconhecimento de HIF-1 α pela proteína de von Hippel-Lindau (VHL). VHL é uma subunidade de reconhecimento da ligase ubiquitina E3, a qual adiciona uma cadeia de poliubiquina a HIF-1 α , indicando a degradação do fator via proteassoma (GILKES; SEMENZA, 2013).

Vale salientar que a inibição de HIF-1 α em condições normóxicas também pode ser realizada pelo fator de inibição de HIF-1 (FIH), através da hidroxilação do resíduo de asparagina 803 (N803) de HIF1- α , o qual inibe a interação desta molécula com sítios proteicos importantes e sua própria transativação (Figura 8) (MOVAFAGH; CROOK; VO, 2015; CHEN; LOU, 2017).

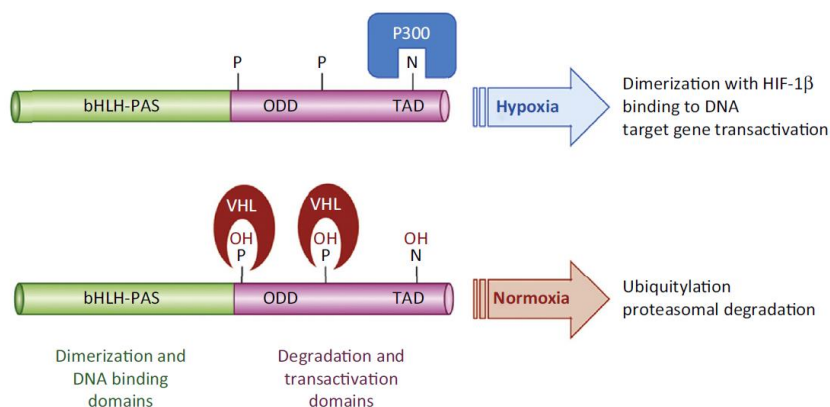
Figura 8. Via de Sinalização da Hipóxia. No nível pós-transcricional, o RNAm de HIF-1 α é inibido por miR-199a-5p, miR-338-3p, miR-93 e miR-122. Sob normóxia, a proteína HIF-1 α é hidroxilada nas posições P402 e P564 por PHDs e posteriormente degradada pela pVHL através do sistema de degradação ubiquitina-proteassoma. A hidroxilação de HIF-1 α por FIH-1 na posição N806 prejudica sua interação com CBP/P300. A hipóxia bloqueia a hidroxilação e a degradação via proteassoma de HIF-1 α , levando a sua estabilização e translocação nuclear. Dentro do núcleo, HIF-1 α forma um heterodímero com HIF-1 β , e ativa a expressão de genes responsivos à hipóxia com o auxílio de cofatores de transcrição adicionais, como CBP/P300, Pol2, CDK8 e TIP60.



Fonte: Chen e Lou, 2017.

Em condições hipóxicas, as reações de hidroxilação de prolina ou asparagina não podem ser realizadas, levando a consequente estabilização de HIF-1 α e o aumento das interações com seus cofatores (BERTOUT et al., 2009). Logo, há o acúmulo proteico e migração de HIF-1 α ao núcleo, onde vai se ligar à sequências de DNA 5'-RCGTG-3' presentes no interior dos elementos responsivos à hipóxia (HRE). Tais elementos encontram-se localizados nas regiões promotoras de genes alvos que passam a ser transcritos em maior escala, favorecendo a manutenção e desenvolvimento do tumor (Figura 9) (LIU; SEMENZA; ZHANG, 2015; SCHITO; SEMENZA, 2016).

Figura 9. Hidroxilação Dependente de Oxigênio Regula a Degradação e Transativação de HIF-1 α . Sob condições de normóxia, a hidroxilação de um resíduo de asparagina no domínio da transativação bloqueia a interação com o coativador P300. A hidroxilação de resíduos de prolina no domínio de degradação dependente de oxigênio permite a interação com pVHL, com consequente ubiquitinação e degradação via proteossoma. Sob condições hipóxicas, a hidroxilação é inibida, levando à estabilização e recrutamento de HIF-1 α .



Fonte: Schito e Semenza, 2016.

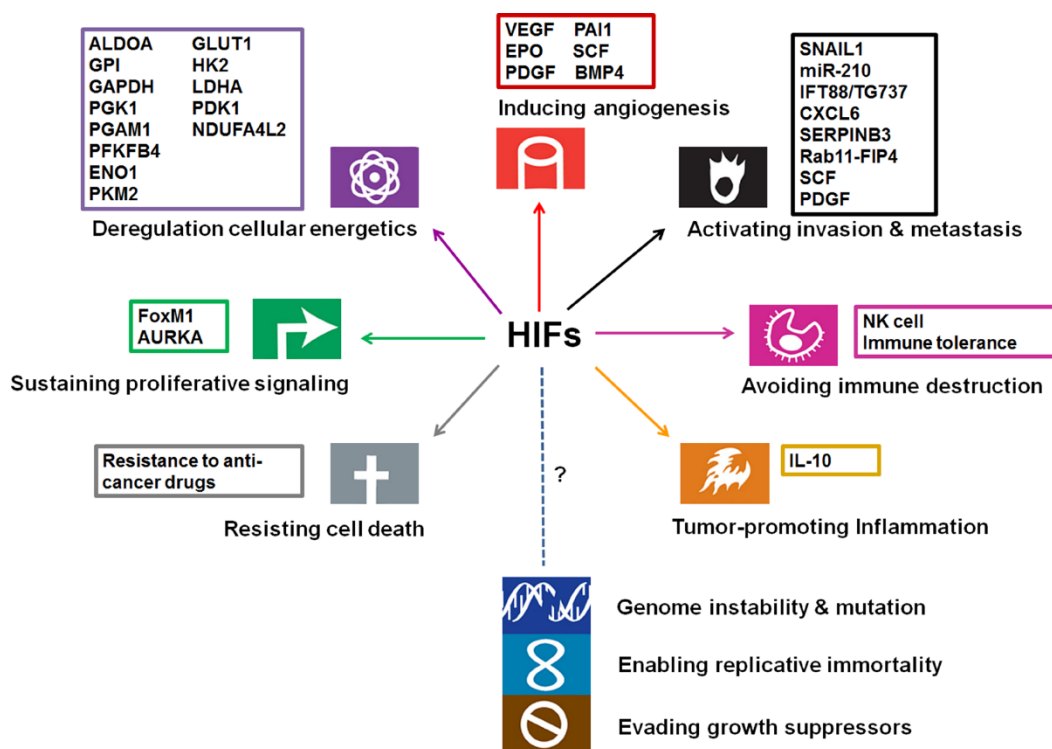
A hipóxia provoca mudanças significativas em diversas instâncias do comportamento celular tumoral com a finalidade de adaptação ao microambiente hostil e perpetuação do maquinário celular moldado à tal condição (Figura 10). A associação entre a expressão estável de HIF-1 α e alterações no que concerne à sinalização angiogênica, metabolismo glicolítico e a formação de micrometástases é apresentada constantemente na literatura (COLBERT et al., 2015; CHEN; LOU, 2017). O comprometimento do sistema imunológico é observado através da intervenção direta ou indireta do tumor sobre a diferenciação e funcionamento de células deste sistema. Mesmo em hipóxia, o tumor realiza esta intervenção através da modulação da expressão de citocinas e receptores coestimuladores (DUECHLER et al., 2014).

A heterogeneidade tecidual do microambiente tumoral possibilita o estabelecimento de áreas com tensões de oxigênio distintas. Células neoplásicas que residem em regiões de tensões mínimas de oxigênio tendem a apresentar movimento migratório em direção às áreas com maior concentração, evitando as consequências da ausência de oxigênio no metabolismo (SUZUKI, 2002). A influência da hipóxia sobre a motilidade celular aparece em estudos que comprovam a associação entre o aumento dos níveis de HIF-1 α e das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em tumores de mama, rim e pâncreas (SUZUKI, 2002).

Em tumores sólidos, a resistência às terapias clássicas acontece através de mecanismos moleculares ainda desconhecidos, porém determinantes para o sucesso da doença. Alguns trabalhos apontam para a relevância de HIF-1 α neste contexto de insensibilidade quimio e/ou

radioterápica, e aparentemente a sua inibição experimental, seja por RNA de interferência ou proteínas de ação dominante-negativa, pode conduzir à reversão parcial deste perfil (ROHWER; CRAMER, 2011). Contudo, os resultados ainda podem ser controversos. Enquanto em pesquisas com carcinomas pulmonares e neuroblastomas, a inibição de HIF1- α aumenta a sensibilidade ao tratamento químico, o contrário é observado em câncer de mama, gástrico e fibrosarcoma, nos quais há um decréscimo significativo da eficácia terapêutica (BROWN et al., 2006; CHANG et al., 2006; HUSSEIN et al., 2006; ROHWER et al., 2010).

Figura 10. Envolvimento de HIFs e Seus Alvos Moleculares Sobre os Hallmarkes do Câncer. A expressão dos HIFs tem sido implicada na promoção da angiogênese, invasão e metástase, proliferação, alterações no metabolismo energético, inflamação, evasão imune e resistência terapêutica. Modificado a partir da figura original de Hanahan e Weinberg.



Fonte: Chen e Lou, 2017.

A presença de baixas tensões de oxigênio no câncer de pâncreas foi registrada pela primeira vez por Koong e colaboradores em 2000, quando realizou aferições gasosas intratumorais, no momento da ressecção. Os achados deste estudo revelaram que as áreas hipóxicas presentes em carcinomas pancreáticos apresentaram tensões de oxigênio entre 0-5,3mmHg, com 24-94% da amostragem exibindo valores menores que 2,5mmHg. De modo contrário, áreas adjacentes de tecido normal exibiram tensões de oxigênio por volta de 24-92,7mmHg e não mais que 9% das amostras detinham níveis menores que 2,5mmHg (KOONG

et al., 2000). Estudos posteriores detectaram valores semelhantes para os tecidos normais (90mmHg) e neoplásicos (PATEL et al., 1995).

Alguns estudos apontam a associação entre a expressão de HIF1- α e o estabelecimento de um prognóstico reduzido ou ainda a potencialização de determinadas capacidades tumorais (GUILLAUMOND; IOVANNA; VASSEUR, 2014). Ye et al (2014) realizou a análise randômica de oito estudos científicos que investigavam a possível relação entre a expressão de HIF1- α e os parâmetros clínico patológicos de tumores pancreáticos, como por exemplo, tamanho do tumor, grau nuclear e acometimento linfonodal, totalizando 557 pacientes. O aumento dos níveis de HIF1- α resultaram em associação significativa com altos índices de metástase linfonodal, estágio tumoral avançado e reduzida sobrevida global dos pacientes (YE et al., 2014). Um outro estudo publicado por Akakura et al (2001) demonstrou que, em condições hipóxicas e de privação glicolítica, o aumento da expressão de HIF1- α ocorre de maneira simultânea ao prolongamento da sobrevivência e aumento das taxas de proliferação celular em linhagens de tumor pancreático (AKAKURA et al., 2001).

A manutenção do tumor mediante condições hipóxicas parece estar associada, entre outros fatores, ao desenvolvimento de um fenótipo autofágico. Este processo catabólico, existente em níveis basais nas células normais, aumenta em diversos tumores, possibilitando o suporte energético em condições de estresse celular hipóxico.

2.4 AUTOFAGIA NO CÂNCER

2.4.1 Mecanismos Moleculares Associados

A autofagia é um processo catabólico celular altamente regulado, no qual uma vesícula de dupla membrana cresce e captura componentes citoplasmáticos, incluindo macromoléculas e organelas, para posterior degradação lisossomal. Foram caracterizados alguns tipos de autofagia os quais diferem em termos de seletividade para com seus substratos. A macroautofagia corresponde ao tipo mais comum e menos seletivo, enquanto a microautofagia e autofagia dependente de chaperonas se referem a vias mais seletivas, direcionadas por proteínas específicas. Foram identificados mais de 30 genes relacionados ao processo autofágico através do mapeamento genético de leveduras, muitos dos quais são conservados em organismos eucarióticos superiores (LIU; LIAO; ZHAO, 2017).

A autofagia é um fenômeno frequentemente observado após condições de estresse celular e foi inicialmente denominado como “morte celular programada do tipo II” em contraste à apoptose (morte celular programada do tipo I). Por ser geralmente encontrada em células sob estresse ou em processo de morte, a autofagia foi e ainda é frequentemente considerada uma via de morte, entretanto sua contribuição para a manutenção da homeostase celular está sendo cada vez mais aceita (GALLUZZI et al., 2017; KIMMELMAN; WHITE, 2017). Esta teoria tem como principal argumento o aumento da taxa autofágica como parte de um processo de adaptação e retirada de metabólitos “indesejados”. Ademais, a maioria dos estudos genéticos e bioquímicos demonstram a relação entre autofagia e sobrevivência durante períodos de estresse (KIMMELMAN; WHITE, 2017).

Níveis basais de autofagia ocorrem em todas as células normais, nas quais desempenha importante papel para o turnover de proteínas não marcadas para degradação em proteassoma. Inclusive, a meia-vida de proteínas independentes de degradação via proteassoma pode ser utilizada como indicativo indireto de atividade autofágica celular (ADHAULIYA et al., 2016).

A autofagia é um processo no qual a desmontagem dos polímeros moleculares permite a liberação de energia e dos componentes monoméricos para o citoplasma, podendo ser reutilizados pela célula. Apesar de representar um processo de degradação de componentes celulares, o termo autofagia deve ser utilizado de modo restrito e com base em dois critérios principais: o envolvimento vesicular de material citoplasmático e a dependência da degradação lisossomal (LOZY; KARANTZA, 2012; KIMMELMAN; WHITE, 2017). Embora os substratos de degradação autofágica possam ser endógenos, tais como mitocôndrias danificadas

e fragmentos nucleares, ou exógenos, como vírus ou bactérias que escapam de fagossomos, a autofagia se utiliza de entidades que são livremente acessíveis às proteínas citosólicas componentes de sua maquinaria. Esta característica é importante para que seja possível a discriminação da autofagia em relação aos processos de tráfego vesicular, os quais se originam na membrana plasmática e culminam com a degradação lisossômica. Tais transportes endocíticos incluem fagocitose, endocitose mediada por receptor e pinocitose (LOZY; KARANTZA, 2012; KIMMELMAN; WHITE, 2017).

A dependência da degradação no lisossomo é outra característica que possibilita a distinção da autofagia de outros processos catabólicos de conteúdo citoplasmático, como a degradação via proteassoma (LILIENBAUM, 2013). A degradação através deste mecanismo ocorre com proteínas previamente ubiquitinadas ou que se submeteram à sinais de degradação específicos, como por exemplo a ligação com N-degrons proteicos (LILIENBAUM, 2013). N-degrons são resíduos proteicos N-terminais desestabilizantes e destinados à regulação da degradação proteica. Contudo, quando há o acúmulo de proteínas ubiquitinadas, as mesmas tendem a se agregar e acabam degradadas por macroautofagia, através da ligação com seus receptores (LEE et al., 2016).

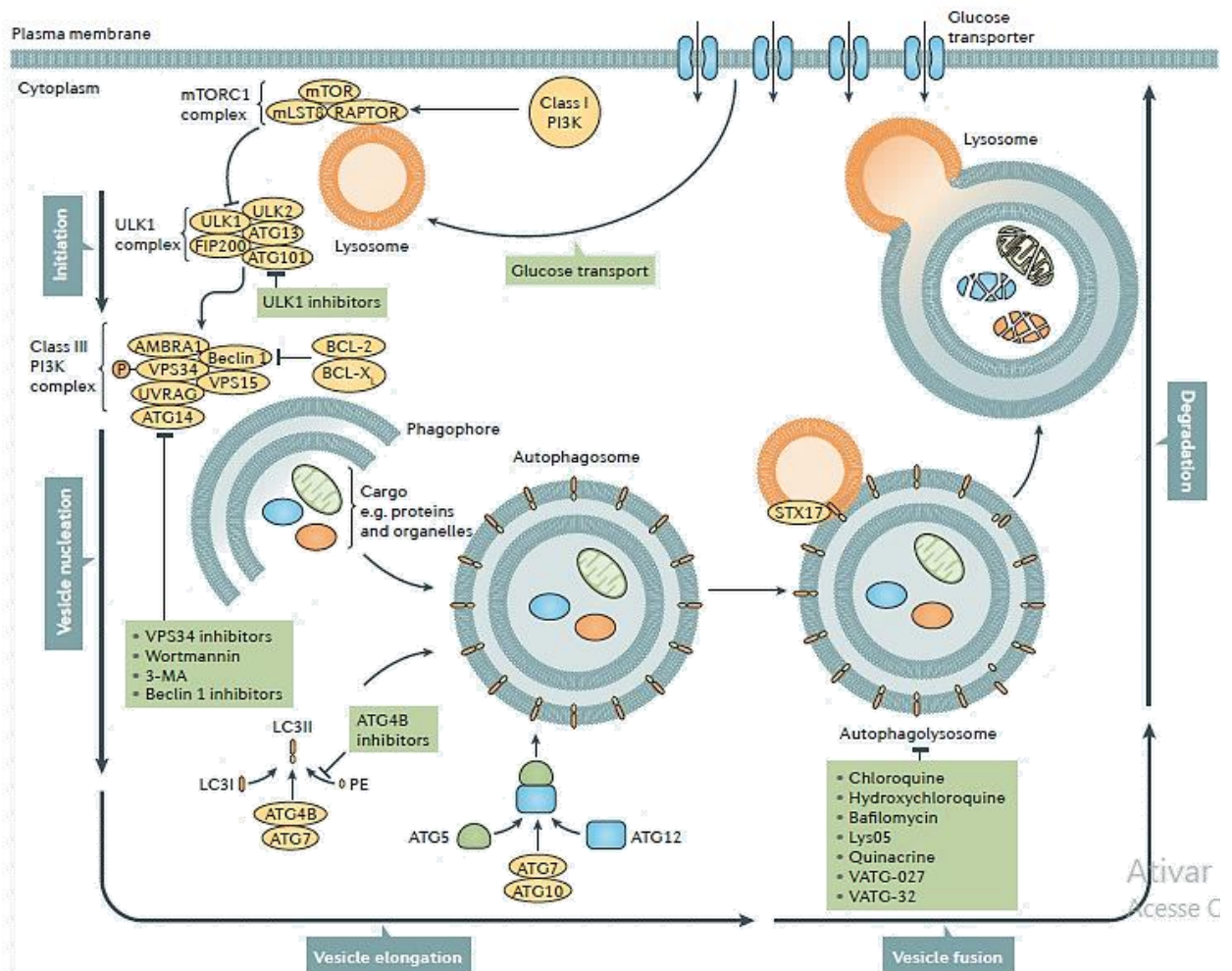
Ambas as vias de catabolismo, autofagia e degradação via proteassoma, compartilham substratos, porém a natureza dos produtos é frequentemente distinta. No proteassoma as reações resultam em peptídeos pequenos (de 8 a 12 resíduos) que não são necessariamente degradados ainda mais, mas podem alimentar processos adicionais, incluindo, mas não limitado a, apresentação antigênica na membrana plasmática (NEEFJES et al., 2011). Em contraste, as proteases lisossômicas catabolizam completamente os polipeptídeos em seus aminoácidos constituintes, os quais eventualmente se tornam disponíveis para reações metabólicas ou processos de reparação. As hidrolases lisossômicas também degradam lipídios, açúcares e ácidos nucleicos (LOZY; KARANTZA, 2012; KIMMELMAN; WHITE, 2017).

O estímulo à autofagia durante o estresse provoca duas consequências favoráveis à manutenção da homeostase celular. O primeiro ocorre em situações de privação nutricional, a desmontagem de organizados (polímeros e organelas) confere monômeros que retornam ao citoplasma para participar de processos metabólicos básicos e poderão ser reutilizados para novos objetivos. Este é um dos benefícios da autofagia particularmente importante para tumores sólidos cujo microambiente possui extensas regiões de baixas tensões de oxigênio e nutrientes. Uma vez que, entre outros mecanismos, permite a sobrevivência da célula neoplásica (ROSENFELDT; RYAN, 2011). Em segundo, foi constatado que a autofagia é o único método conhecido que permite a proteção da célula contra organelas “defeituosas”, aquelas

fisiologicamente desreguladas. Logo, a autofagia de mitocôndrias e partes do retículo endoplasmático são denominadas mitofagia e reticulofagia, respectivamente (ROSENFELDT; RYAN, 2011; DRAKE et al., 2017; KIMMELMAN; WHITE, 2017). Em células nas quais não há autofagia, é comum o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais acompanhado de altos níveis de estresse oxidativo e reticular. Adicionalmente, a autofagia é o mecanismo catabólico de escolha constante para a metabolização de proteínas ou agregados proteicos defeituosos, incluindo aqueles formados após estresse oxidativo (DRAKE et al., 2017).

O processo de degradação autofágica possui numerosas etapas e envolve diversos genes evolutivamente conservados. Em condições de estresse por privação de nutrientes, mTOR1 (mammalian target of rapamycin complex 1) é inibido, o que provoca a ativação de ULK1, unidade mais alta na cascata de ativação. A ativação de ULK1 possibilita a nucleação e alongamento de um fragmento membranar denominado fagóforo. Do complexo UKL1 participam Atg1, Atg13, FIP200 (proteína da família das quinases de adesão focal, também conhecida como retinoblastoma 1-inducible coiled-coil 1, RB1CC1), e Atg101. Outra consequência da ativação de ULK1 e formação do fagóforo é o recrutamento do complexo PI3KC III, formado por Beclin 1 (Atg6), Atg14, Vps34 (vacuolar protein sorting 34) e Vps15 (vacuolar protein sorting 15), os quais se ligam ao fagóforo e possibilitam o recrutamento das demais proteínas associadas à autofagia. Dois sistemas de conjugação se ligam ao fagóforo em sequência, Atg12 e LC3 são dois complexos de modificação via ubiquitina que permitem um maior alongamento e maturação do fagóforo, etapa que precede o fechamento da dupla membrana. Outras proteínas como WIPI-2, Atg2 e Atg9 parecem participar do processo de recrutamento membranar e formação do autofagossomo a partir do fagóforo. Com a ligação do complexo LC3, o fagóforo engloba parte do conteúdo citoplasmático, incluindo proteínas mal dobradas e organelas disfuncionais, formando uma vesícula fechada denominada autofagossomo. O autofagossomo se fundirá ao lisossomo formando o autolisossomo ou autofagolisossomos organela contendo proteases e nucleases (Figura 11, Tabela 3) (LEVY; TOWERS; THORBURN, 2017).

Figura 11. Processo Autofágico. A autofagia é induzida devido à privação de nutrientes ou fatores de crescimento. Em condições de privação, a diminuição no transporte de glicose resulta em diminuição da inibição exercida por mTOR sobre o complexo ULK1, permitindo a progressão da autofagia.



Fonte: Levy, 2017.

Tabela 3. Proteínas Participantes da Formação do Autofagossomo

UNIDADES	FUNÇÃO
Complexo ULK1	
ULK1	Se liga às demais unidades, Atg13, Atg101 e FIP200
Atg13	Possibilita a interação entre UKL1 e FIP200, além de nortear a localização e estimular a atividade de UKL1.
Atg101	Interage com UKL1 de modo dependente de Atg13 e regula a estabilidade da fosforilação basal de ambos.
FIP200	Proteína de ancoragem de UKL1 e Atg13. É necessária à correta localização, estabilidade e atividade de UKL1.
Complexo PI3K III	
Beclin 1	“BH3 only protein”. Interage com Bcl-2.
Atg14L	Estimula a atividade de Vps34 e o processo autofágico.
hVps15	Quinase de interação com Ser/Thr, necessária à associação de Vps34 à membrana plasmática.
Vps34	Fosfatidilinositol (PI) 3-quinase presente em mamíferos. Responsável pela fosforilação de fosfoinosítídeos na posição 3 no anel inositol.
Sistema de conjugação Atg12	
Atg15	Forma isopeptídeos com Atg12.
Atg12	Proteína do tipo ubiquitina. Forma isopeptídeos com Atg15.
Atg7	Enzima do tipo E1. Catalisa as conjugações Atg12-Atg15 e LC3-II-PE.
Atg10	Enzima do tipo E2. Catalisa a conjugação Atg12-Atg15.
Atg16L1	Conjuga-se ao complexo Atg12-Atg15.
Sistema de Conjugação LC3	
LC3	Proteína do tipo ubiquitina. Conjuga-se ao PE.
Atg4	Protease do tipo cisteína. Regula os níveis de LC3-I livre.
Atg7	Enzima do tipo E1. Catalisa as conjugações Atg12-Atg15 e LC3-II-PE.
Atg3	Enzima do tipo E2. Catalisa a conjugação LC3-II-PE.
Outras proteínas importantes	
WIPI-2	Proteína homóloga à Atg18. Facilita a associação de LC3 à membrana do fagóforo.
Atg2	Desconhecido.
Atg9	Desconhecido.

Fonte: Liu et al, 2017.

De um modo geral, o papel da autofagia na carcinogênese é complexo e provavelmente dependente do contexto tecidual. A conexão entre a autofagia e o metabolismo das células neoplásicas é um tema de grande interesse e alta relevância clínica na pesquisa contra o câncer. Uma vez que as células tumorais se encontram metabolicamente estressadas, passam a depender da autofagia para a sobrevivência e a reprogramação do seu metabolismo a fim de acomodar a rápida proliferação celular (LIU et al., 2017).

2.4.2 Oncogenes e Genes Supressores Tumorais no Controle da Autofagia

Muitas das proteínas que controlam direta ou indiretamente o processo autofágico também participam de vias de sinalização responsáveis pela regulação da progressão tumoral. Mais especificamente, estas proteínas respondem por processos-chave para a tumorigênese, sendo denominadas oncogenes e genes supressores tumorais. Alguns genes supressores tumorais que inibem mTOR, tais como PTEN, AMPK, LBK1 e TSC1/2 estimulam a autofagia, ao mesmo tempo que os oncogenes PI3K, Ras, HERB e AKT ativam mTOR, e consequentemente, inibem a autofagia (AVALOS et al., 2014).

Beclin-1, uma proteína enrolada em espiral, interage diretamente com Bcl-2 e também pode ser chamada de proteína autofágica 6 (Atg6), por fazer parte do corpo de regulação do processo autofágico (TOTON et al., 2014). Mais especificamente, Beclin-1 associado à PI3KCIII estão envolvidos nas etapas iniciais da formação do autofagossomo. Encontra-se localizado no retículo endoplasmático, mitocôndria e membrana nuclear. Beclin-1 contém três domínios principais, cada um associado a uma função distinta. O domínio BH3, localizado no N-terminal, é capaz de se ligar a determinados membros da família de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-XL E BCL-2. O domínio central enrolado em espiral (CCD) é responsável pela ligação ao gene de resistência à irradiação UV (UVRAG) e PI3KCIII. O terceiro, o domínio evolutivamente conservado (ECD), liga-se a PI3KCIII e participa da ligação a membranas de organelas celulares. Dentro deste domínio, três aminoácidos aromáticos consecutivos foram identificados (Phe359- Phe360-Trp361), estes formam uma ramificação hidrofóbica com afinidade por membranas lipídicas enriquecidas com cardiolipina e que ocorrem na mitocôndria (JUNG; LEE; KOO, 2016).

O desempenho de beclin-1 junto à autofagia depende da ligação de proteínas específicas aos seus domínios. Em relação aos domínios CCD e ECD, a proteína mais importante é a classe III Fosfatidilinositol-3 quinase, a qual é apenas capaz de exercer sua função quando em

complexo com beclin-1. O complexo 1 beclin-1/PI3KCIII está localizado no aparelho complexo de Golgi estimulando a fosforilação do fosfatidilinositol 3, possibilitando assim o alongamento do fagóforo e o recrutamento de proteínas atg para a membrana do mesmo (KIHARA et al., 2001).

Outra proteína com papel relevante no contexto hipóxico/autofágico é BCL-2. BCL-2 e BCL-XL são membros anti-apoptóticos da família de proteínas BCL-2. A expressão de BCL-2 é capaz de inibir a morte celular programada e inibir a autofagia através da ligação com Beclin-1 (PATTINGRE; LEVINE, 2006; TALAIEZADEH et al., 2015).

Assim como beclin-1 e BCL-2, mTOR detêm papel chave na regulação da autofagia. Apenas após 1994 estudos bioquímicos identificaram o alvo mecanicista da Rapamicina (BROWN et al., 1994; SABATINI et al., 1994; SABERS et al., 1995) revelando ser o homólogo dos genes TOR/DRR de levedura previamente identificados em panoramas genéticos para a resistência à rapamicina, por isso a denominação ``mTOR`` (HEITMAN; MOVVA; HALL, 1991; CAFFERKEY et al., 1993; KUNZ et al., 1993). mTOR é uma quinase pertence à uma família de proteínas do tipo fosfoinosítideo-3 quinase (PIKK) que forma a subunidade catalítica em dois complexos proteicos distintos conhecidos como mTOR 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2), expressos na maioria das células do organismo (SAXTON; SABATINI, 2017).

A formação dos autofagossomos é regulado por alguns complexos proteicos, sendo o complexo ULK1 (ULK, Atg13, FIP2000 e Atg101) um dos principais. Quando há disponibilidade de nutrientes, mTORC1 promove a fosforilação de ULK1, impedindo assim sua ativação pela AMPK, um importante regulador autofágico. mTOR ainda é capaz de regular a autofagia por meio da fosforilação e inibição da translocação nuclear do fator de transcrição EB (TFEB), o qual influencia positivamente a expressão de genes relacionados a biogênese lisossômica e pertencentes ao maquinário autofágico. Através destes mecanismos, mTOR determina as dimensões do processo autofágico em diversas instâncias celulares (Tabela 4) (SAXTON; SABATINI, 2017).

Atualmente, sabe-se que o controle exercido por mTOR sobre o catabolismo proteico perpassa pelo sistema de degradação ubiquitina-proteassoma, a principal via de metabolismo de proteínas (ZHAO et al., 2015; ROUSSEAU; BERTOLOTTI, 2016). Estudos recentes descobriram que a inibição aguda de mTORC1 provoca o aumento instantâneo da proteólise dependente de proteassoma através de um aumento geral de proteínas ubiquitinadas ou ainda de chaperonas proteossômicas, este resultante da inibição de Erk5 (ROUSSEAU; BERTOLOTTI, 2016).

Tabela 4. Proteínas Reguladas por mTOR.

Proteínas Reguladas Negativamente	Fenômeno Relacionado
UVRAG/ATG14L	Autofagia
ULK1	Autofagia
TFEB	Autofagia/Biogênese dos Lisossomos
Erk5	Degradação via Proteassoma

Fonte: próprio autor.

2.4.3 Autofagia: Supressão e Promoção da Progressão Tumoral

A autofagia é um fenômeno de importância dual para as células neoplásicas, podendo favorecer ou suprimir a progressão tumoral. Num primeiro momento, em células saudáveis, a autofagia impede o dano ao DNA e a instabilidade genômica, o que dificulta a transformação tumoral. Quando o tumor já se encontra estabelecido, a autofagia pode facilitar a senescência induzida por oncogene ou proteger os tumores contra a necrose e o ataque imune, propiciando assim o crescimento do mesmo. A autofagia também pode contribuir para a progressão do tumor, permitindo que as células tumorais sobrevivam a condições estressantes e sustentem a reorganização metabólica profunda que as células neoplásicas enfrentam após a transformação oncogênica. A autofagia é importante para o desenvolvimento do tumor, uma vez que permite a sobrevivência e a auto renovação das células-tronco tumorais. Ademais, a influência da autofagia sobre o desenvolvimento do câncer é regulada por fatores do microambiente, a classificação e o sítio tumoral (ROSENFELDT; RYAN, 2011).

O papel supressor tumoral da autofagia foi percebido após a depleção de genes essenciais para o processo autofágico. O primeiro gene ao comprovar esta associação foi BECN1. A depleção heterozigota de BECN1 provocou o desenvolvimento espontâneo de formações malignas, ao passo que a restauração de sua expressão inibiu o crescimento de tumor mamário em modelo murinho xenográfico (YUE et al., 2003). Outros genes relacionados ao processo autofágico foram encontrados inibidos ou alterados (LIANG et al., 2006; FIMIA et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2007).

Alguns genes responsáveis pelo controle da sobrevivência e progressão tumoral estão diretamente envolvidos em importantes momentos do processo autofágico (KUNG et al., 2011). Vários genes supressores de tumor, como a fosfatase e os homólogos de tensina (PTEN), o complexo de esclerose tuberosa 1 (TSC1) e 2 (TSC2), a quinase de fígado B1 (LKB1), a quinase associada à morte (DA PK) e o p19ARF, estimulam a autofagia através da inibição de mTOR,

ativação do complexo de iniciação ULK1 ou ativação de beclin 1. Em contraste, os oncogenes, como o receptor de tirosina quinase, classe I PI3K, Akt e Bcl-2, inibem a autofagia por meio da ativação de mTOR ou inibição de beclin-1 (KUNG et al., 2011).

Os mecanismos através dos quais autofagia promove supressão do desenvolvimento tumoral não estão completamente esclarecidos, contudo alguns processos evidenciam a sua relevância para o estabelecimento deste fenótipo. A degradação de mitocôndrias envelhecidas ou defeituosas evita o acúmulo e liberação citoplasmática de ROS, evitando a instabilidade gênica consequente e a carcinogênese (GOETZ; LUCH, 2008; MATHEW et al., 2009; DRAKE et al., 2017; GALLUZZI et al., 2017). A autofagia possibilita também a degradação de agregados de proteínas dispensáveis, os quais também estão relacionados à instabilidade gênica e ao estresse de retículo endoplasmático (MATHEW et al., 2009; MOSCAT; DIAZ-MECO, 2009; GUO et al., 2011; INAMI et al., 2011; TAKAMURA et al., 2011; AVALOS et al., 2014). A autofagia ainda pode contribuir para o estabelecimento de um estado celular senescente, provocando a parada do crescimento do tumor (YOUNG et al., 2009; COPPE et al., 2010; XIE et al., 2015; GAMMOH et al., 2016; BELLELLI et al., 2018). E por fim, o fenômeno autofágico pode retardar o estabelecimento de um microambiente inflamatório, o qual favorece o desenvolvimento tumoral por contribuir para a proliferação e sobrevivência de células malignas, estimular a angiogênese, metástase e quimioresistência (MORSELLI et al., 2009; CANDIDO; HAGEMANN, 2013).

Apesar do fato da autofagia poder desempenhar um papel de supressão durante a tumorigenese, diversos resultados apontam que os tumores já estabelecidos possuem alta dependência do processo autofágico. A noção de que a autofagia impulsiona o crescimento tumoral provém da necessidade das células tumorais de se adaptarem às condições impostas pelo microambiente, por vezes hipóxico e privado de nutrientes. Adicionalmente, os altos índices de proliferação tumoral impõem uma maior demanda bioenergética e biossintética que podem ser parcial ou completamente supridas pelos produtos catabólicos da autofagia (DEGENHARDT et al., 2006; AVALOS et al., 2014). A indução da autofagia em áreas hipóxicas é orientada pelo principal fator de transcrição associado a hipóxia, HIF-1 α , e pela cascata de sinalização AMPK. HIF-1 α estimula a proteína BNP3 que interrompe a interação entre beclin1 e BCL-2 ou BCL-XL, deixando-o livre para promover autofagia. Por outro lado, AMPK medeia a inibição mTOR, desencadeando a autofagia (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009).

A primeira evidência da importância da autofagia para a progressão tumoral é derivada do fato de que a depleção monoalélica de BECN1 em regiões hipóxicas tumorais, além de inibir a autofagia, provoca morte celular (LIANG et al., 1999).

Assim como outros tumores sólidos, o câncer pancreático apresenta altos níveis de autofagia. Yang e colaboradores (2011) observaram que a depleção de genes associados à autofagia, ATG5 ou ATG7, aboliu o crescimento tumoral pancreático em modelo murino RAS mutado e que a inibição de ATG5 por shRNA reduz o crescimento de células de adenocarcinoma pancreático humano em modelo murino de xenoinxerto. Estes pesquisadores observaram altos níveis de autofagia tanto nas linhagens quanto nos tumores derivados do enxerto reforçando a relevância da autofagia para o desenvolvimento neoplásico (YANG et al., 2011).

Não apenas no câncer de pâncreas, mas em outros tumores contendo áreas com condições de privação, a autofagia pode manter a sobrevivência celular por longos períodos, pode inibir a divisão e motilidade a fim de reduzir os custos energéticos ou ainda manter as células num estado inativo (ADHAULIYA et al., 2016). Deste modo, a autofagia é “utilizada” pelo tumor não apenas como fonte biossintética em condições de privação metabólica. Este processo pode estimular a aquisição de um fenótipo dormente pelas células tumorais, e garantir a manutenção da doença. Quando as condições do microambiente se tornam mais favoráveis, as células neoplásicas retomam a proliferação, permitindo que o tumor cresça (JANJI et al., 2013).

2.4.4 O Papel da Hipóxia na Indução Autofágica

Como já dito antes, há uma heterogeneidade em relação às tensões de oxigênio na maioria dos tumores sólidos, sendo esta, resultado de insuficiência e mau funcionamento da vasculatura tumoral. E apesar da sua associação com um comportamento biológico tumoral agressivo, a hipóxia também funciona como uma barreira de estresse que pode impedir o crescimento celular (BRAT et al., 2004). Hipóxia e anóxia induzem numerosos “checkpoints” no ciclo e podem determinar a morte celular por apoptose e/ou necrose. Adicionalmente, o microambiente tumoral impõe de certa forma uma desregulação do metabolismo energético, reduzindo a produção de energia por fosforilação oxidativa (SILVA-FILHO et al., 2017).

Neste contexto, as regiões hipóxicas acabam por impor uma pressão seletiva sobre as células tumorais, ordenando mudanças significativas em importantes vias de sinalização, como aquelas associadas à angiogênese, motilidade celular, metabolismo energético, reparo do DNA e crescimento celular (BRISTOW; HILL, 2008; GILLIES; ROBEY; GATENBY, 2008). Ou

seja, a despeito das limitações impostas pelo microambiente, em diversas regiões do tumor há conjuntos células rompendo a barreira imposta pelo estresse através de mutações em genes determinantes para a sobrevivência, como P53 e BCL-2 (GRAEBER et al., 1996; SHEN; WHITE, 2001).

Há uma crescente corrente de estudos que apontam para possíveis links entre eventos na sinalização hipóxica e a ativação autofágica (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009). Neste tópico, serão apresentadas três possíveis vias associadas à regulação da autofagia pela hipóxia, com a finalidade de promover a sobrevivência de células tumorais e assim influenciar o comportamento do tumor e a evolução clínica do paciente.

O HIF-1 α é considerado o principal regulador da transcrição durante a hipóxia, induzindo uma resposta transcricional diversa que envolve mais de 60 genes, entre estes o gene codificante da Proteína de Interação com BCL-2, BNIP3 (BRUICK; MCKNIGHT, 2001; GUO et al., 2001; GREIJER et al., 2005; SEMENZA, 2005). BNIP3 é capaz de interagir com duas regiões específicas de BCL-2, E1B e tipo-E1B, através do domínio BH3 suprimindo sua atividade anti-apoptótica. Portanto, BNIP3 foi considerada inicialmente uma proteína pró-apoptótica (CHEN et al., 2015). Contudo, uma vez que BCL-2 é responsável pela ligação e bloqueio de beclin-1, uma das principais proteínas autofágicas, o papel regulador de BNIP3 sobre BCL-2 tem sido associado também ao aumento do processo autofágico (VASAGIRI; KUTALA, 2014).

BNIP3 é responsável por promover autofagia mitocondrial. A mitofagia induzida por BNIP3 acontece após interação desta proteína com Rheb, uma pequena GTPase que regula positivamente a atividade de mTOR a fim de promover crescimento celular (CHOURASIA; MACLEOD, 2015). Em condições hipóxicas, Rheb é translocada para fora da mitocôndria, onde interage tanto com BNIP3L e promove o processamento de LC3, garantindo mitofagia independente de mTOR (VASAGIRI; KUTALA, 2014).

Em seu estudo, Zhang et al (2008), utilizando modelo in vitro com células embrionárias de camundongo positivas e negativas para HIF-1 α comprova a regulação exercida por este fator de transcrição sobre a porcentagem de massa mitocondrial e atividade respiratória mediante ativação de BNIP3 (ZHANG et al., 2008). O autor comprova que a ativação de HIF-1 α , e o consequente aumento de expressão de BNIP3, possibilita a diminuição da massa mitocondrial, um processo que requer a participação de beclin-1 e Atg5. A inibição de HIF-1 α impediu a redução da massa mitocondrial com consequente morte celular, provocada essencialmente pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2008). Em estudo mais recente, observou-se que as capacidades invasivas de ACC-M, linhagem representativa de carcinoma

adenóide cístico, estava associada à autofagia induzida em condições hipóxicas, com participação de HIF-1 α /BNIP3 (WU et al., 2015).

Outra via de sinalização com possível associação à autofagia é “unfolded protein response” (UPR) (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009). Mais que uma via de sinalização, trata-se de um complexo sistema de transdução de sinal intracelular que visa a eliminação de moléculas defeituosas que se acumulam em condições de estresse reticular. Este sistema possui como principal finalidade restaurar a homeostase das organelas, principalmente do retículo endoplasmático (LUO; LEE, 2013).

O aumento da taxa de proteínas mal dobradas é um dos principais fatores que levam ao estresse de retículo, o qual pode ser causado por privação nutricional, hipóxia, deficiência de cálcio, instabilidade gênica e escassez de glicose (LUO; LEE, 2013). A UPR é composta por três proteínas transmembranas do RE que funcionam como sensores para o acúmulo de proteínas mal dobradas, são elas: enzima dependente de inositol 1 α (IRE1 α), quinase de retículo endoplasmático pancreática (PERK) e fator de ativação da transcrição 6 (ATF6). Sob condições fisiológicas, a ativação desses sensores é inibida pela ligação, em seus domínios luminais, da chaperona BIP / GRP78 (proteína de regulação de glicose de 78 kDa). De fato, o BIP estabelece um equilíbrio dinâmico entre proteínas desdobradas (a dobrar) e domínios intraluminal dos três sensores de estresse de RE. Devido à maior afinidade natural com proteínas desdobradas, o acúmulo destas resulta em dissociação de BIP para com PERK, IRE1 e ATF6, uma vez que o mesmo passa a cooperar massivamente na dobragem de proteínas. As consequências deste desequilíbrio são a homodimerização de IRE1 e PERK, sua trans-auto-fosforilação e ativação, e translocação de ATF6 para o aparelho de Golgi e subsequente ativação (GONG et al., 2017).

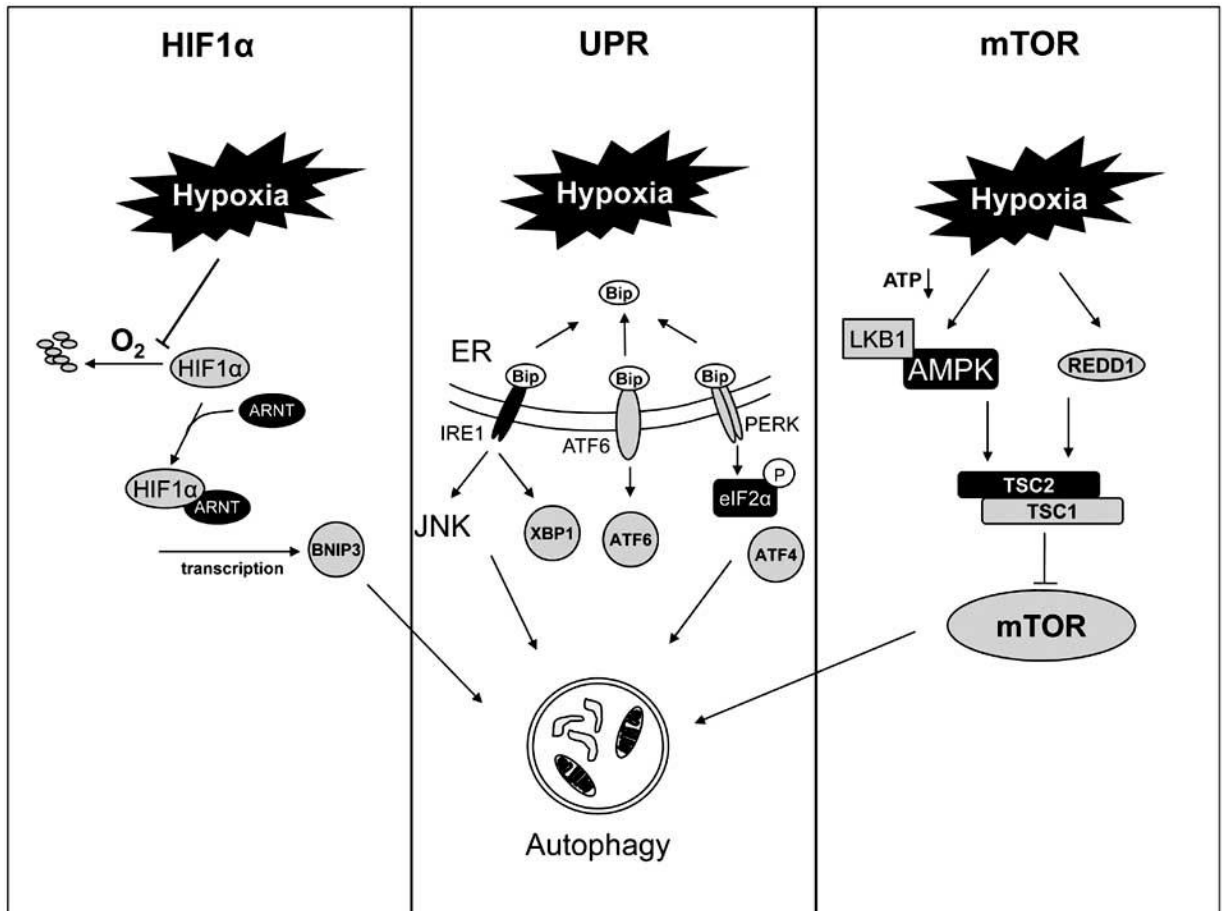
A ativação dos três sensores provoca diferentes desdobramentos moleculares. IRE1 α passa a desempenhar atividades de quinase e endonuclease, promovendo o splicing da proteína de ligação X-box (XBP1) formando o fator de transcrição ativo XBP1s. No núcleo, este fator de transcrição regula a expressão de genes associados ao dobramento e tráfico proteico reticular, e ao programa de degradação de proteínas associadas ao retículo (ERAD) (CHEN; ZHANG, 2017). Por outro lado, o IRE1 α ativado também é capaz de se associar ao fator associado a receptor de TNF 2 (TRAF2) que, por sua vez, estimula a expressão das quinases de regulação de sinal apoptótico 1 e N-terminal JUN (JNK), levando à ativação do BIM pró-apoptótico e à inibição BCL-2 (ZHANG et al., 2016). Em condições de estresse de retículo, ATF 6 se transloca para o aparelho de Golgi, onde é modificado por clivagem proteolítica, e em seguida para o núcleo, onde regula a expressão de genes relacionados à atividade reticular e XBP1. Uma vez ativado, PERK promove fosforilação do fator de tradução eucariótico 2 α (EIF2 α), o que

provoca inibição de transcrições cap dependentes e aumento de transcrições cap independentes de diversos mRNA, como ATF4. ATF4, por sua vez, favorece a resposta antioxidante, biossíntese de aminoácidos e expressão de genes para sustentar a sobrevivência celular (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009).

Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na ativação autofágica pela UPR em condições hipóxicas ainda não estarem esclarecidos, evidências apontam para o envolvimento da via dependente de PERK neste processo (ROZPEDEK et al., 2017). Em seu estudo, e colaboradores (2015) observaram que a depleção de PERK em modelos xenográficos de HCT116 e U373 promovia redução dos níveis transcripcionais de MAPLC3, diminuindo o processo autofágico nas regiões hipóxicas dos tumores. Através de um modelo de isquemia/hipóxia cerebral em camundongos, Carloni et al (2014) observou aumento da fosforilação de EIF2a e splicing do mRNA de XBP1, revelando estresse de RE grave e UPR. Ao induzir autofagia utilizando Rapamicina, o autor constatou redução da UPR e diminuição de seus marcadores, provando a relação entre os dois eventos (CARLONI et al., 2014).

A regulação de mTOR pela hipóxia é interessante já que este é o inibidor-chave da autofagia (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009). Um dos mecanismos de regulação do mTORC1 envolve a ativação do complexo proteico de esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2). Em condições de privação nutricional e/ou hipóxia prolongada, a depleção nos níveis de ATP e a fosforilação de AMPK (AMP-activated protein kinase) provocam a ativação de TSC2 (AVALOS et al., 2014). TSC2 conjuga-se à TSC1 e passam a promover inibição de mTOR possibilitando o processo autofágico. Outra via de inibição de mTOR, recentemente descrita, é a exercida pela proteína de regulação do desenvolvimento e resposta ao dano do DNA 1 (REDD1). REDD1, uma das muitas proteínas alvo de HIF, induz a inibição de mTOR através da ativação do complexo TSC1/2 (Figura 12) (ROUSCHOP; WOUTERS, 2009).

Figura 12. Hipóxia e as Vias de Indução da Autofagia. **HIF-1 α** - A hipóxia estabiliza HIF-1 α , que posteriormente se dimeriza com ARNT/HIF-1 β e provoca uma poderosa resposta transcricional, incluindo a indução de BNIP3. BNIP3 é capaz de influenciar a autofagia. **UPR** - A hipóxia desencadeia a liberação de IRE1, PERK e ATF6 de Bip, ativando a UPR. Sinais de IRE1 através de XBP1 e JNK. A ativação PERK leva à fosforilação de eIF2 α e expressão de ATF4. Tanto IRE1-JNK como PERK-eIF2 α mostraram ser importantes para a indução de autofagia durante diferentes tipos de estresse reticular. **MTOR** - Tanto REDD1 como LKB1/AMPK estimulam a atividade de TSC1/TSC2 durante a hipóxia, inibindo assim a atividade de mTOR. A inibição do mTOR resulta na ativação da autofagia.



Fonte: Kasper, 2009.

2.5 GLICOBIOLOGIA

Glicobiologia é uma ramificação científica que busca a compreensão das modificações moleculares baseadas na associação de proteínas e lipídeos à carboidratos. O estudo do universo da glicobiologia teve início com a identificação de monômeros de carboidratos e análises da composição das cadeias de polissacarídeos encontradas em tecidos distintos ao longo do organismo (OHTSUBO; MARTH, 2006). Nos tempos atuais, sabe-se que a porção “glico” de uma molécula codifica uma informação adicional àquela determinada pela tradução (ZHANG et al., 2012).

Atualmente, sabe-se que glicosiltransferases e glicosidases, situadas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, atuam sobre diferentes proteínas realizando modificações pós-traducionais, sendo a glicosilação uma das alterações mais abundantes (STROUS; DEKKER, 1992; TRIANTAFYLLOU; FLETCHER; SCOTT, 2004). A glicosilação modula e controla o funcionamento proteico, influenciando processos como, enovelamento, localização e estabilidade proteica (CRUCHO et al., 2015). Interações envolvendo adesão e migração dependem em muitos casos da composição da porção carboidrato associado à proteína. Neste sentido, a importância dos glicoconjugados fundamenta o estudo destes como possíveis alvos terapêuticos (YANG; LIU; YAN, 2013).

Cada glicoconjugado é composto por uma porção de carboidrato, com tamanhos e complexidades variáveis, ligados covalentemente a outros tipos moleculares, como proteínas e lipídeos (WIEDERSCHAIN, 2013). Entre as diversas funções encontradas, a porção de carboidrato presente no conjugado tem exibido papel significativo em eventos específicos de reconhecimento, comunicação e sinalização celular (RATNER et al., 2004). Estes agregados possuem estruturas de configuração variável e cada um, assim como cada monossacarídeo componente da porção de hidrocarboneto, pode influenciar, em graus distintos, o funcionamento celular (VARKI, 1993).

Descobertas científicas levam à conclusão de que alterações na expressão de determinadas glicoproteínas está diretamente implicada com síndromes genéticas, doenças de natureza imunológica e cardiovascular, e principalmente câncer (OHTSUBO; MARTH, 2006). Associações entre o grau de avanço da doença e a glicosilação fomentam cientificamente diversos ramos de pesquisa que buscam nas modificações perfis de expressão que possam ser confiáveis durante o diagnóstico. Uma vez que, alta especificidade e sensibilidade desses padrões pode fornecer ainda informações prognósticas valiosas.

2.6 GALECTINAS

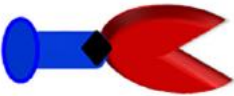
2.6.1 Introdução às Galectinas

O termo “galectina” foi utilizado pela primeira vez em 1993 por Lobsanov e colaboradores. Afinidade por β -galactosídeos e similaridade significativa na sequência do domínio de ligação do carboidrato são critérios para identificação de galectinas (LOBSANOV et al., 1993; BARONDES et al., 1994). A afinidade por β -galactosídeos é uma característica constante e a ligação com esse açúcar se dá através de N- ou O-glicosilação (CUMMINGS; LIU, 2009). Quanto ao domínio de reconhecimento a carboidrato, ele possui cerca de 135 aminoácidos e as galectinas podem ser subdivididas de acordo com a quantidade e estrutura do mesmo (BARONDES et al., 1994; LAHM et al., 2003).

Em termos estruturais as galectinas podem conter um CRD e serem classificadas como monoméricas (gal-5, -7 e -10) ou diméricas (Gal-1, -2, -11, -13, -14 e -15), outras moléculas possuem dois CRDs conectados por uma região curta, é o caso das galectinas -4, -6, -8, -9, -12. A galectina-3 constitui a única proteína desta família que possui um CRD e um domínio que não é comum à lectinas, o qual é responsável por sua oligomerização, por isso Gal-3 é conhecida por sua forma quimérica ou multimérica (VAN DEN BRÛLE; CALIFICE; CASTRONOVO, 2002). Acredita-se que a pluralidade estrutural presente neste grupo molecular possa estar diretamente relacionada a complexidade do fluxo de informação presente em diversas localidades do microambiente celular (Figura 13) (VLADOIU; LABRIE; ST-PIERRE, 2014; AHMED; ALSADEK, 2015).

As galectinas tem sido alvos constantes de estudos nas últimas décadas devido sua relação com a carcinogênese, sendo as galectinas-3 e -1, seguidas por -7, -9 e -4, as mais estudadas (EBRAHIM et al., 2014). Elas possuem características típicas de proteínas citosólicas, são sintetizadas nos ribossomos do citosol, não possuem peptídeos de sinal e Gal-3 pode apresentar-se fosforilada, mas nenhuma outra modificação pós-traducional foi definida com exatidão para as galectinas (LEFFLER et al., 2002). Apesar da produção citosólica, galectinas podem ser encontradas no núcleo ou em outros sítios citoplasmáticos, além da possibilidade de secreção por via não clássica, ou seja, por outra via metabólica que não inclua o retículo endoplasmático e/ou complexo de Golgi (LAHM et al., 2003).

Figura 13. Classificação das Galectinas. Representação esquemática das galectinas do tipos proto, quimera e tandem.

Type	Schematic representation	Mammalian galectin member
Proto		Galectin-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15
Chimera		Galectin-3
Tandem-repeat		Galectin-4, 6, 8, 9, 12

Fonte: Ahmed e AlSadek, 2015.

Galectinas constituem moléculas multifuncionais envolvidas em diversos processos celulares, atuando extra e intracelularmente em diferentes tecidos (NAKAHARA; RAZ, 2007). Estas proteínas têm sido associadas em distintos fenômenos relacionados ao câncer, como transformação e diferenciação celular, regulação do ciclo celular, migração, adesão e angiogênese (SALATINO et al., 2008; THIJSEN et al., 2010; ZHONG et al., 2010; SONG et al., 2014).

Uma vez comprovada a expressão diferenciada de galectinas nos tecidos tumorais, um elevado número de pesquisas concentram-se em descobrir quais as consequências da sua funcionalidade para a progressão do câncer (VLADOIU; LABRIE; ST-PIERRE, 2014). Os estudos sobre o papel das galectinas no câncer têm focado principalmente na sua capacidade de se ligar a receptores de superfície celular através de seu CRD. Atualmente, outros componentes da proteína, como seu domínio N-terminal, são avaliados (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Estudos distintos apontam para capacidade tumoral de promover a manipulação molecular afim de promover a expressão superficial de galectinas em outras células (PARTRIDGE et al., 2004; AGGARWAL; SHARMA; DAS, 2015). Por exemplo, a indução

da expressão de Gal-1 em células endoteliais por tumores de próstata parece possibilitar a adesão de células invasivas aos vasos em formação (CLAUSSE et al., 1999; HE; BAUM, 2006).

Neste contexto, esforços têm sido empregados a fim de identificar inibidores para galectinas que possuam alta especificidade e sensibilidade (AGGARWAL; SHARMA; DAS, 2015). Mesmo após muitos anos de pesquisa, os avanços são pouco significativos, e os inibidores existentes são peptídeos ou polissacarídeos de alto peso molecular que visam o bloqueio extracelular do poder de ligação das galectinas. (ASTORGUES-XERRI et al., 2014).

2.6.2 Galectinas -1 e -3, Pequenas Proteínas com Grandes Funções

Galectina-1, a primeira galectina a ser descoberta, ocorre no organismo como um homodímero não covalente cuja localização e quantidade estão associados a sua funcionalidade (CAMBY et al., 2006). Gal-1 é capaz de regular o ciclo celular em tumores humanos, capacidade comprovada após ensaios de inibição com lactose (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

Gal-1 é reconhecida por sua modulação dual sobre o crescimento de células neoplásicas (RABINOVICH, 2005). Enquanto o tratamento com Gal-1 recombinante inibe o crescimento populacional em diversos tipos tumorais, pequenas concentrações desta proteína parecem estimular a divisão celular (ADAMS; SCOTT; WEINBERG, 1996; VAS et al., 2005). De qualquer forma, a alteração desta molécula no tumor ou no tecido ao redor indica progressão tumoral elevada e consequente prognóstico reduzido, para casos de mama, ovário, próstata e pâncreas (EBRAHIM et al., 2014).

Por outro lado, a expressão de Gal-3, em graus distintos, aparenta estimular o crescimento tumoral (FORTUNA-COSTA et al., 2014; NAKAYAMA et al., 2014). Ikemore et al, 2014, ao proceder o knockdown de Gal-3 em células U87MG (glioblastoma) inoculadas em camundongos nude, observou uma redução significativa das dimensões tumorais e da proliferação celular propriamente dita. Identificando a importância de Gal-3 para o crescimento deste tumor neural (IKEMORI et al., 2014).

Galectinas têm sido apontadas em diversos tipos tumorais por contribuírem não só com a proliferação mas com adesão das células a componentes presentes na matriz extracelular, através da expressão de receptores de adesão específicos. Esta é uma capacidade necessária à formação de novas colônias tumorais que apenas tumores de malignidade em ascendência possuem (TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2002; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Dados provenientes da literatura explicam a participação de Gal-1 em processos de adesão para células pertencentes à tumores de ovário, próstata, linfomas e outros. Adicionalmente, foi descoberto que Gal-1 é capaz de promover agregação homotípica, dependente de carboidrato, em células de melanoma (RABINOVICH, 2005). A participação de Gal-3 em processos de adesão, invasão e metástase também estão baseados nos indícios de sua interação com componentes chave da matriz extracelular (XIN; DONG; GUO, 2015). Há estudos que afirmam interações entre Gal-3 e moléculas de adesão celular (CAMs) (BOSCHER et al., 2012); relacionando sua expressão com a função biológica da integrina (FURTAK; HATCHER; OCHIENG, 2001); ou ainda indicando a sua ligação com mucina-1 (MUC-1) via antígeno TF (Thomsen Friedenreich) (ZHAO et al., 2009).

A expressão das galectinas e sua associação com a progressão dos tumores mais incidentes é bem estabelecida (EBRAHIM et al., 2014). Pesquisas sobre o papel prognóstico de Gal-1 no câncer de mama levaram a descoberta da correlação entre sua expressão e o grau tumoral em biópsias de pacientes portadores da doença. Quanto maior a expressão de Gal-1, mais elevado é o grau tumoral em pacientes com câncer mamário, levando a um prognóstico reduzido. Ao mesmo tempo, a expressão de Gal-1 é baixa ou inexistente em amostras de hiperplasia (DALOTTO-MORENO et al., 2013).

Galectina-3 é outra proteína comumente associada ao comportamento biológico do câncer de mama. Muitas vezes presente no citoplasma e membrana de células deste tumor, a expressão de Gal-3 associa-se com metástase, atividade pró-angiogênica e fuga da defesa imunológica através da morte de células T ativadas (SIMONE et al., 2014). Raz e colaboradores demonstraram que, em modelos murinos de câncer de mama e de próstata, a clivagem de Gal-3 por metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) está relacionada à angiogênese, crescimento e resistência à apoptose (KNAPP et al., 2013).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, a dinâmica da possível utilização das galectinas como biomarcadores de prognóstico e diagnóstico para diversos tipos tumorais ainda é incipiente.

2.6.3 Galectinas no Contexto Tumoral Pancreático

Propunha-se inicialmente que o papel das galectinas estaria relacionado à proliferação tumoral, à aquisição de fenótipo metastático e à modulação do sistema imune (BARONDES et al., 1994; PERILLO; MARCUS; BAUM, 1998). Atualmente, sabe-se da participação das galectinas em outros processos determinantes para o estabelecimento e progressão do câncer em diferentes sítios, incluindo o pâncreas (BERBERAT et al., 2001).

A expressão das galectinas -1 e -3 está aumentada no câncer pancreático em comparação ao tecido normal. Através da análise de amostras de tecido pancreático saudável, foi possível determinar a pouca expressão de Gal-1 em alguns fibroblastos da MEC, e a fraca marcação de Gal-3 em células acinares e ductais pancreáticas. No tumor, a expressão de Gal-1 é visível e localizada principalmente nos fibroblastos associados ao tumor, além de estar secretada na matriz extracelular. Em contraste, a forte expressão de Gal-3 é evidente pelas células neoplásicas pancreáticas (SCHAFFERT; POUR; CHANEY, 1998; BERBERAT et al., 2001).

A expressão de Gal-1 é comumente associada a células da matriz extracelular em tumores pancreáticos (ASTORGUES-XERRI et al., 2014). As células estreladas do pâncreas (CEP) são a fonte primária de expressão de Gal-1 em tumores sólidos. O aumento da expressão de Gal-1 é um evento característico na ativação das CEP, as quais desempenham papel chave para a fibrose, condição que se estabelece durante a pancreatite crônica e o câncer (FITZNER et al., 2005). CEP que são tratadas com Gal-1 recombinante proliferam mais rápido e produzem colágeno em maior escala (FITZNER et al., 2005; MASAMUNE et al., 2006).

Galectina-1 funciona como sinal de comunicação entre as CEP e as células tumorais pancreáticas. O estudo publicado por Dong e colaboradores (2016) comprova que Gal-1 induz a secreção do fator derivado das células do estroma -1 (SDF-1) em CEP, através da ativação de NF-kB. SDF-1 secretado induz a proliferação e invasão do PDAC. Neste estudo foram utilizadas linhagens representativas de PDAC e CEP, além de modelo murino nude (QIAN et al., 2017).

A produção de Gal-1 pelas células estreladas pode estar associada em partes à defesa contra a ação imunológica. As CEP que expressam Gal-1 encontram-se espalhadas nos tecidos de pancreatite crônica, mas formam uma barreira fibrosa apertada que cerca o tumor, em amostras de PDAC. É importante salientar que as células T CD3 + cercam células malignas em tecidos de PDAC através da infiltração de poucas células no parênquima tumoral (TANG et al., 2012; BACIGALUPO; CARABIAS; TRONCOSO, 2017). Estes resultados sugerem que as

células estreladas do pâncreas que expressam Gal-1 podem estar associadas à defesa contra as células T CD3 +.

Gal-1 também é necessária para a regulação da formação do componente desmoplásico. A inibição desta molécula não apenas reduz o crescimento tumoral, mas também afeta o microambiente do tumor, dificultando a ativação estromal, angiogênese e suspensão da resposta imunológica (ITO et al., 2012).

Assim como Gal-1, o significado da expressão de Gal-3 tem sido avaliado no câncer de pâncreas. Gal-3 é estimulada à nível transcricional nos tecidos pancreáticos tumorais em comparação aos tecidos normais e a supressão transitória da Gal-3 foi responsável por aumentos da migração e invasão de células pancreáticas, além de diminuição do tamanho tumoral (KOBAYASHI et al., 2011).

Song e colaboradores (2012) observaram a ligação de Gal-3 à Ras, além da manutenção de sua atividade no PDAC. Ademais, a redução da inibição de Gal-3 diminuiu a atividade de Ras, bem como sua sinalização “downstream”, incluindo a fosforilação de ERK, AKT e Ral A (SONG et al., 2012). Esses resultados sugerem que Gal-3 contribui para a progressão do câncer de pâncreas, em parte, através da ligação de Ras e ativação da sinalização de Ras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1 Cultura de PANC-1

A linhagem tumoral PANC-1, aderente, foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro. A célula foi mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's (Thermo Fisher Scientific) com concentração de 1g/mL de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), antibiótico e antimicótico, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e bicarbonato de sódio. A linhagem permaneceu todo o tempo em atmosfera com 5% de CO₂ à 37°C.

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e suspensas para expansão ou congelamento assim que atingiam a confluência de 60-80% sobre a área da garrafa. Com a finalidade de desfazer a monocamada aderida, as células foram lavadas com solução de 0.53mM de EDTA e posterior incubação (37°C) com solução de tripsina 1%. Finalizado o tempo de incubação, a mesma quantidade de meio completo (com SFB) foi adicionada à garrafa, as células foram centrifugadas, suspensas em novo meio e divididas de acordo com o objetivo experimental.

3.1.2 Cultura de Mia PaCa-2

A linhagem tumoral Mia PaCa-2, aderente, foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro. A célula foi mantida em meio Dulbecco's Modified Eagle's (Thermo Fisher Scientific) com concentração de 4,5g/mL de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 2,5% de soro equino (Cultilab), antibiótico e antimicótico, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico) e bicarbonato de sódio. A linhagem permaneceu todo o tempo em atmosfera com 5% de CO₂ à 37°C.

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e suspensas para expansão ou congelamento assim que atingiam a confluência de 60-80% sobre a área da garrafa. Com a finalidade de desfazer a monocamada aderida, as células foram lavadas com solução de 0.53mM de EDTA e posterior incubação (37°C) com solução de tripsina 1%. Finalizado o tempo de incubação, a mesma quantidade de meio completo (com SFB) foi adicionada à

garrafa, as células foram centrifugadas, suspensas em novo meio e divididas de acordo com o objetivo experimental.

3.1.3 Cultura Tridimensional das Linhagens de PDAC

Após cultivo em monocamada, quantidade definidas de células para cada experimento foram suspensas em matriz Geltrex (Life Technologies) à 33% com a adição de concentrações crescentes de colágeno do tipo I de 1mg/mL à 4mg/mL (Life Technologies), estabelecendo-se a proporção de 1:1. A gelificação da cultura com matriz extracelular composta apenas por solução de Geltrex à 33% ou com adição de colágeno do tipo I ocorreu em 1 hora, em atmosfera à 37°C e 5% de CO₂. Já a cultura com matriz composta apenas por colágeno do tipo I à 2mg/mL ocorreu em 25 à 45 minutos, em atmosfera à 37°C e 5% de CO₂. Após gelificação, o meio completo correspondente foi adicionado. O meio completo foi trocado a cada 48 horas até 12º dia de cultivo.

3.1.4 Cultura Líquida de Bactérias

As bactérias da cepa DH5alpha já transformadas e contendo o plasmídeo pEGFP-LC3 (Addgene) de interesse foram inoculadas em cultura líquida de Luria Broth (LB) contendo 50µg/mL de canamicina (Sigma-aldrich). Uma vez inoculadas, as bactérias foram submetidas à agitação de 250 rpm à 37°C durante 12 - 18 horas. O controle negativo de crescimento bacteriano foi estabelecido a partir de recipiente contendo apenas o meio LB.

3.2 TRANSFEÇÃO CELULAR

3.2.1 Extração de DNA Plasmidial

A extração de DNA foi procedida com a utilização do kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) e segundo protocolo proposto pelo fabricante. Uma vez estabelecida a cultura bacteriana contendo o plasmídeo de interesse, os tubos com a cultura foram centrifugados à 8000rpm por 3 minutos à T.A. O pellet formado foi ressuspensionado em tampão P1 contendo RNase e transferido para microtubo de 1,5mL. Ao microtubo, adicionou-se 250µl de tampão P2 misturando o conteúdo 4-6 vezes por até 5 minutos. Foi adicionado 350µl de tampão N3 ao tubo, o qual foi vertido 4-6 vezes e centrifugado à 13000rpm por 10 minutos à T.A. O pellet foi

descartado e o sobrenadante disposto em coluna de separação molecular, sendo centrifugado em rotação máxima por 1 minuto. A coluna foi lavada com 750µl de tampão PE e a etapa de centrifugação rápida foi repetida duas vezes. Posicionou-se a coluna em novo microtubo e o DNA foi eluído com 50µl de tampão EB. O DNA extraído foi armazenado em -20°C por até 1 mês e em -80°C à longo prazo.

3.2.2 Otimização da Transfecção

Para transfecção com DNA plasmidial, $1,5 \times 10^4$ células foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas nas condições de cultivo no item 4.1. Quando as células atingiram a confluência de 60-70%, os poços foram lavados 2 vezes com 500µl de DPBS (Life Technologies) e, em seguida, incubadas com o plasmídeo encapsulado em lipofectamina 2000 (Thermo Fisher) e diluído em 500µl de meio Opti-men (Invitrogen) livre de antibiótico e antimicótico. Com a finalidade de determinar a proporção DNA/lipofectamina necessária para um maior índice de transfecção celular, as proporções de 1µg de plasmídeo para 2µl, 3,5µl e 5µl de lipofectamina (diluídos em 50µl de Opti-men) foram testadas. Após 20 minutos de incubação à T.A. a solução contendo o plasmídeo foi adicionada aos poços e a cultura retornou à incubação à 37°C por 6 horas. Passado o tempo de incubação, o meio Opti-men foi substituído por meio completo e as células foram mantidas em cultura para “recuperação” por 24 horas.

3.2.3 Silenciamento de Galectina-3

Para o silenciamento de Gal-3 em cultura bidimensional, 2×10^5 células foram semeadas em placas de seis poços e incubadas nas condições normais de cultura até atingir uma confluência de 60 – 70%. Na preparação do siRNA, 6µl de siRNA (h) (Santa Cruz Biotechnology) e 6µl do reagente de transfecção (Santa Cruz Biotechnology) foram diluídos em 100µl de Opti-men (Invitrogen) cada. As soluções foram misturadas delicadamente com auxílio de pipeta e incubadas à T.A. por 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes com 2mL de DPBS (Life Technologies) e incubadas em 800µl de Opti-men. Passado o tempo necessário à incubação do siRNA, 200µl da solução foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas à 37°C por 6 horas. Em seguida, foi adicionado 1mL de meio completo contendo 20% de SFB por poço e retornada a incubação por 24 horas. Após o tempo de “recuperação” os demais experimentos puderam ser realizados.

3.3 ENSAIO DE EXPOSIÇÃO À HIPÓXIA E PRIVAÇÃO NUTRICIONAL

Uma vez semeadas em quantidades específicas de acordo com a finalidade do experimento, as linhagens foram submetidas às condições de normóxia ou hipóxia associadas ou não à privação de nutrientes, durante 24 horas. Três condições de privação nutricional, as quais variaram em concentração de soro e composição do próprio meio foram testadas: D1, formado por solução de DMEN com adição de 1% de SFB; D0 formado apenas pelo meio DMEN; e NDM, meio privado de nutrientes composto de 265 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/L de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/L de KCl, 200 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6400 mg/L de NaCl, 3500 mg/L NaHCO_3 , 125 mg/L de NaH_2PO_4 , 15 mg/L de vermelho fenol e 25 mmol/L de tampão HEPES (pH 7,4), suplementado com solução de vitamina de MEM (Life Technologies). Após terem sido determinadas as condições de privação mais eficazes para o estudo, sendo elas D1 para PANC-1 e NDM para Mia PaCa-2, no tempo de 24h, o fator concentração de oxigênio foi adicionado como característica relevante. Para o estabelecimento de um microambiente hipóxico, um fluxo circular de 19 L/min de gás nitrogênio e 5 L/min de gás carbônico foi mantido por 10 minutos em câmara de hipóxia (Billupus-Rothenberg) obtendo-se uma atmosfera com 95% de N_2 e 5% de CO_2 , sendo PO_2 menor ou igual à 1%. Deste modo, foi possível realizar condições simultâneas de privação nutricional e hipóxia. As condições experimentais do estudo foram denominadas de acordo com a presença de oxigênio (N ou H) e a porcentagem de soro fetal bovino (10, 1 ou 0), sendo quatro para PANC-1 (N10, N1, H10 e H1) e quatro para Mia PaCa-2 (N10, N0, H10 e H0) (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação das Condições Experimentais.

Sigla	Condição
N10	Normóxia com DMEN + 10% SFB
N1	Normóxia com DMEN + 1% SFB – PANC-1
N0	Normóxia com NDM – Mia PaCa-2
H10	Hipóxia com DMEN + 10% SFB
H1	Hipóxia com DMEN + 1% SFB – PANC-1
H0	Hipóxia com NDM – Mia PaCa-2

Fonte: próprio autor.

3.4 TÉCNICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

3.4.1 Caracterização do Crescimento 3D

Para a microscopia óptica em campo claro, 1×10^3 células foram plaqueadas/suspensas, em triplicata, em placas de 8 poços com fundo de lâmina. As linhagens foram suspensas em matriz Geltrex à 33% com a adição de concentrações crescentes de colágeno do tipo I, estabelecendo-se 6 situações: cultivo em matriz composta apenas por solução de Geltrex à 33%; cultivo em matriz composta por solução de Geltrex à 33% e colágeno tipo I à 1mg/mL; à 2mg/mL; à 3mg/mL; à 4mg/mL; e cultivo em matriz composta apenas por colágeno do tipo I à 2mg/mL. A aquisição de imagens foi realizada a cada 48 horas, sendo fotografados 10 campos de cada poço (monoplicata), no aumento de 400x. As imagens foram obtidas através do Microscópio Invertido Time-Lapse Zeiss Axio Observer.Z1.

3.4.2 Imunofluorescência de Cultivo Bidimensional

A imunofluorescência foi realizada nas células em monocamada pós transfecção com DNA plasmidial. Após incubação experimental, as células aderidas em lamínulas foram fixadas com uma solução de paraformaldeído à 4%, sacarose à 4% e Triton X-100 à 0,6% por 20 minutos à T.A. As células foram então lavadas três vezes com PBS 0,1M pH 7,4 (solução de lavagem) e incubadas por 5 minutos com solução de PBS 0,1M + Tween 20 0,1%. Mais uma vez, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem. Após, foram incubadas com solução bloqueadora (BSA à 3%, Triton X-100 à 0,8%, em PBS 0,1M pH 7,4) por 1 hora à T.A. Após fixação, permeabilização e bloqueio, as células foram incubadas em solução de BSA à 1% em PBS 0,1 M pH 7,4 com adição dos anticorpos primários (1:50) e faloidina conjugada à Alexa 546 ou 647 (Thermo Fisher) por 12-16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com solução de lavagem e incubadas em solução de BSA à 1% em PBS 0,1 M pH 7,4 com adição de anticorpo secundário conjugado a Alexa 488, 546 ou 647 (Invitrogen) na diluição de 1:2000 e DAPI (Invitrogen) por 1 hora à T.A. Após incubação, os passos de lavagem foram repetidos e as lâminas foram montadas com meio de montagem a base de glicerol. A imagens foram obtidas no aumento de 400x através do Microscópio Confocal Upright Zeiss LSM780-NLO.

3.4.3 Imunofluorescência de Cultivo Tridimensional

Para formação dos esferoides, 1×10^3 células foram plaqueadas/suspensas por poço em placas de 8 poços com fundo de lâmina. Após incubação experimental, os esferoides foram fixadas com uma solução de paraformaldeído à 4%, sacarose à 4% e Triton X-100 à 0,6%, pré-aquecida à 37°C, por 20 minutos à T.A. As células foram então lavadas três vezes de 10 minutos com PBS 0,1M pH 7,4 (solução de lavagem) e incubadas por 5 minutos com solução de PBS 0,1M + Tween 20 0,1%. Mais uma vez, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de lavagem. Após, foram incubadas com solução bloqueadora (BSA à 3%, Triton X-100 à 0,8%, em PBS 0,1M pH 7,4) por 2 horas à T.A. Após fixação, permeabilização e bloqueio, as células foram incubadas em solução de BSA à 1% em PBS 0,1 M pH 7,4 com adição dos anticorpos primários (1:50) e faloidina conjugada à Alexa 546 ou 647 (Thermo Fisher) por 12-16 horas a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, as células foram lavadas 3 vezes com solução de PBS-Tween 20 à 0,5% por 10 minutos e incubadas em solução de BSA à 1% em PBS 0,1 M pH 7,4 com adição de anticorpo secundário conjugado a Alexa 488, 546 ou 647 (Invitrogen) na diluição de 1:2000 e DAPI (Invitrogen) por 1 hora à T.A. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes PBS-Tween 20 à 0,5% e mais 3 vezes com solução de lavagem, por 10 minutos cada. As lâminas foram montadas com meio de montagem a base de glicerol. As imagens foram obtidas no aumento de 200x através do Microscópio Confocal Upright Zeiss LSM780-NLO.

3.5 TÉCNICAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

3.5.1 Fixação e Processamento de Cultura Bidimensional para MET Convencional

Para a realização da MET, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços com lamínulas redondas de vidro posicionadas no fundo dos mesmos. Após submissão das condições experimentais, as células em monocamadas foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% recém diluído em tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM por 5 minutos à T.A. seguido por 1 hora no gelo. Após, as amostras foram lavadas 3 vezes por 2 minutos cada com tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM no gelo. Em sequência, foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 30 minutos no gelo e contrastadas com acetato de uranila 2% aquoso (filtrado antes do uso) overnight à 4°C. Após 12 – 16 horas, as amostras foram lavadas com água milliQ 3 vezes por 5 minutos cada em gelo e desidratadas em concentração crescente de etanol (20%,

50%, 70%, 80%, 90% e 2x 100%), por 30 minutos cada, no gelo. Foi realizada uma etapa adicional de etanol 100% à TA por 30 minutos. Em seguida, foi iniciada a embebição em resina Epon e etanol (1:1) à T.A. por 30 minutos sob agitação e depois 4 a 5 trocas completas (1 hora cada, sendo uma delas overnight, pelo menos) de resina Epon pura à T.A. Após 12h – 16h, foi trocada a solução de resina Epon pura 2 vezes e as amostras permaneceram à 60°C em estufa controlada por 60 – 72 horas para polimerização completa. Após polimerização e trimagem dos blocos, cortes ultrafinos de 70nm foram obtidos no ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica Microsystems), coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila aquoso 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo de Reynolds por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em MET Leo 906-Zeiss do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.5.2 Fixação e Processamento de Cultura Tridimensional para MET Convencional

Para a realização da MET, 5×10^3 células foram suspensas em dois modelos de composição de matriz: um composto por Geltrex à 33% com adição de colágeno do tipo I e outro composto apenas por colágeno do tipo I à 2mg/mL. Após formação dos esferoides e submissão das condições experimentais, os esferoides suspensos na matriz foram fixados com solução de glutaraldeído 2,5% recém diluído em tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM por 5 minutos à T.A. seguido por 1 hora no gelo. Após, as amostras foram lavadas 3 vezes por 2 minutos cada com tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM no gelo. Em sequência, foi realizada a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M e CaCl_2 3mM e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 30 minutos no gelo e contrastadas com acetato de uranila 2% aquoso (filtrado antes do uso) overnight à 4°C. Após 12 – 16 horas, as amostras foram lavadas com água milliQ 3 vezes por 5 minutos cada em gelo e desidratadas em concentração crescente de etanol (20%, 50%, 70%, 80%, 90% e 2x 100%), por 30 minutos cada, no gelo. Foi realizada uma etapa adicional de etanol 100% à TA por 30 minutos. Em seguida, foi iniciada a embebição em acetona começando com solução de acetona e etanol (1:1) por 20 minutos, e depois duas embebições em acetona 100% por 20 minutos cada. As amostras foram embebidas em soluções de acetona e resina Epon 3:1, 1:1 e 1:3, à T.A. por 30 minutos sob agitação e depois 4 a 5 trocas completas (1 hora cada, sendo uma delas overnight, pelo menos) de resina Epon pura à T.A. Após 12h – 16h, foi trocada a solução de resina Epon pura 2 vezes e as amostras permaneceram à 60°C em estufa controlada por 60 – 72 horas para polimerização completa. Após polimerização e trimagem dos blocos, cortes ultrafinos de 70nm foram obtidos no

ultramicrotomo Ultracut UCT (Leica Microsystems), coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila aquoso 2% durante 20 minutos e citrato de chumbo de Reynolds por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram estudados e micrografados em MET Leo 906-Zeiss do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

3.6.1 Extração Proteica de Cultura Bidimensional

As células foram previamente lavadas duas vezes com PBS 1x gelado e lisadas com tampão RIPA com 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich). A monocamada foi removida com o uso de um raspador pequeno, e seus fragmentos inseridos em microtubos de 1,5mL. Em seguida, os microtubos foram incubados em gelo por 30 minutos, sendo centrifugados a cada 5 minutos. As amostras foram centrifugadas à 13000 rpm por 20 minutos à 4°C e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado à -20°C por até 1 semana ou -80°C por mais tempo. A quantificação de proteínas foi realizada com o kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas (Bio-RAD) no comprimento de onda de 595nm.

3.6.2 Extração Proteica de Cultura Tridimensional

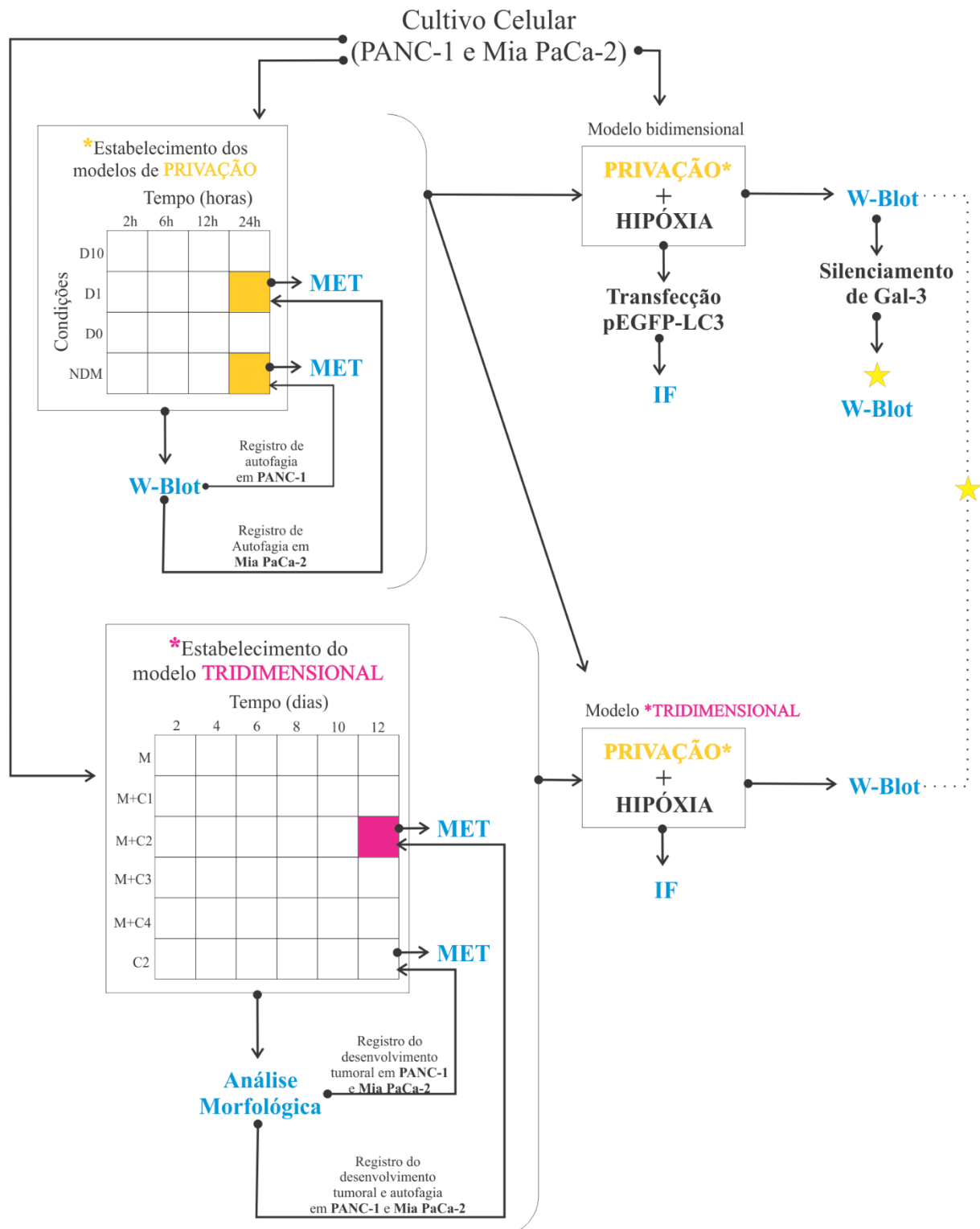
Para que a matriz extracelular fosse desfeita sem provocar o desarranjo dos esferoides, adicionou-se 1mL de solução de PBS-EDTA 5% à 4°C nos poços e misturado delicadamente com auxílio de pipeta. O conteúdo dos poços foi coletado e centrifugado à 600g por 5 minutos à 4°C em tubos falcon de 15mL. Esta etapa de lavagem com PBS-EDTA foi repetida por 3 – 4 vezes. Em seguida, os pellets foram transferidos para microtubos de 1,5mL e a extração foi prosseguida de acordo com o item 4.6.1.

3.6.3 Western Blott

As amostras proteicas extraídas foram quantificadas e submetidas à eletroforese vertical em gel de acrilamida/bisacrilamida. O gel destinado à separação molecular contém Tris 0,375M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0,03% em N,N,N-tetra-

metilenodiamina (TEMED, Sigma) enquanto o gel de empilhamento é composto por TRIS 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, acrilamida 4%, APS 0,045%, e TEMED. A eletroforese foi realizada por 2 horas e 30 minutos com voltagem fixa de 100V à T.A. e seguida de transferência molhada para membrana de nitrocelulose (Hydrophobic polyvinilidene difluoride, Amersham - GE Healthcare Life Sciences), por 30 minutos com amperagem fixa de 4A à 4 °C. Após o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 5% (p/v) em PBS–Tween 0,5%, 1 hora à temperatura ambiente (T.A.), a membrana foi incubada com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio durante 12 – 16 horas sob agitação à 4°C. No dia seguinte, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado à Alexa 488, 546 ou 647 diluído na solução de bloqueio por 1 hora à T.A. A revelação foi feita no GE Typhoon Trio Plus Imager Scanner Fluorescence Chemiluminescent Trio+ Pred FLA (GE Healthcare).

FIGURA 14. Desenho Experimental do Estudo. O estabelecimento do modelo bidimensional de privação nutricional para cada linhagem foi confirmado por western blot e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Dois modelos de cultivo tridimensional foram selecionados por análise morfológica e submetidos às condições de privação nutricional, sendo posteriormente avaliadas por MET. Uma vez estabelecidos os modelos bi e tridimensional mais efetivos para o estudo do fenômeno autofágico, os mesmos foram submetidos a condições de privação nutricional associada ou não à hipóxia. As consequências sobre o processo autofágico e expressão das galectinas -1 e -3 foram analisadas através de western blot e imunofluorescência. O impacto da inibição da expressão de Gal-3 sobre o fluxo autofágico foi avaliado por western blot. D10 – DMEN + 10% SFB; D1 – DMEN + 1% SFB; D0 – DMEN; NDM – *Nutrient Deprived Medium*; M – Matriz; M+C1 – Matriz + Colágeno do tipo I à 1mg/mL; M+C2 – à 2mg/mL; M+C3 – à 3mg/mL; M+C4 – à 4mg/mL; C – Colágeno do Tipo I à 2 mg/mL; MET – Microscopia eletrônica de transmissão; W-Blot – Western blot; IF – Imunofluorescência; Laranja - Momentos de privação nutricional ; Rosa - Modelo tridimensional escolhido; Azul - Técnicas utilizadas para obtenção dos resultados; Estrelas - Principais resultados do estudo.



4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO MODELO TRIDIMENSIONAL

Com o intuito de caracterizar o crescimento tridimensional das linhagens representativas de tumor pancreático, PANC-1 e Mia PaCa-2, em modelo de matriz extracelular mimético, as células foram cultivadas suspensas em matriz composta por quantidades crescentes de colágeno do tipo I (0 à 4mg/ml). As figuras 1 e 2 exibem os painéis de crescimento, de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente, através dos quais é possível constatar a formação de esferoides em todas as composições de matriz.

Em termos de crescimento, as células PANC-1 formaram maiores esferoides quando cultivadas em matriz extracelular 33%, com 2mg/ml e 4mg/ml de colágeno do tipo I (Fig. 15A6, C6 e E6, respectivamente). Enquanto não houveram diferenças em termos de crescimento quanto aos esferoides formados por células de Mia PaCa-2 ao final dos 12 dias de cultivo (Fig. 16).

Os esferoides de PANC-1 formados em matriz com adição de colágeno à 2mg/ml (Fig. 15C1-C6) apresentaram superfícies internas côncavas, uma característica frequente para os esferoides de Mia PaCa-2 cultivados em matriz composta apenas por colágeno do tipo I. Estes esferoides, desenvolvidos em matriz composta apenas por colágeno à 2mg/ml, apresentaram um padrão de organização celular distinto, com células alinhadas em fileiras distinguíveis e justapostas (Fig. 16F5 e 16F6).

No que se refere à complexidade de superfície, foi possível observar a presença de prolongamentos celulares nos esferoides formados em composições de matriz com maior concentração de colágeno (Fig. 15D6, 15E4 - E6, 15F3 - F6 e Fig. 16C4, 16D4-D6, 16E3 - E6).

Uma vez que os esferoides de PANC-1 apresentaram maiores dimensões numa determinada composição de matriz e que ambas as linhagens promoveram padrões de organização celular distintos com o aumento da concentração do colágeno, dois modelos foram escolhidos para dar seguimento ao estudo. Os modelos de matriz, e por consequência de cultivo tridimensional, escolhidos foram aquele com adição de colágeno à 2mg/ml e o formado apenas por colágeno tipo I.

Figura 15. Estabelecimento de Modelo de Cultivo Tridimensional – PANC-1. Acompanhamento do crescimento tridimensional da linhagem PANC-1 em matriz extracelular composta por diferentes concentrações de colágeno tipo I. O registro das imagens foi realizado a cada 48h a partir do plaqueamento, totalizando 12 dias de experimentação. A1-A6) Crescimento dos esferoides em matriz sem adição de colágeno tipo I. B1-B6) Crescimento dos esferoides em matriz com adição de colágeno tipo I na concentração 1mg/mL; C1-C6) Crescimento à 2mg/mL; D1-D6) Crescimento à 3mg/mL; E1-E2) Crescimento à 4mg/mL; F1-F6) Crescimento em matriz composta apenas por colágeno tipo I à 2mg/mL. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

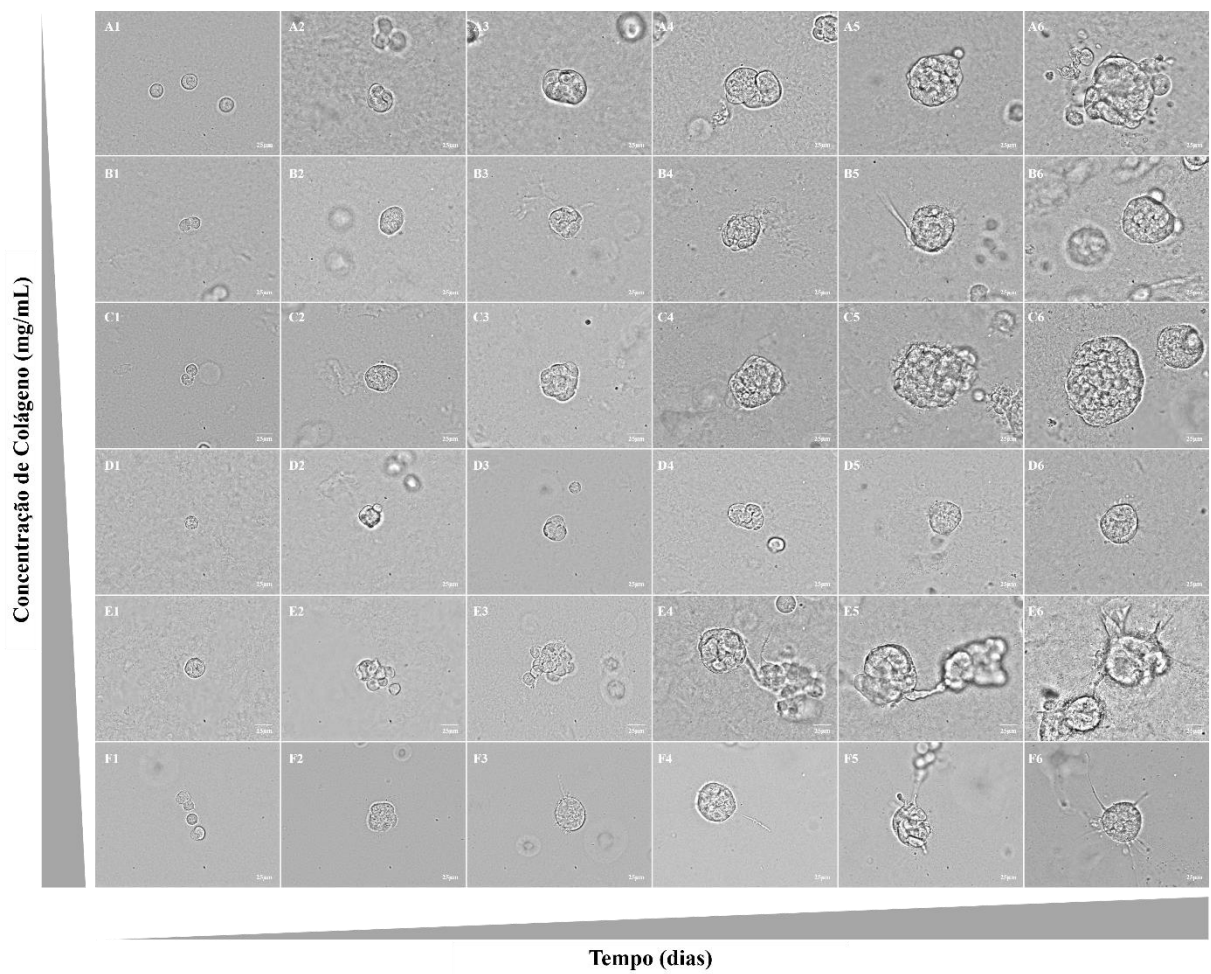
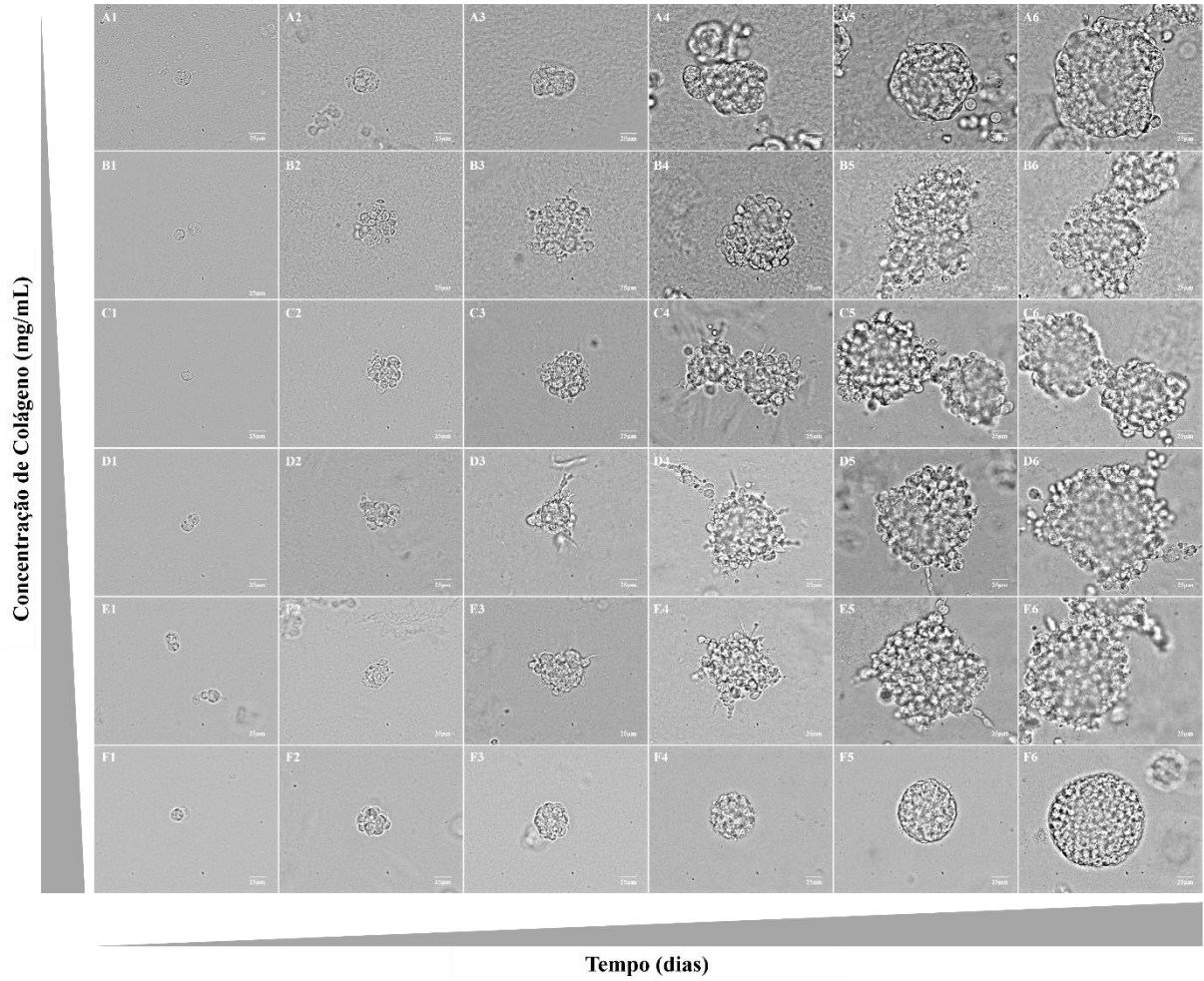


Figura 16. Estabelecimento de Modelo de Cultivo Tridimensional – Mia PaCa-2. Acompanhamento do crescimento tridimensional da linhagem Mia PaCa-2 em matriz extracelular composta por diferentes concentrações de colágeno tipo I. O registro das imagens foi realizado a cada 48h a partir do plaqueamento, totalizando 12 dias de experimentação. A1-A6) Crescimento dos esferoides em matriz sem adição de colágeno tipo I. B1-B6) Crescimento dos esferoides em matriz com adição de colágeno tipo I na concentração 1mg/mL; C1-C6) Crescimento à 2mg/mL; D1-D6) Crescimento à 3mg/mL; E1-E2) Crescimento à 4mg/mL; F1-F6) Crescimento em matriz composta apenas por colágeno tipo I à 2mg/mL. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.



4.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRIVAÇÃO NUTRICIONAL NA INDUÇÃO AUTOFÁGICA

Para determinar as condições mais eficazes na promoção do fenômeno autofágico celular durante as atividades experimentais, as linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas à distintos meios de privação nutricional por intervalos de tempo específicos. A privação de soro fetal bovino foi realizada de maneira parcial ou total, através da utilização de soluções de meio DMEN com adição de 1% de SFB (D1) ou sem adição (D0), respectivamente. A privação específica de aminoácidos e glicose foi realizada através do cultivo das linhagens de câncer pancreático em *nutriente deprived medium* (NDM). As durações dos cultivos em privação foram de 2, 6, 12 e 24 horas.

A densitometria das bandas de LC3I + LC3II, em referência à expressão da proteína normalizadora (β -actina), foi utilizada como parâmetro de mensuração do fluxo autofágico celular. Para PANC-1, a expressão de LC3 aumentou em duas situações experimentais: em D0 durante 2 horas, havendo um aumento de 26% na marcação em relação ao controle (D10) (Fig. 17A e 17C); e em D1 durante 24 horas, havendo aumento de 33% (Fig. 17B e 17D). O monitoramento da expressão proteica nas durações experimentais já especificadas possibilitou a avaliação da influência da privação nutricional sobre a marcação das galectinas -1 e -3. Em PANC-1, o aumento de Gal-3 acompanhou o aumento de LC3 (Fig. 17A e 17B). Nas condições D0 (2h) e D1 (24h), estes aumentos foram de 28% e 19%, respectivamente (Fig. 17C e 17D). A expressão de Gal-1 aumentou consideravelmente nas três condições de privação nutricional, D1 (3,99 vezes), D0 (4,65 vezes) e NDM (4,17 vezes) após 2 horas de cultivo em relação ao controle D10. No tempo de 6h, a expressão de Gal-1 nas situações de privação é semelhante ao controle, com exceção da expressão em NDM, que diminui 0,87 vez (Fig. 17A e 17C). Com 12 horas de privação nutricional, a expressão de Gal-1 apresenta aumento nas condições D1 (0,34 vez), D0 (0,33 vez) e NDM (0,21 vez). Após 24 horas, PANC-1 apresenta uma diminuição na expressão de Gal-1 em D1 (0,60 vez), em contraste à expressão de LC-3, além de D0 (0,99 vez) e NDM (0,21 vez), todos em referência ao controle D10 (Fig. 17B e 17D).

Para Mia PaCa-2, o aumento na expressão de LC3 ocorreu em todas as condições de privação nutricional, mas não em todas as durações experimentais. A manutenção do aumento na expressão do fator autofágico foi observada apenas na condição NDM, a partir das 6 horas de incubação. Nesta condição, houve aumento de 0,40 vez na expressão de LC3 em 24h de cultivo (Fig. 18A – 18D). O aumento de Gal-3 ocorreu nas três situações de privação nutricional, D1 (0,48 vez), D0 (0,64 vez) e NDM (0,78 vez), após 12 horas de cultivo.

Entretanto, apenas nas condições D1 (0,29 vez) e D0 (0,25 vez) a expressão de Gal-3 permanece maior) no tempo de 24h (Fig. 18B e 18D). Todas as variações foram analisadas em relação ao controle D10. A submissão de Mia PaCa-2 à privação nutricional na condição NDM provocou aumento da expressão de Gal-1 nos tempos de 6h (6,08 vezes) e 24h (2,84 vezes). Outros aumentos foram observados nas condições D1 (0,98 vez) e D0 (0,54 vez) após 6 horas; D1 (0,36 vez) após 12 horas; e D0 (0,55 vez) após 24 horas. Diminuições na expressão de Gal-1 foram observadas nas condições D0 (0,22 vez) e NDM (0,28 vez) após 2 horas de privação e D0 (0,31 vez) após 12 horas de privação, em relação ao controle D10 de cada tempo experimental (Fig. 18A-18F).

Em ambas as linhagens, houve aumento da expressão de LC3 na condição D0 após 2 horas de privação. Aumento de Gal-3 foi observado nas condições D0 e D1 na duração de 24 horas e aumento de Gal-1 na condição D1 após 24 horas, também em ambas as linhagens. Baseando-se no perfil de expressão de LC3 por PANC-1 e Mia PaCa-2 após 24 horas de privação nutricional, as condições D1 e NDM foram escolhidas para indução da autofagia nos experimentos subsequentes com as respectivas linhagens.

Figura 17. Caracterização da Privação Nutricional – PANC-1. Avaliação da modulação dos marcadores autofágicos e das galectinas -1 e -3, na linhagem PANC-1, submetida a diferentes condições de privação de nutrientes. A e B) Marcações proteicas após incubação das células durante 2 e 6 horas, e 12 e 24 horas, respectivamente. C e D) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-3 em comparação à LC3 nas durações experimentais de 2h e 6h, e 12h e 24h, respectivamente. E e F) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-1 em comparação à LC3 nas durações experimentais de 2h e 6h, e 12h e 24h, respectivamente. D10 – solução de DMEN contendo 10% de SFB; D1 – solução de DMEN contendo 1% de SFB; D0 – solução de DMEN sem adição de SFB; NDM - *nutrient-deprived médium*; HT – HT1080, linhagem de câncer de cólon e controle positivo para a marcação de LC3.

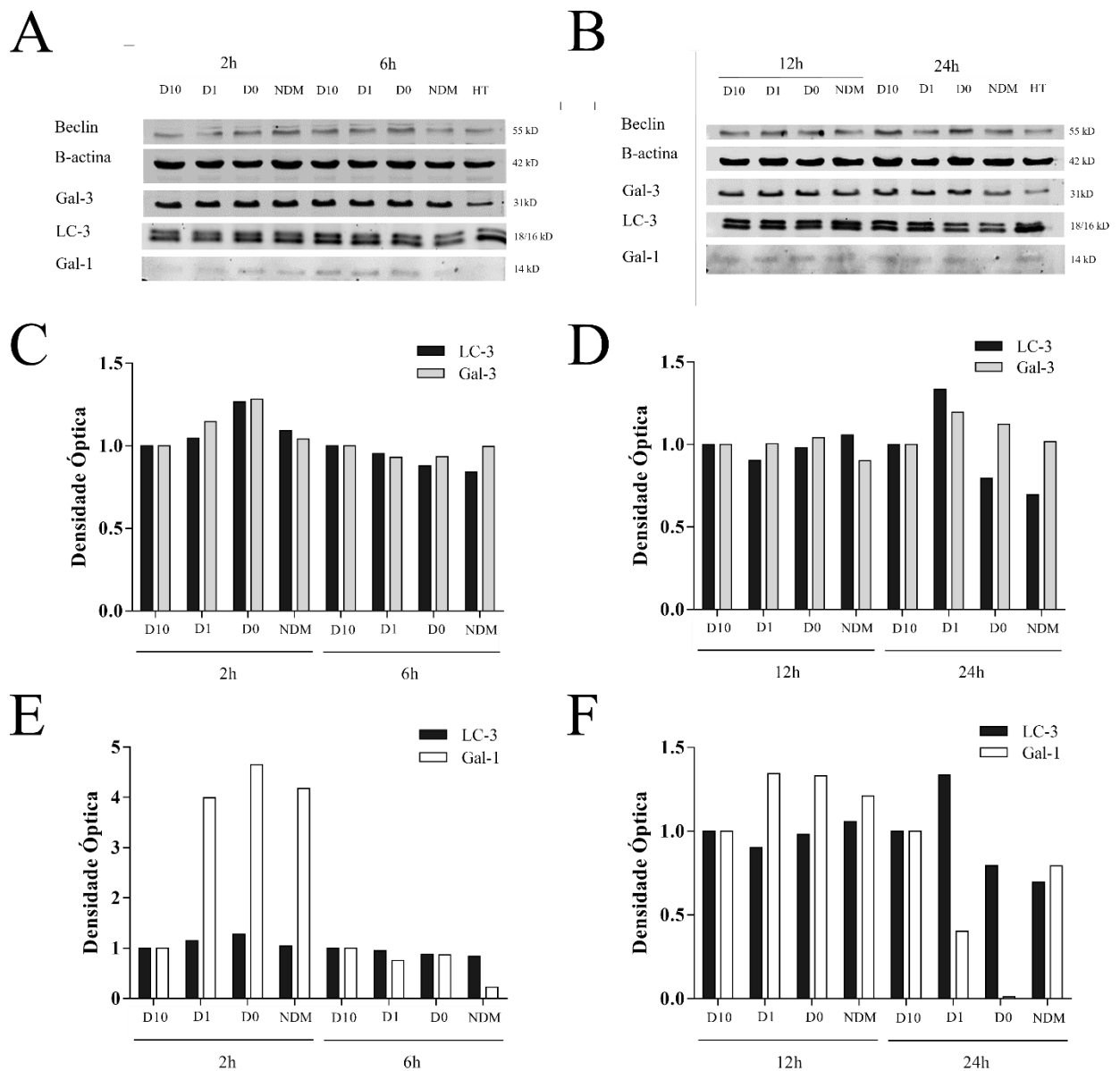
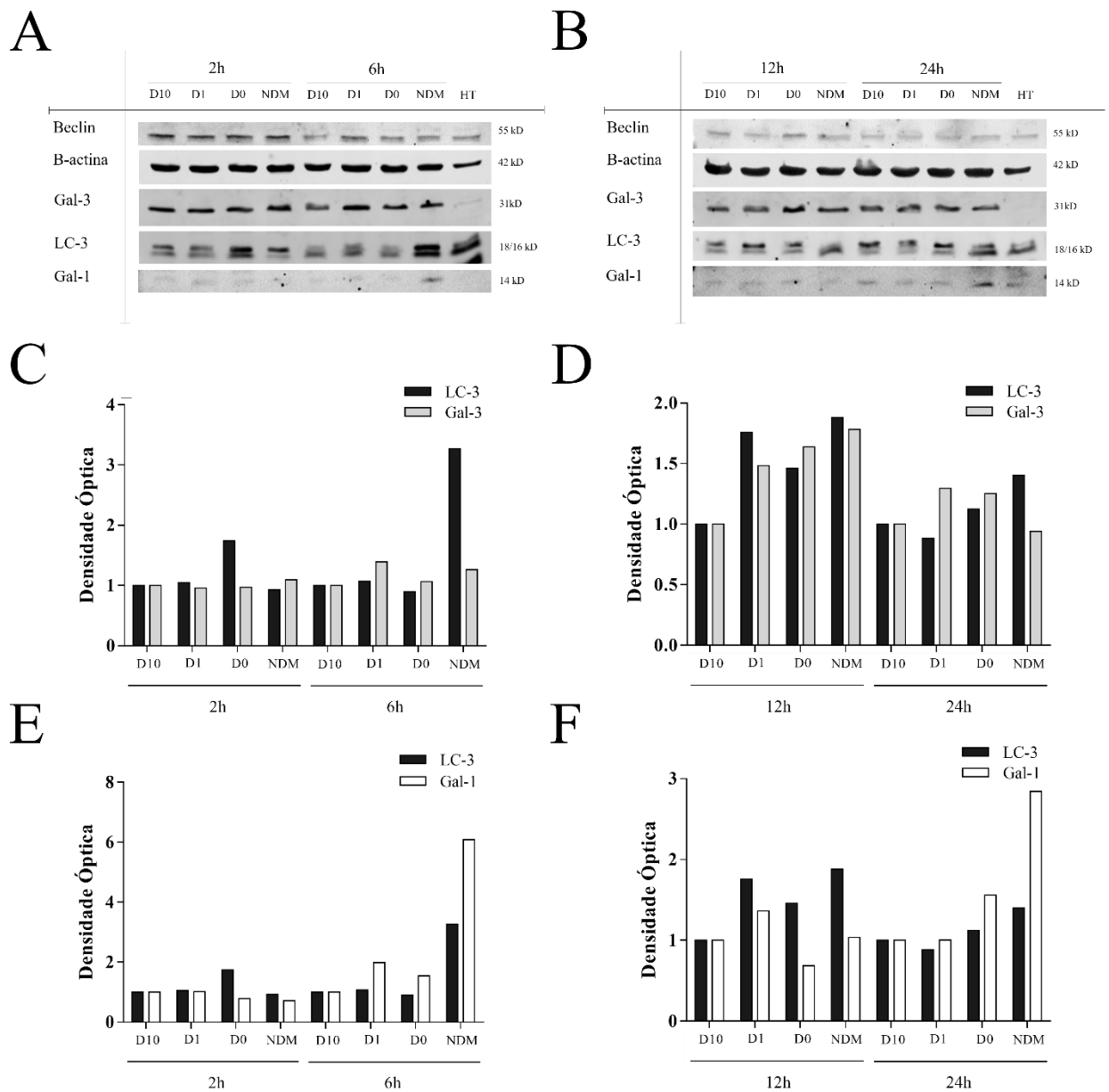


Figura 18. Caracterização da Privação Nutricional – Mia PaCa-2. Avaliação da modulação de marcadores autofágicos e das galectinas -1 e -3, na linhagem Mia PaCa-2, submetida a diferentes condições de privação de nutrientes. A e B) marcações proteicas após incubação das células durante 2 e 6 horas, e 12 e 24 horas, respectivamente. C e D) densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-3 em comparação à LC3 nas durações experimentais de 2h e 6h, e 12h e 24h, respectivamente. E e F) densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-1 em comparação à LC3 nas durações experimentais de 2h e 6h, e 12h e 24h, respectivamente. D10 – solução de DMEN contendo 10% de SFB; D1 – solução de DMEN contendo 1% de SFB; D0 – solução de DMEN sem adição de SFB; NDM - *nutrient-deprived médium*; HT – HT1080, linhagem de câncer de cólon e controle positivo para a marcação de LC3.



4.3 DETERMINAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL E COMPROVAÇÃO DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA

Neste momento, objetivou-se: comprovar a indução autofágica em cultura bidimensional, a partir das condições de privação determinadas por western blot; e determinar o modelo de composição de matriz extracelular que seria mais efetivo em possibilitar simultaneamente a formação dos esferoides, a partir das linhagens de tumor pancreático, e a indução autofágica nas mesmas condições de privação testadas no modelo bidimensional.

Para isto, as linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas ao cultivo em privação nutricional por 24h nas condições D1 e NDM, respectivamente. Em seguida, a quantificação dos vacúolos autofágicos iniciais (AVis), vacúolos autofágicos de degradação (AVds) e lisossomos por microscopia eletrônica de transmissão permitiu a verificação da indução autofágica nos modelos de cultivo bi e tridimensional.

No cultivo bidimensional foi possível realizar a quantificação de organelas relacionadas à autofagia em 9 campos aleatórios dos cortes para ambas as linhagens. Tanto em PANC-1, quanto em Mia PaCa-2, a diferença entre as quantidades mediadas de AVis+AVds e lisossomos nas células privadas e não-privadas de nutrientes foi estatisticamente significativa (Fig. 19A e 19B).

Em D1, PANC-1 apresentou uma mediana de AVis+AVds (9,00 IQR 14,50 – 4,50) e lisossomos (5,00 IQR 11,00 – 2,50) maior em comparação à D10, cujas quantidades medianas foram de 1,50 (IQR 4,50 – 0,00) e 3,00 (IQR 4,00 – 0,00), respectivamente. Tais diferenças foram estatisticamente significativas com os respectivos $p = 0,0035$ e $p = 0,0461$ (Fig. 19C e 19D). Para Mia PaCa-2 também houve aumento da presença de AVis+AVds (10,00 IQR 12,00 – 8,00) e lisossomos (5,00 IQR 8,50 – 2,00) em NDM. Em D10, a quantidade de AVis+AVds foi menor e igual à 7,00 (IQR 8,00 – 4,00) e lisossomos igual à 1,00 (IQR 2,00 – 0,00), sendo as diferenças significativas e com $p = 0,0362$ e $p = 0,0029$ (Fig. 19E e 19F).

Dois modelos de composição de matriz foram avaliados quanto à indução autofágica e em ambos houveram diferenças na quantidade de vacúolos autofágicos.

O primeiro modelo de cultivo tridimensional é formado por uma matriz com adição de colágeno do tipo I à 2mg/mL. Neste modelo foi possível realizar a quantificação de organelas relacionadas à autofagia em 9 campos aleatórios dos cortes para ambas as linhagens (Fig. 20A e 20B). Para PANC-1, as quantidades medianas de AVis+AVds e lisossomos em D1 foram iguais à 15,00 (IQR 20,75 – 12,75) e 17,00 (IQR 29,25 – 4,75), respectivamente. Enquanto em D10, as medianas de AVis+AVds e lisossomos foram iguais à 10,00 (IQR 11,00 – 5,00) e 2,00

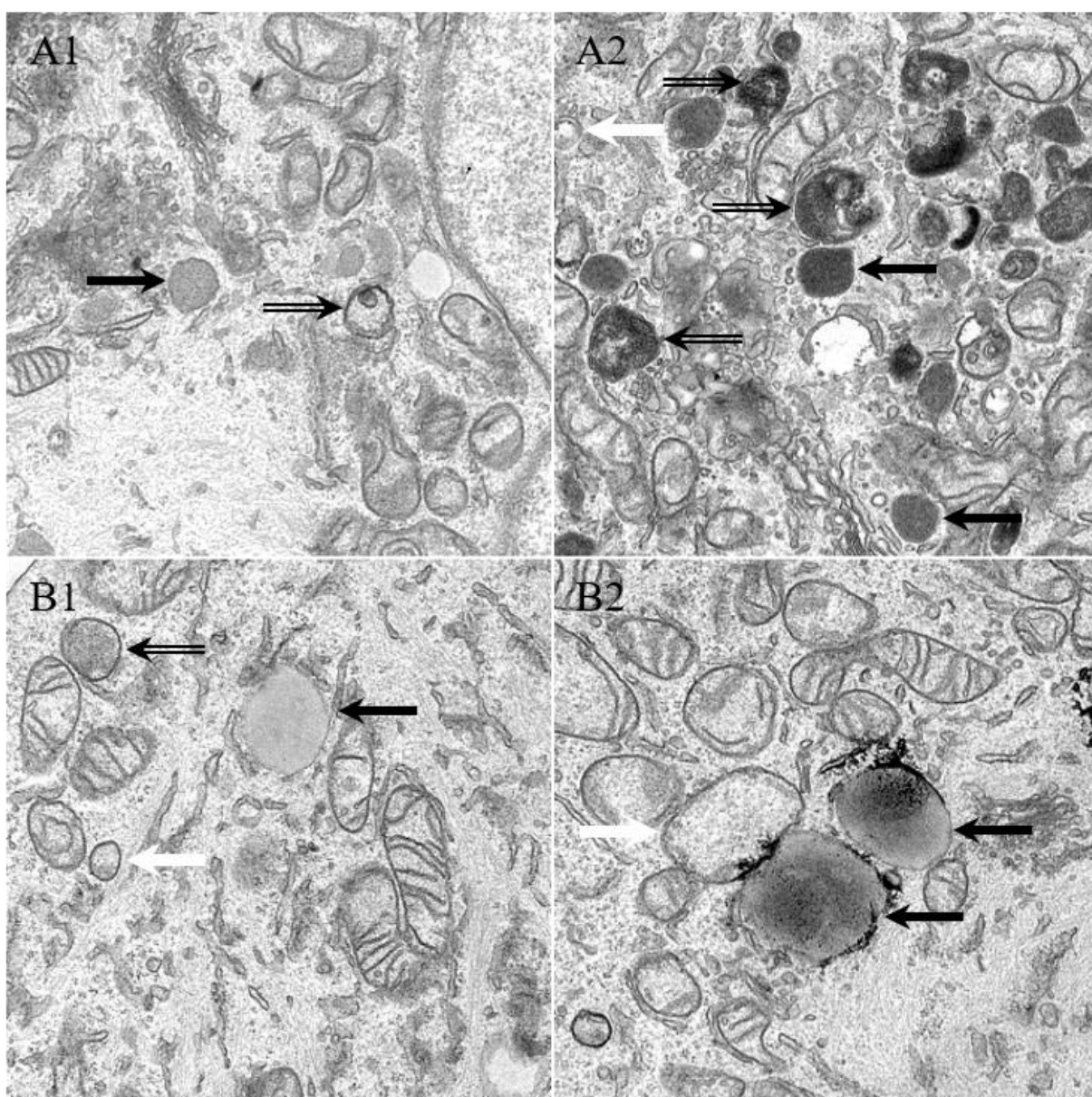
(IQR 3,00 – 1,00), respectivamente. Tais aumentos em D1 foram estatisticamente significativos, com os respectivos $p = 0,0166$ e $p = 0,0012$ (Fig. 20C e 20D). Para Mia PaCa-2 o aumento em D1 se repete e as medianas de AVis+AVds e lisossomos em NDM foram iguais à 15,00 (IQR 19,00 – 10,00) e 6,00 (IQR 11,00 – 4,00). Em D10, as medianas de AVis+AVds e lisossomos foram iguais à 4,00 (IQR 8,75 – 3,00) e 2,50 (IQR 4,00 – 1,00). Os aumentos em NDM foram estatisticamente significativos, com os respectivos $p = 0,0002$ e $p = 0,0434$ (Fig. 20E e 20F).

O segundo modelo de cultivo tridimensional é formado por matriz composta apenas de colágeno do tipo I à 2mg/mL. Neste modelo, foi possível realizar a quantificação de organelas relacionadas à autofagia em 9 campos randômicos dos cortes para PANC-1 e 4 campos dos cortes para Mia PaCa-2 (Fig. 21A e 21B). Para PANC-1, as quantidades medianas de AVis+AVds e lisossomos em D1 foram iguais à 15,00 (IQR 22,00 – 14,00) e 9,00 (IQR 14,00 – 5,00), respectivamente. Enquanto em D10, as medianas de AVis+AVds e lisossomos foram iguais à 8,00 (IQR 12,00 – 5,50) e 9,00 (IQR 9,50 – 0,50), respectivamente. Como descrito, PANC-1 apresentou aumento da quantidade de vacúolos autofágicos em D1 ($p = 0,0122$) mas não houve variação significativa referente à contagem de lisossomos ($p = 0,1813$) (Fig. 21C e 21D). Para Mia PaCa-2, as medianas de AVis+AVds e lisossomos em NDM foram iguais à 66,50 (IQR 113,50 – 24,75) e 12,00 (IQR 18,75 – 7,50). Em D10, as medianas de AVis+AVds e lisossomos foram iguais à 13,00 (IQR 17,75 – 6,00) e 13,00 (IQR 24,75 – 6,50). Assim como PANC-1, Mia PaCa-2 apresentou aumento da quantidade de vacúolos autofágicos em NDM ($p = 0,0286$) mas não houve variação significativa referente à contagem de lisossomos ($p = 0,9714$) (Fig. 21E e 21F).

Dois modelos de composição de matriz para cultivo tridimensional foram avaliados quanto à reprodução da indução autofágica observada em cultura bidimensional. Em ambos os modelos, a quantidade mediana de AVis+AVds, nas condições de privação nutricional, foi maior que no modelo bidimensional.

Nos resultados obtidos com ambas as linhagens de câncer pancreático, os esferoides que cresceram em matriz com adição de colágeno à 2mg/mL apresentaram maior diferença na contagem das organelas autofágicas, quando comparamos a situação de privação e controle. Portanto, este modelo de matriz extracelular foi escolhido para as atividades subsequentes.

Figura 19. Organização Celular Autofágica – Cultivo Bidimensional. Microscopia eletrônica de transmissão das linhagens de câncer pancreático, submetidas à privação nutricional por 24 horas. A1) PANC-1 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). A2) PANC-1 cultivada em solução de DMEN com 1% de SFB (D1). B1) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). B2) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio NDM (NDM). C e E) Diferença significativa entre as quantidades medianas de organelas autofágicas em 9 campos aleatórios de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente. D e F) Diferença significativa entre as quantidades medianas de lisossomos em 9 campos aleatórios de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente. Flechas brancas – AVis, vacúolos autofágicos iniciais; Flechas pretas – Lisossomos; Flechas pretas vasadas – AVds – vacúolos autofágicos de degradação.



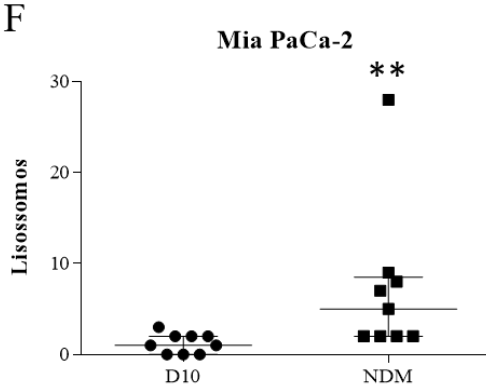
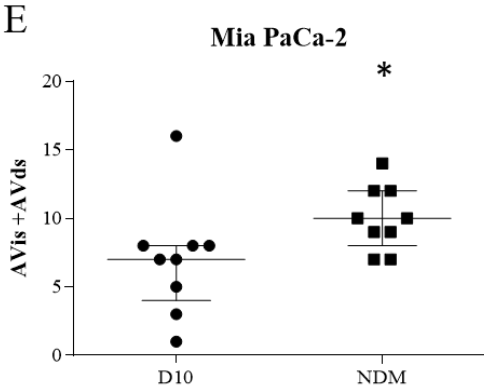
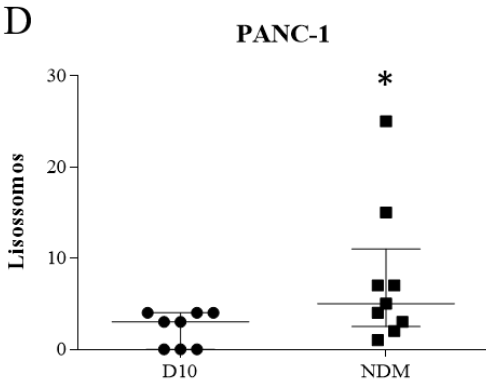
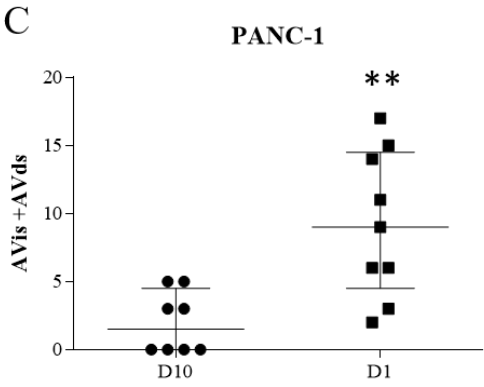
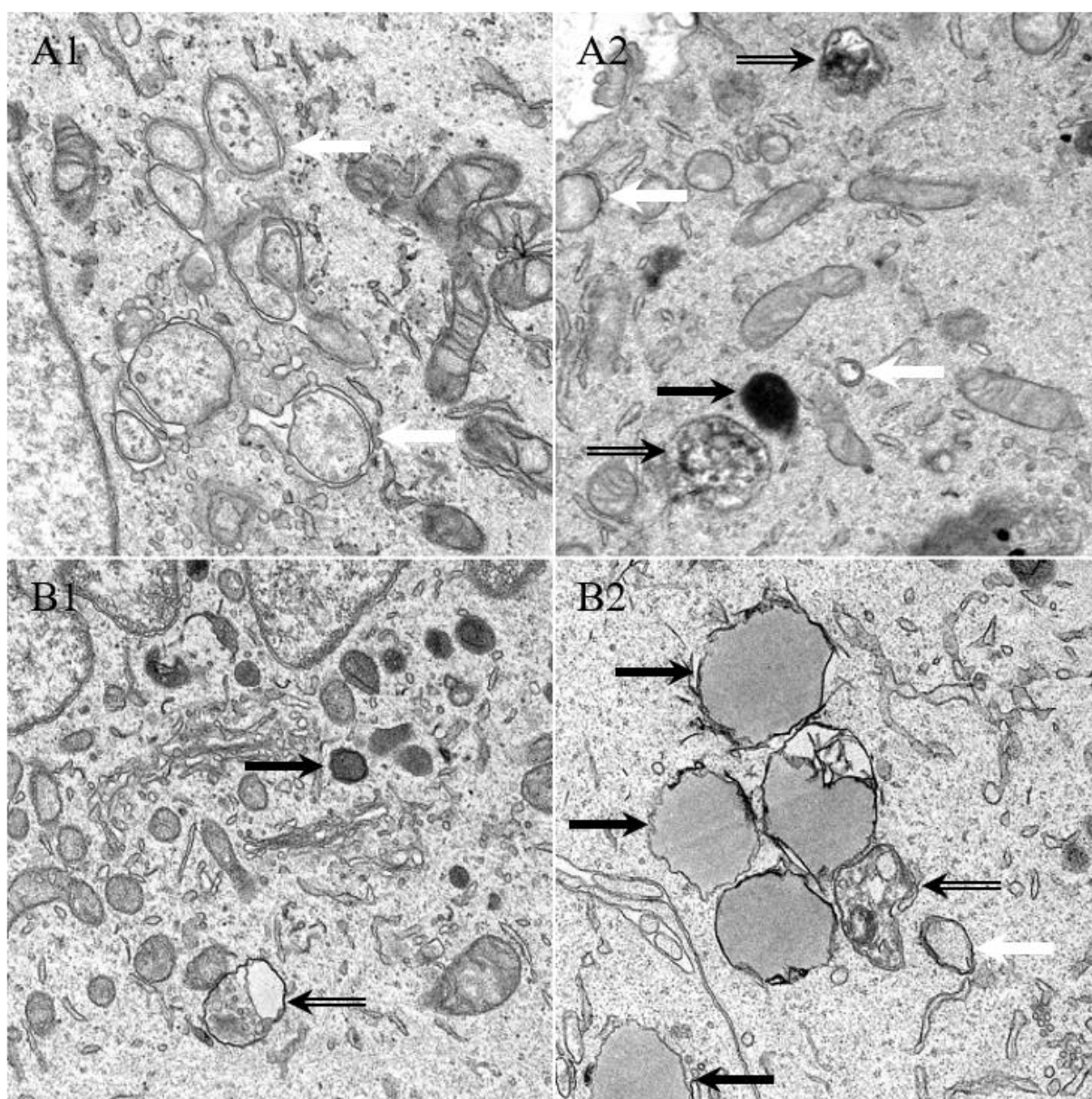


Figura 20. Organização Celular Autofágica – Cultivo Tridimensional I. Microscopia eletrônica de transmissão dos esferoides formados pelas linhagens de câncer pancreático, submetidos à privação nutricional por 24 horas. Neste modelo, os esferoides cresceram em matriz extracelular com adição de colágeno tipo I à 2mg/mL. A1) PANC-1 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). A2) PANC-1 cultivada em solução de DMEN com 1% de SFB (D1). B1) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). B2) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio NDM (NDM). C e E) Diferença significativa entre as quantidades medianas de organelas autofágicas em 9 campos aleatórios de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente. D e F) Diferença significativa entre as quantidades medianas de lisossomos em 9 campos aleatórios de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente. Flechas brancas – AVIs, vacúolos autofágicos iniciais; Flechas pretas – Lisossomos; Flechas pretas vasadas – AVds – vacúolos autofágicos de degradação.



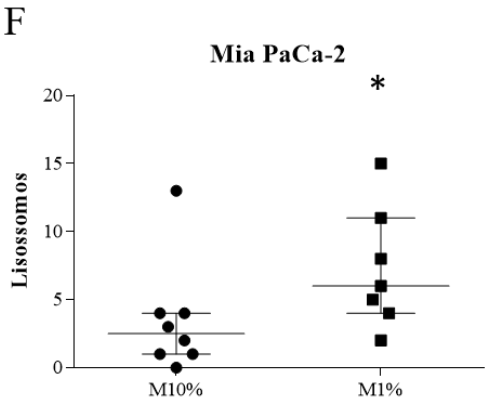
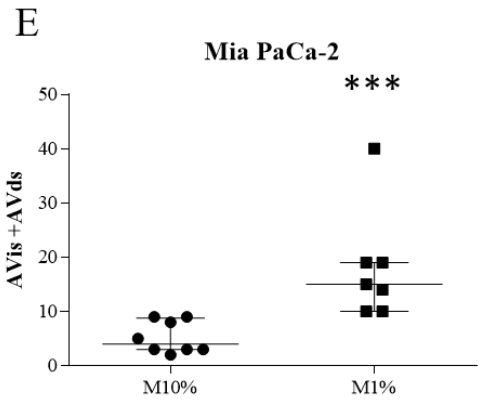
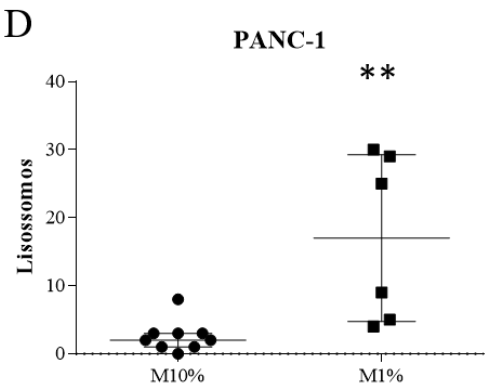
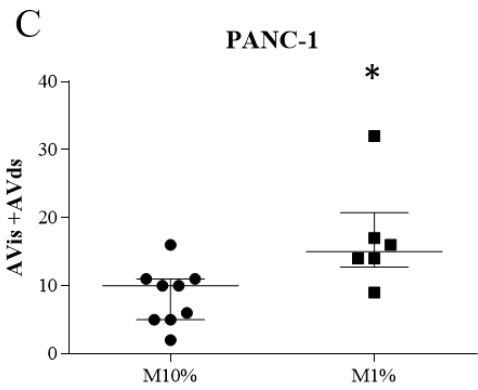
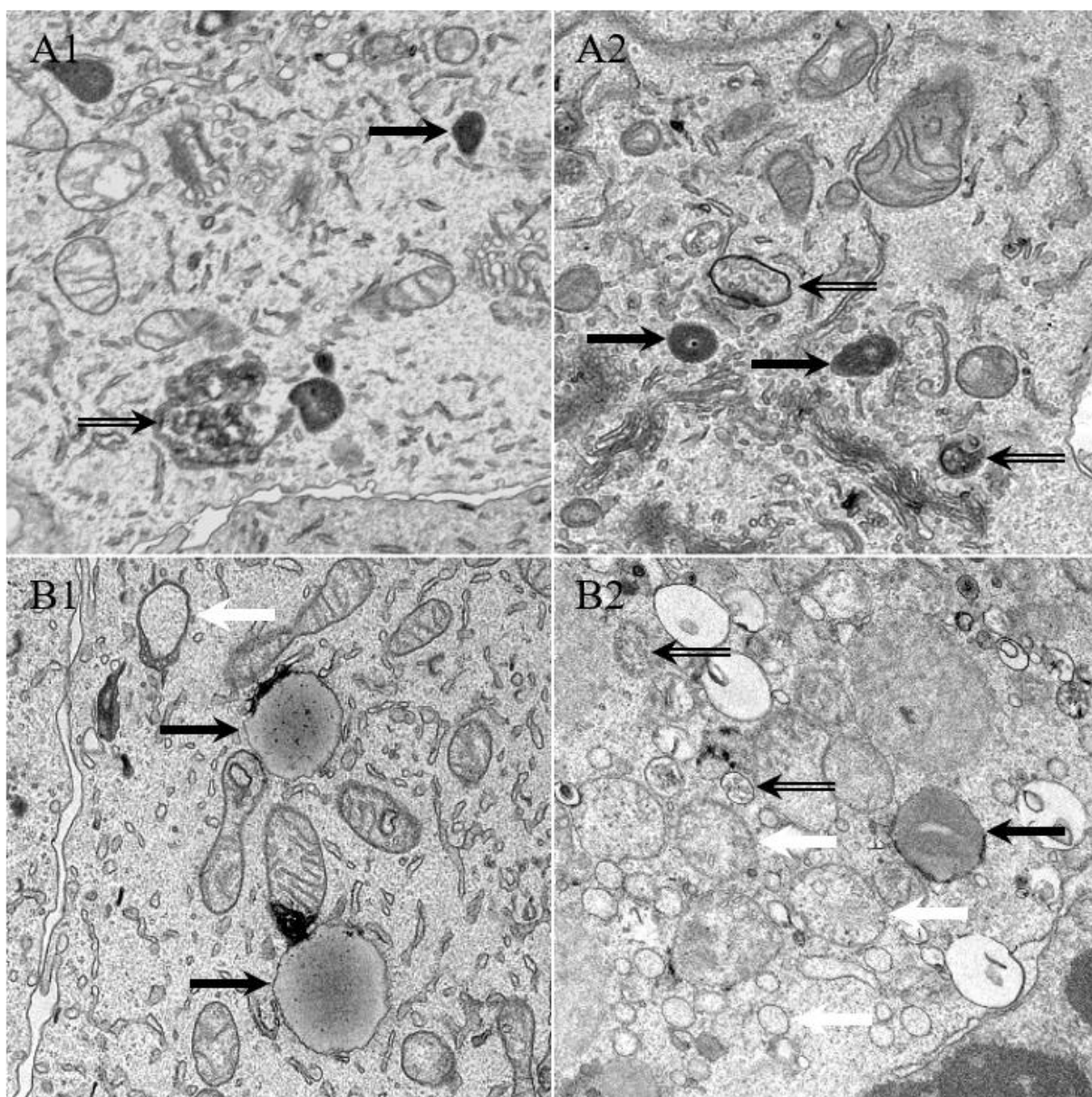
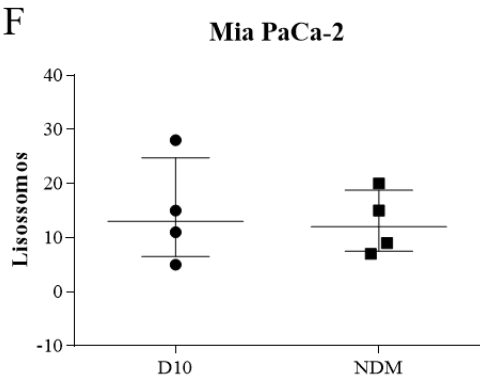
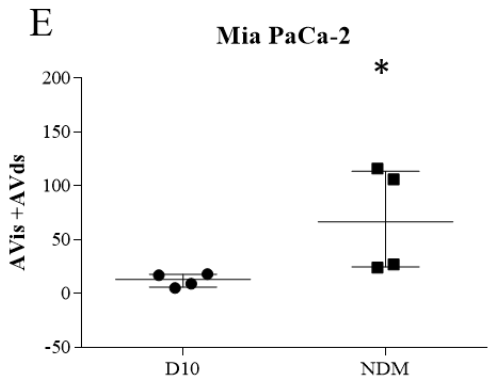
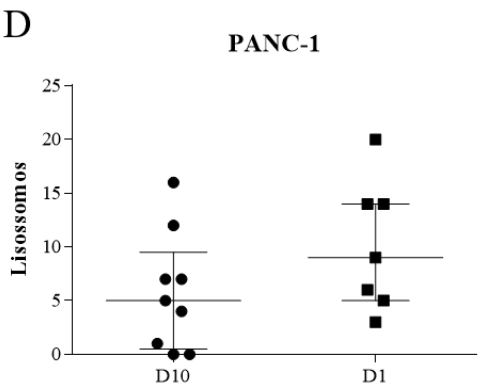
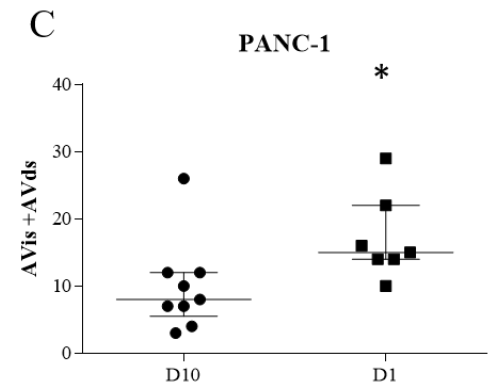


Figura 21. Organização Celular Autofágica – Cultivo Tridimensional II. Microscopia eletrônica de transmissão dos esferoïdes formados pelas linhagens de câncer pancreático, submetidos à privação nutricional por 24 horas. Neste modelo, os esferoïdes cresceram em matriz composta apenas por colágeno tipo I à 2mg/mL. A1) PANC-1 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). A2) PANC-1 cultivada em solução de DMEN com 1% de SFB (D1). B1) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio DMEN com 10% de SFB (D10). B2) Mia PaCa-2 cultivada em solução de meio NDM (NDM). C e E) Diferença significativa entre as quantidades medianas de organelas autofágicas em 9 campos aleatórios de PANC-1 e 4 de Mia PaCa-2, respectivamente. D e F) Diferença entre as quantidades medianas de lisossomos em 9 campos aleatórios de PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente. Flechas brancas – AVIs, vacúolos autofágicos iniciais; Flechas pretas – Lisossomos; Flechas pretas vasadas – AVds – vacúolos autofágicos de degradação.





4.4 CARACTERIZAÇÃO DO FENÔMENO AUTOFÁGICO NO MICROAMBIENTE HIPÓXICO E PRIVADO DE NUTRIENTES

Para compreender o impacto da hipóxia sobre a autofagia e a expressão das galectinas -1 e -3, as linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas à atmosfera com porcentagem de oxigênio menor ou igual à 1% durante 24 horas em associação ou não ao cultivo em privação nutricional. Ambos os modelos, bi e tridimensional, foram avaliados.

As condições experimentais são, nesta e nas seções seguintes, denominadas N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 (PANC-1) – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; N0 (Mia PaCa-2) – normóxia + NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 (PANC-1) – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H0 (Mia PaCa-2) – hipóxia + NDM.

Inicialmente, com a finalidade de comprovar o estabelecimento de um microambiente hipóxico, as células PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas à hipóxia em cultivo bidimensional durante 24 horas e a expressão de HIF-1 α foi avaliada. A manutenção sob hipóxia provocou um aumento na expressão de HIF-1 α de 2,42 vezes para PANC-1 e 3,19 vezes para Mia PaCa-2 (Fig. 22A e 22B).

No modelo bidimensional e em ambas as linhagens pode se observar o estímulo provocado pela hipóxia sobre o fenômeno autofágico. Houve aumento da expressão de LC3 nas condições H10 (0,14 vez) e H1 (0,73 vez) para PANC-1, e H10 (0,46 vez) e H0 (0,53 vez) para Mia PaCa-2 em referência aos respectivos controles (Fig. 22C, 22E e 22G).

No modelo bidimensional, a expressão de Gal-3 em PANC-1 aumentou 0,21 vez e 0,51 vez nas condições N1 e H1, enquanto não houve alteração em H10. A expressão de Gal-3 em Mia PaCa-2 diminuiu 0,32 vez, enquanto não houveram alterações nas condições N0 e H0 em relação ao controle N10 (Fig. 22C e 22E). A expressão de Gal-1 em PANC-1 diminuiu 0,32 vez em N1 e aumentou 0,20 e 0,73 vez em H10 e H1, em relação controle N10. Em Mia PaCa-2, a expressão de Gal-1 aumentou em todas as condições, sendo 3,47 vezes em N0, 2,21 vezes em H10 e 2,51 vezes em H0, em referência ao controle N10 (Fig. 22C e 22G).

Nota-se que estes resultados refletem e comprovam aqueles obtidos no momento da escolha do modelo de privação nutricional. Quanto a expressão de Gal-3 acompanha os níveis de LC3 em PANC-1 e o mesmo ocorre na relação Gal-1/LC3 em Mia PaCa-2.

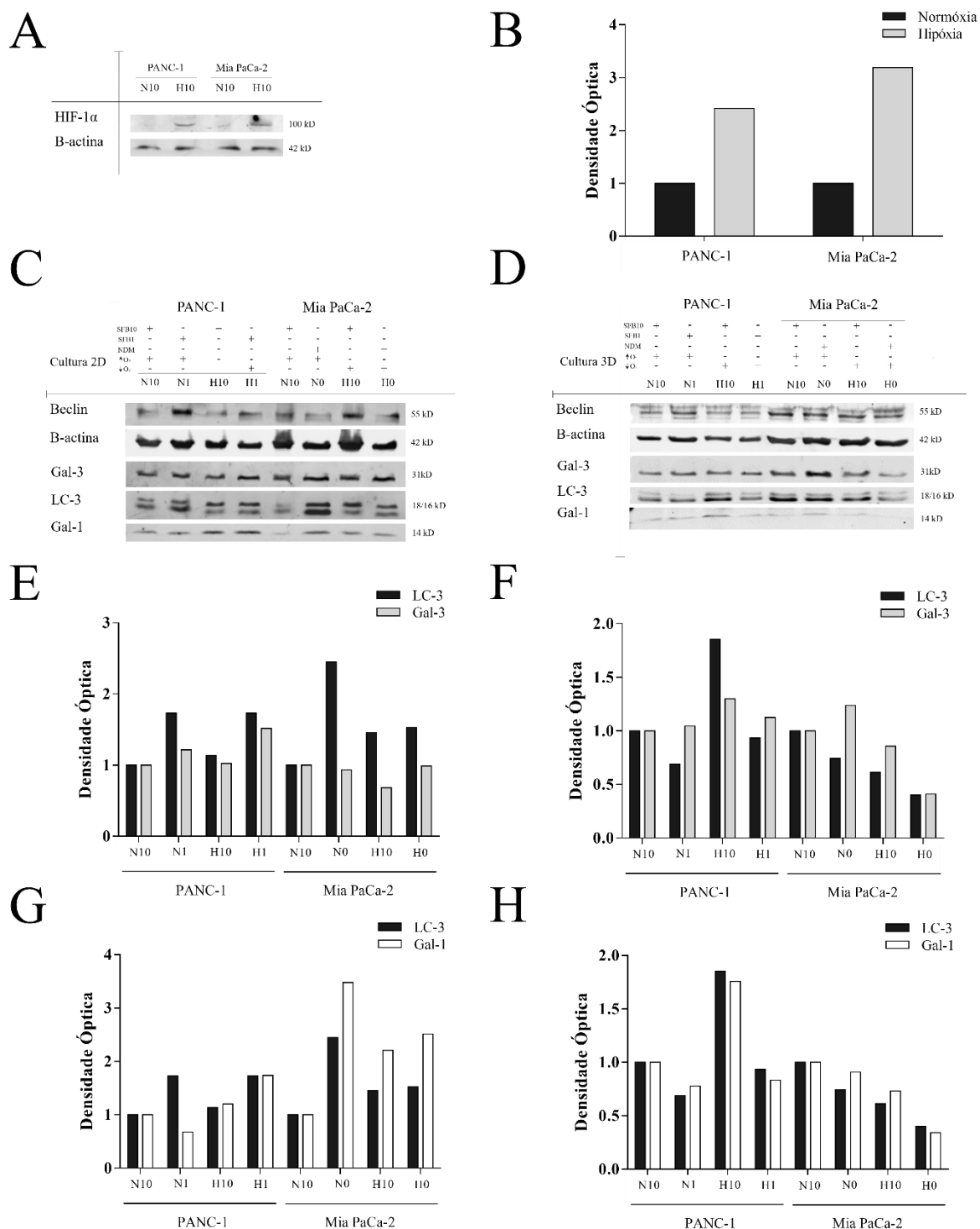
Os resultados obtidos com o modelo tridimensional não refletiram aqueles encontrados na cultura bidimensional. Não houveram aumentos na expressão de LC3 nas condições de privação nutricional isoladas, N1 para PANC-1 e N0 para Mia PaCa-2, e ainda em H1 para

PANC-1. Um aumento de 0,85 vez de LC3 ocorre em PANC-1 na condição H10. Nas demais condições, a expressão de LC3 encontra-se diminuída para ambas as linhagens. Para PANC-1, a expressão de LC3 diminui 0,31 vez em N1. Para Mia PaCa-2, a expressão de LC3 diminui 0,26 vez em N0, 0,39 em H10 e 0,60 em H0, em referência ao controle N10 (Fig. 22D, 22F e 22H).

Para PANC-1, a expressão de Gal-3 aumentou 0,30 vez em H10 e 0,12 vez em H1, não havendo alterações em N1, em relação ao controle N10. Em Mia PaCa-2, a expressão de Gal-3 aumenta 0,23 vez em N0, e diminui 0,24 vez e 0,68 vez em H10 e H0, respectivamente, em referência ao controle N10 (Fig. 22D e 22F). A expressão de Gal-1 também apresentou um padrão distinto daquele observado na cultura bidimensional. Em PANC-1, assim como LC3 e Gal-3, a expressão de Gal-1 aumentou 0,75 vez na condição H10. Em N1 e H1, a expressão de Gal-1 diminuiu 0,22 vez e 0,17 vez, respectivamente, em relação ao controle N10. Para Mia PaCa-2, a expressão de Gal-1 diminuiu em todas as situações experimentais, 0,09 vez em N0, 0,27 vez em H10 e 0,65 vez em H0, em relação ao controle N10 (Fig. 22D e 22H).

No modelo bidimensional, a expressão de Gal-3 aumenta na condição de hipóxia e privação para PANC-1 mas não se altera em Mia PaCa-2. Destaca-se o aumento de Gal-1 para a condição simultânea de privação nutricional e hipóxia nas duas linhagens, H1 em PANC-1, e H0 em Mia PaCa-2. A expressão de Gal-1 é contrária entre as duas linhagens na condição nutricional isolada, diminuindo em N1 para PANC-1 e aumentando em N0 para Mia PaCa-2. No modelo tridimensional, a condição de hipóxia isolada H10 é determinante para o aumento da expressão de Gal-3 e Gal-1 em PANC-1. Em Mia PaCa-2 a diminuição das duas proteínas, Gal-3 e Gal-1, assim como de LC3, ocorre em H0.

Figura 22. Formação de Modelo Mimético do Microambiente Tumoral Pancreático. Análise da modulação de marcadores autofágicos e das galectinas -1 e -3 mediante cultivo das linhagens pancreáticas em atmosfera hipóxica associada ou não à privação nutricional. A) Expressão de HIF-1 α nas linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 após incubação em hipóxia durante 24h. B) Densitometria das bandas de HIF-1 α após normalização com β -actina. C e D) Expressão dos fatores autofágicos e das galectinas -1 e -3 nas linhagens alvo após cultivo bi e tridimensional, respectivamente, sob privação nutricional em combinação, simultânea ou não, com hipóxia. E e F) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-1 em comparação à LC3 em ambos os modelos de cultivo. G e H) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-3 em comparação à LC3 em ambos os modelos de cultivo. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 (PANC-1) – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; N0 (Mia PaCa-2) – normóxia + NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 (PANC-1) – hipóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H0 (Mia PaCa-2) – hipóxia + NDM.



4.5 IMUNOMARCAÇÃO NO MICROAMBIENTE MIMÉTICO

Com a finalidade de observar o padrão de expressão proteica e localização celular das galectinas -1 e -3 nos modelos bi e tridimensional de cultivo, as imunofluorescências de PANC-1 e Mia PaCa-2 foram analisadas por microscopia confocal. Ambas as linhagens foram submetidas ao cultivo nas condições de privação nutricional associadas ou não à hipóxia.

No modelo de cultivo bidimensional, a visualização de LC3 ocorre devido à transfecção com DNA plasmidial pEGFP-LC3 (Fig. 23-26). Nas condições de privação nutricional N1 (PANC-1) e N0 (Mia PaCa-2) é possível visualizar uma maior quantidade de vacúolos fluorescentes devido ao acúmulo de LC3 nas organelas autofágicas. Esta organização subcelular corrobora os achados na microscopia eletrônica. Nestas mesmas condições, a expressão de Gal-3 se torna mais visível, especialmente para PANC-1, refletindo o padrão de expressão proteica encontrado através do western blot (Fig. 23B1, 24B1, 25B1e 26B1).

A expressão de Gal-1 apresenta um padrão citoplasmático menos visível quando comparado à Gal-3, devido à baixa expressão celular desta proteína. Para Mia PaCa-2, nas condições de privação nutricional N1 e associada à hipóxia H1, o padrão de expressão de Gal-1 aparenta se tornar também nuclear (Fig. 25B2 e 26D2). Para PANC-1 em H1, há uma modificação na expressão/organização de F-actina, marcada com faloidina, a qual deixa de ser citoplasmática periférica e se torna difusa no citoplasma (Fig. 23D4, 24D4, 25D4 e 26D4).

Não foi observado um padrão de sobreposição específico das proteínas LC3 e Gal-3 ou LC3 e Gal-1, indicando que estas galectinas não participam diretamente da composição física das organelas autofágicas. Todas as células transfectadas com pEGFP-LC3 apresentaram a expressão citoplasmática de Gal-3 e Gal-1, não havendo um padrão excludente ou inibitório de expressão.

No modelo tridimensional, a marcação de LC3 foi feita com a utilização de anticorpo policlonal anti-LC3. Devido ao desenvolvimento dos esferoides inseridos numa matriz densa, não é possível observar a expressão das proteínas marcadas com a mesma resolução em comparação ao modelo bidimensional. As expressões das proteínas LC3, Gal-3 e Gal-1 apresentam o mesmo padrão citoplasmático encontrado no cultivo em monocamada, para ambas as células PANC-1 e Mia PaCa-2 (Fig. 27 - 30).

A expressão de Gal-3 na linhagem Mia PaCa-2 se torna mais visível na condição N0, resultado semelhante ao encontrado no western blot do modelo tridimensional e na imunofluorescência bidimensional (Fig. 28B2). Além disso, a alteração da

expressão/organização de F-actina em PANC-1 sob H1, também se repete nos esferoides (Fig 27D4 e 28B4).

Figura 23. Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Bidimensional de PANC-1. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-3 em imunofluorescência de PANC-1. As células sofreram transfecção com DNA plasmidial pEGFP-LC3 e submetidas ao modelo bidimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 – hipóxia + solução de DMEN com 1% de SFB. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

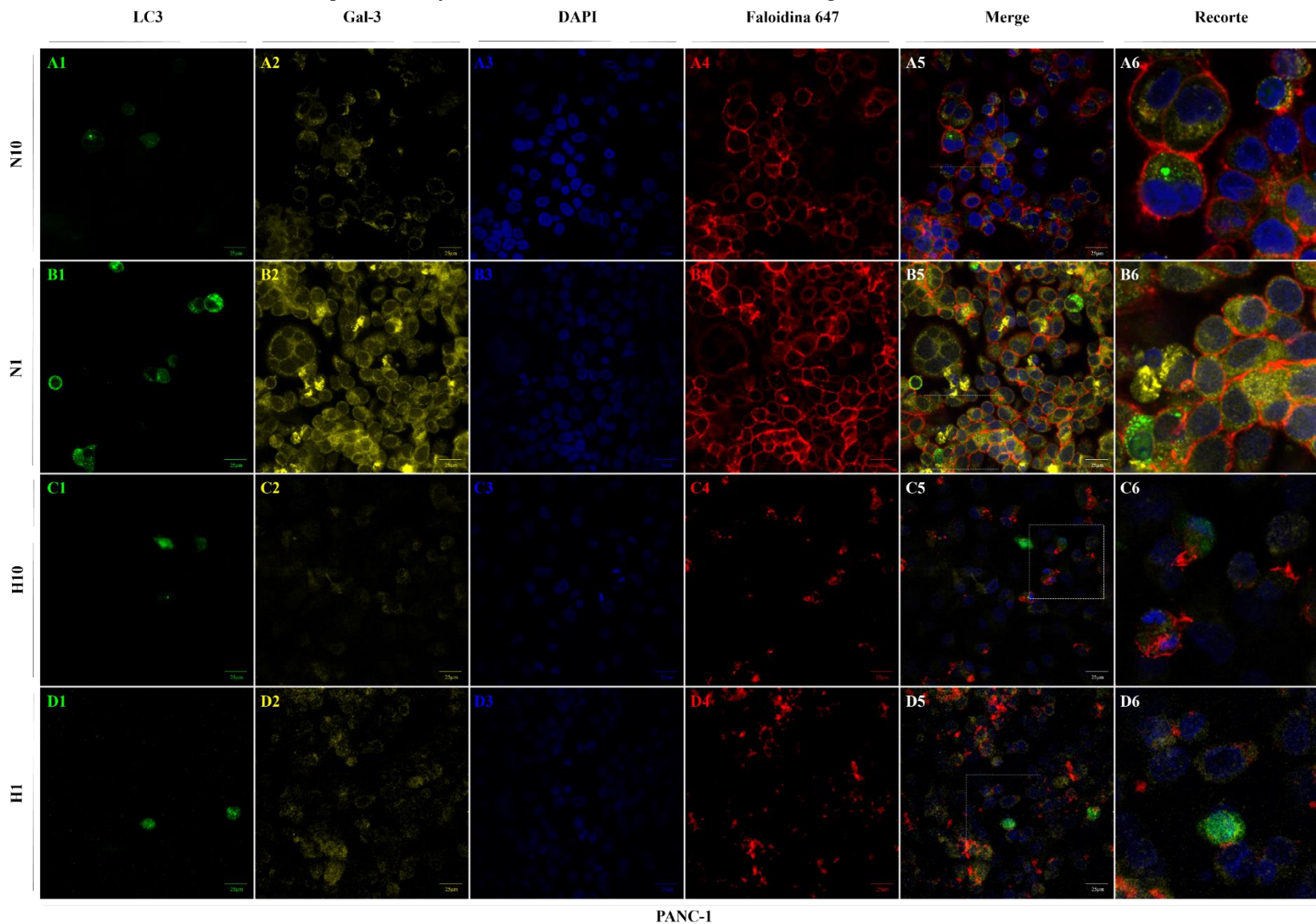


Figura 24. Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Bidimensional de Mia PaCa-2. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-3 em imunofluorescência de Mia PaCa-2. As células sofreram transfecção com DNA plasmidial pEGFP-LC3 e submetidas ao modelo bidimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N0 – normóxia + solução de NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H0 – hipóxia + solução de NDM. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

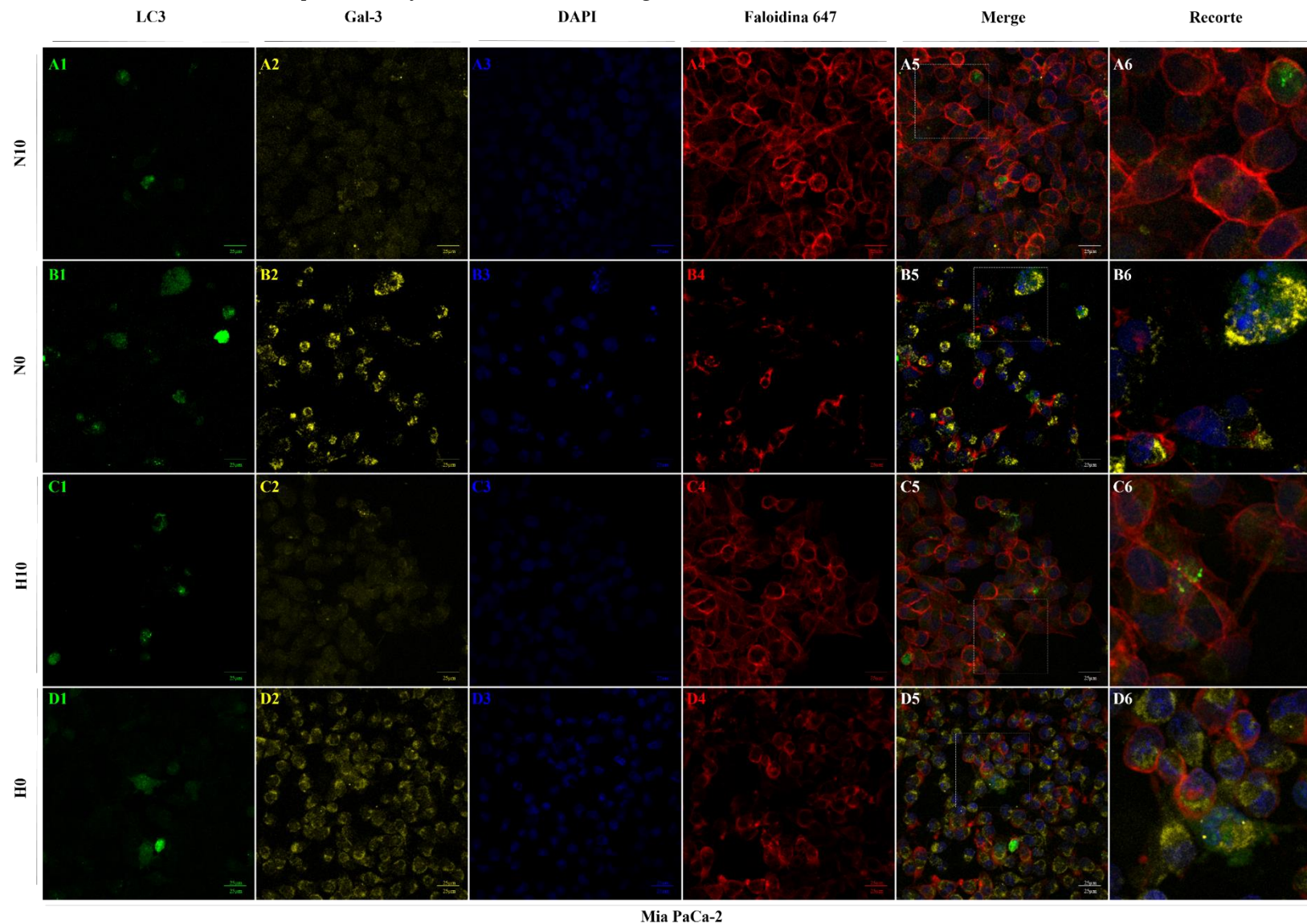


Figura 25. Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Bidimensional de PANC-1. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-1 em imunofluorescência de PANC-1. As células sofreram transfecção com DNA plasmidial pEGFP-LC3 e submetidas ao modelo bidimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 – hipóxia + solução de DMEN com 1% de SFB. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

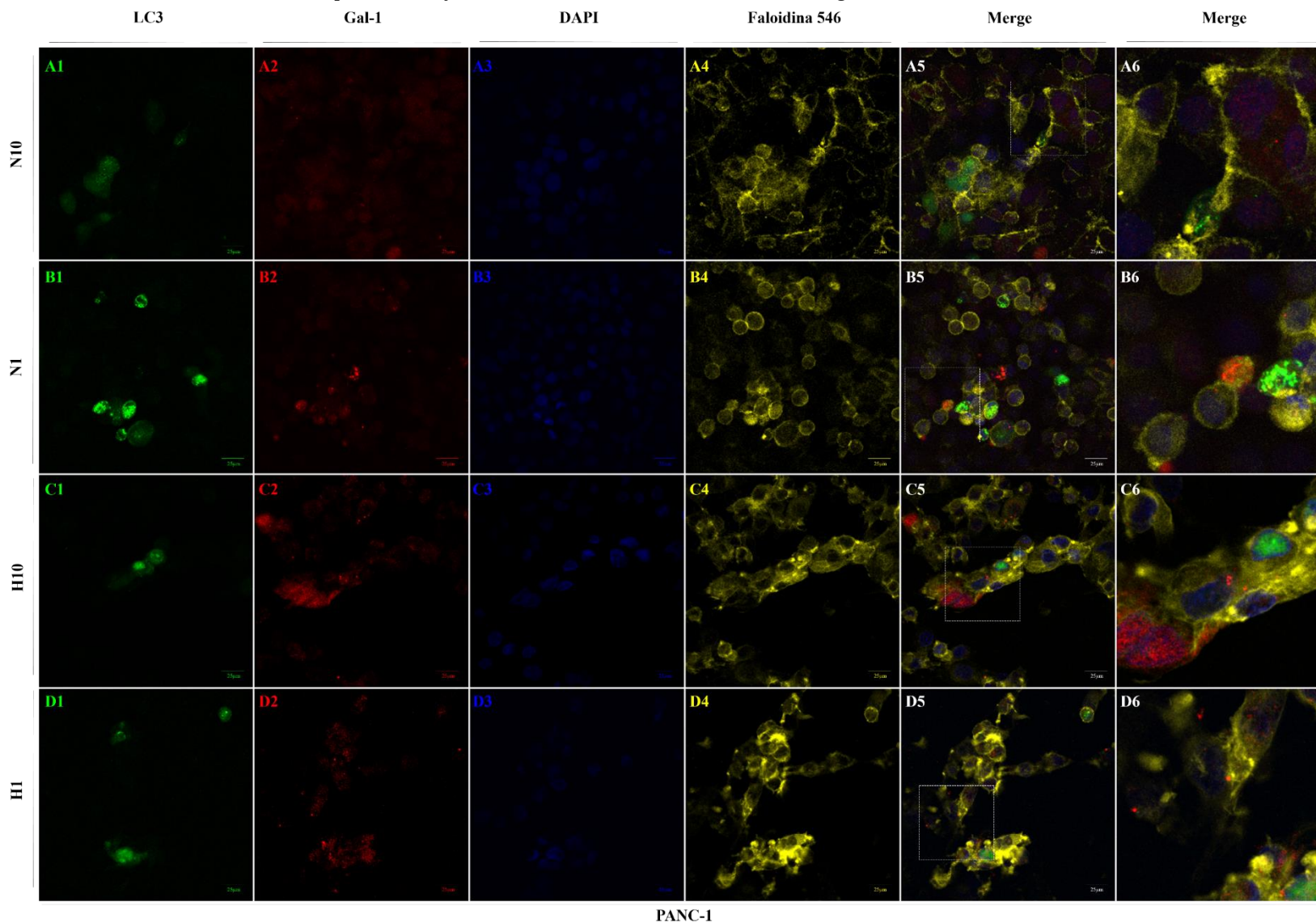


Figura 26. Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Bidimensional de Mia PaCa-2. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-1 em imunofluorescência de Mia PaCa-2. As células sofreram transfecção com DNA plasmidial pEGFP-LC3 e submetidas ao modelo bidimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N0 – normóxia + solução de NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H0 – hipóxia + solução de NDM. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

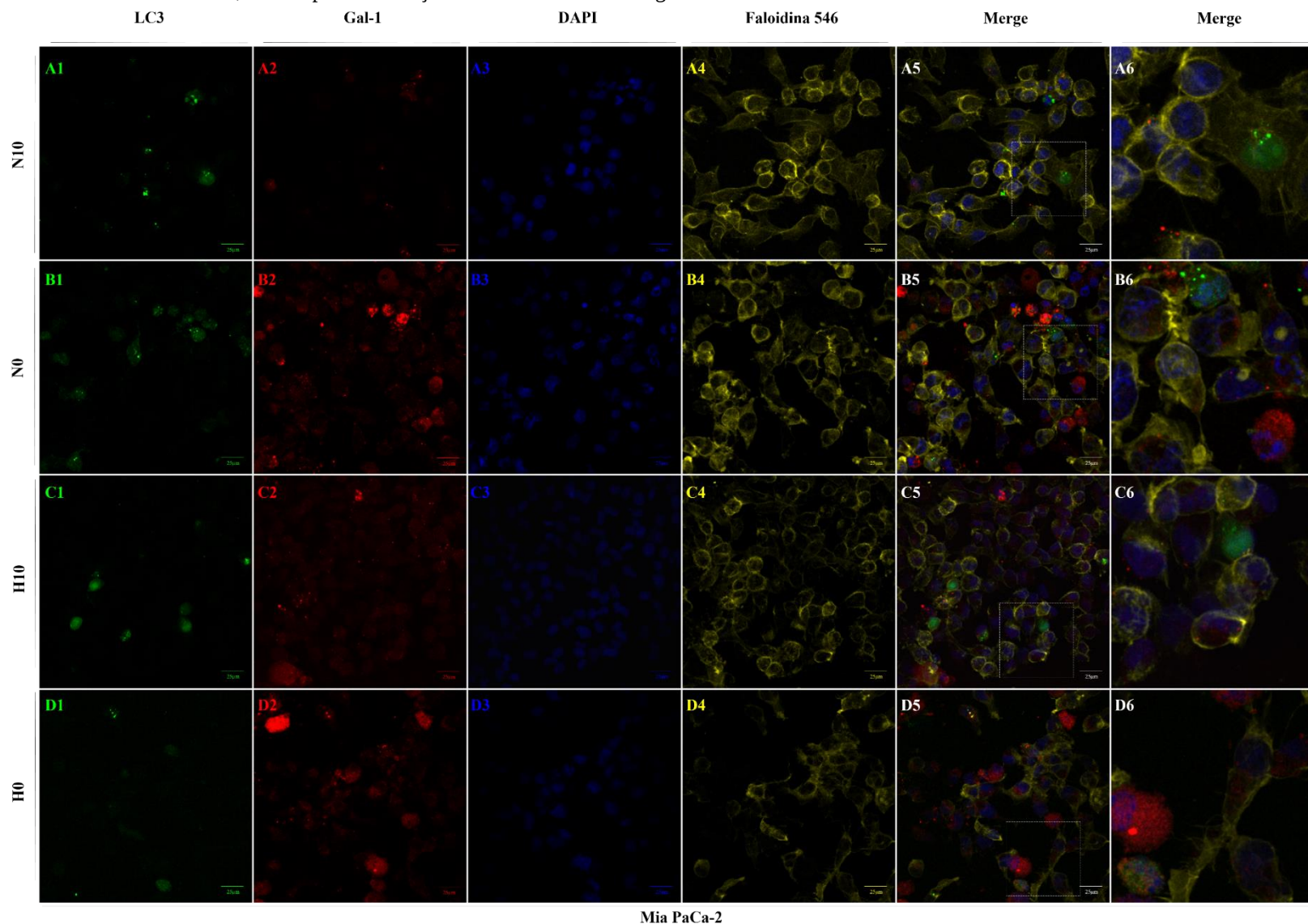


Figura 27. Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Tridimensional de PANC-1. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-3 em imunofluorescência de PANC-1. As células foram submetidas ao modelo tridimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 – hipóxia + solução de DMEN com 1% de SFB. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

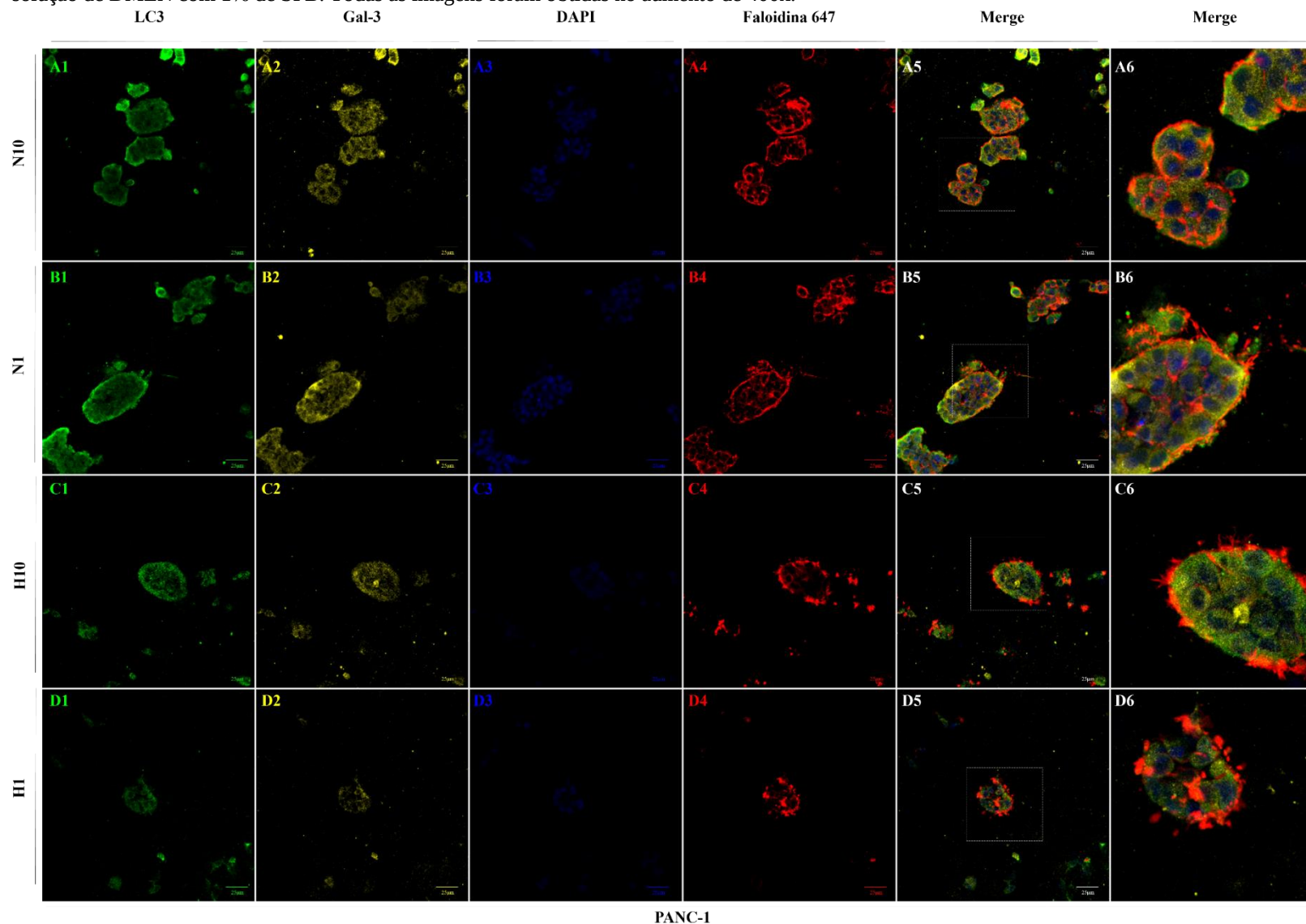


Figura 28. Avaliação da Localização Celular de Gal-3 e LC3 - Cultivo Tridimensional de Mia PaCa-2. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-3 em imunofluorescência de Mia PaCa-2. As células foram submetidas ao modelo tridimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N0 – normóxia + NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H0 – hipóxia + NDM. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

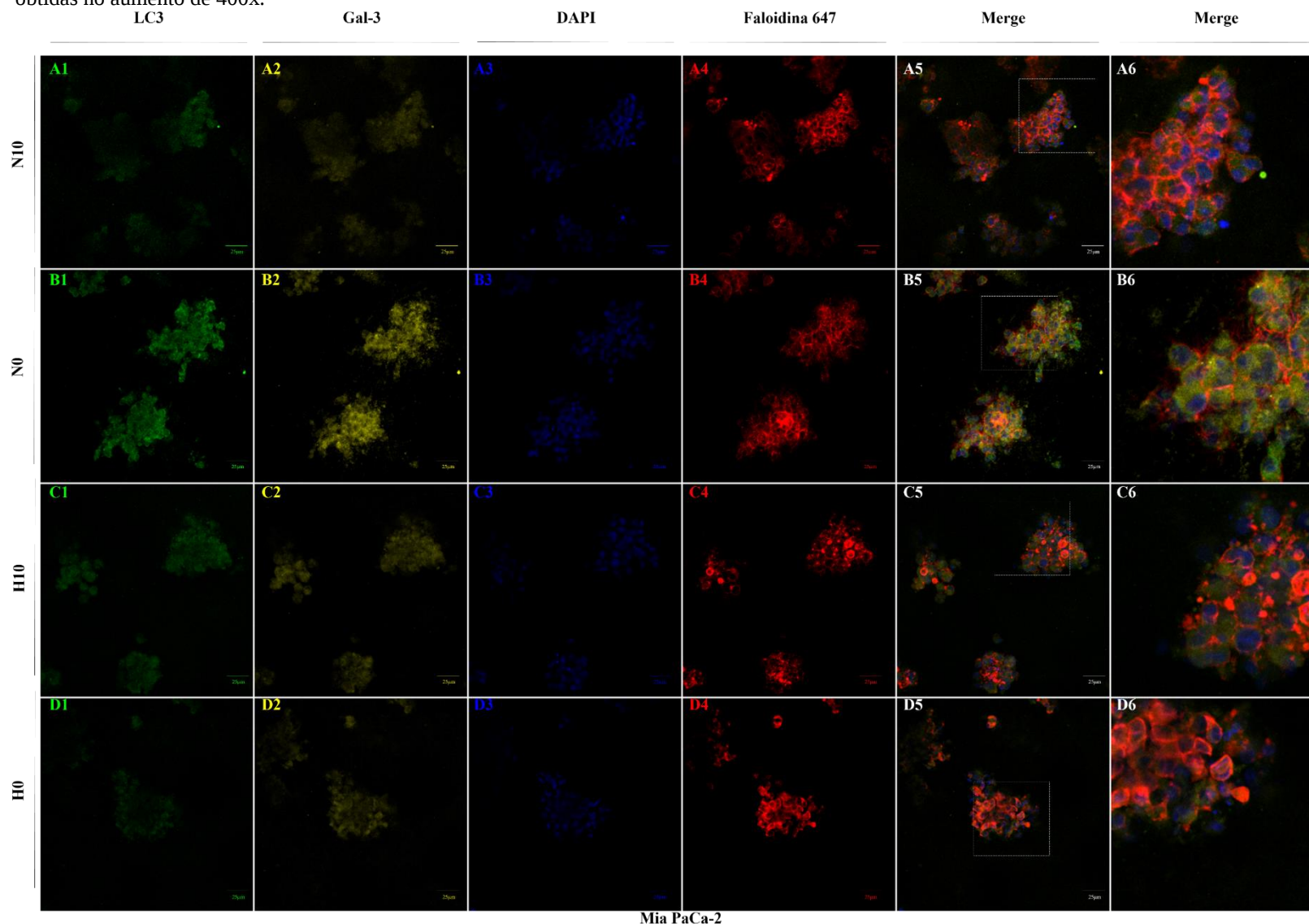


Figura 29. Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Tridimensional de PANC-1. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-1 em imunofluorescência de PANC-1. As células foram submetidas ao modelo tridimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 – normóxia + solução de DMEN + 1% de SFB; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 – hipóxia + solução de DMEN + 1% de SFB. Todas as imagens foram obtidas no aumento de 400x.

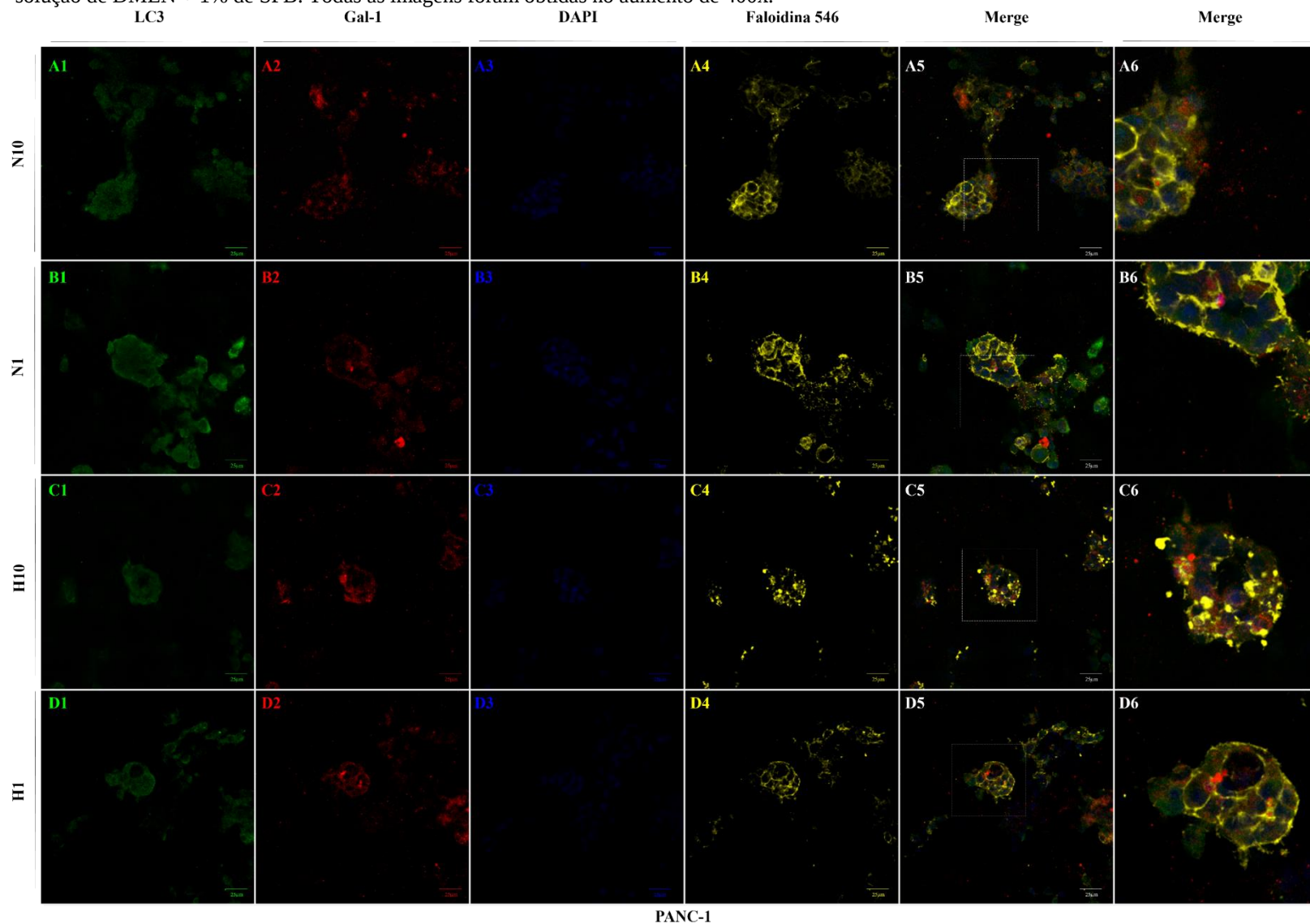
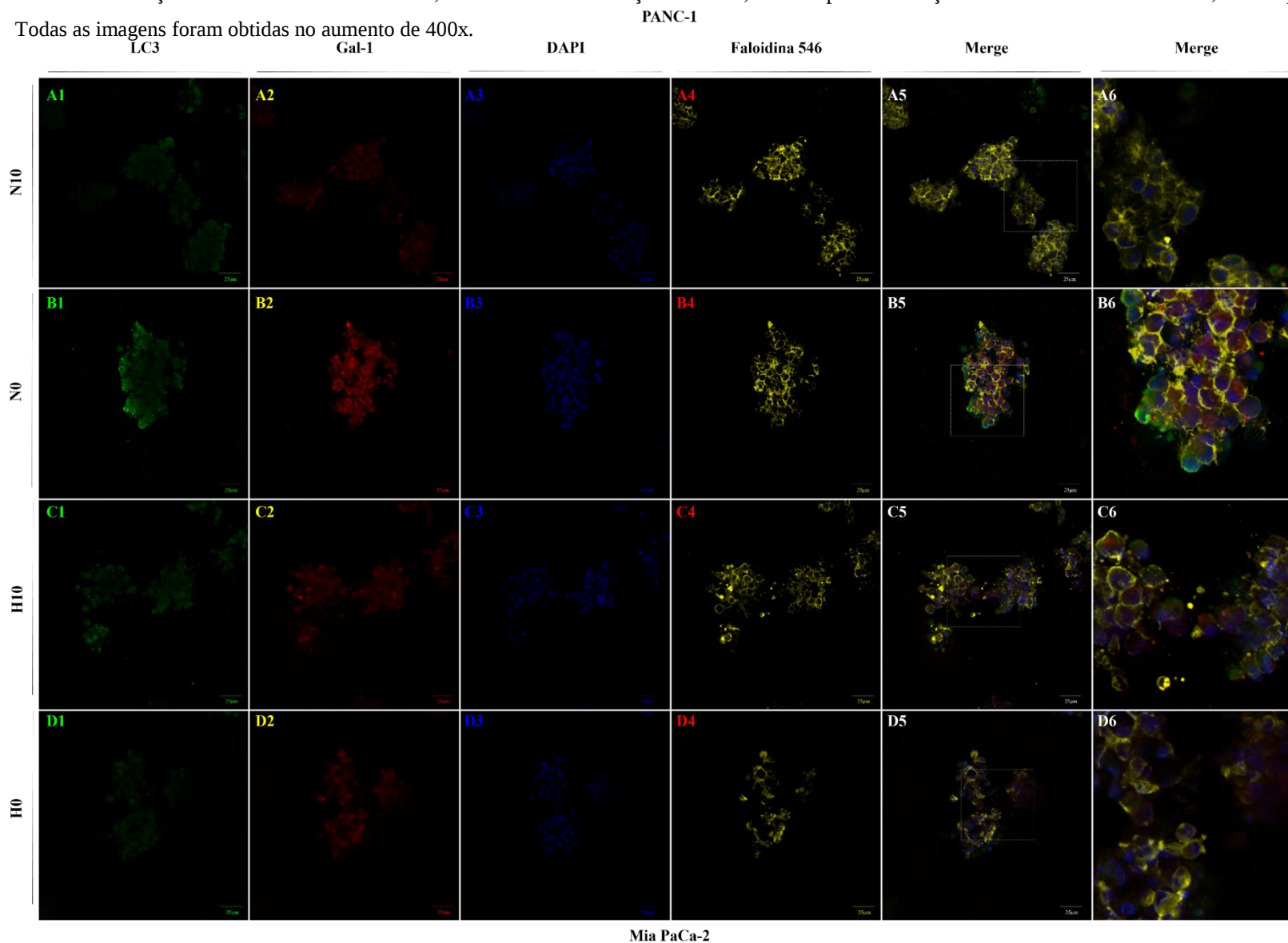


Figura 30. Avaliação da Localização Celular de Gal-1 e LC3 - Cultivo Tridimensional de Mia PaCa-2. Microscopia confocal para avaliação da comarcação de LC3 e Gal-1 em imunofluorescência de Mia PaCa-2. As células foram submetidas ao modelo tridimensional de cultivo com privação nutricional associada ou não à hipóxia durante 24h. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N0 – normóxia + solução de NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H0 – hipóxia + solução de NDM.



4.6 IMPACTO DA INIBIÇÃO DE GAL-3 SOBRE O FLUXO AUTOFÁGICO DO CÂNCER PANCREÁTICO

Com o intuito de compreender a influência de Gal-3 para o fluxo autofágico tumoral pancreático, as linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 foram transfectadas com siRNA de Galectina-3 e submetidas as condições de privação nutricional associadas ou não à hipóxia. Este ensaio de inibição da tradução proteica foi realizado para ambas as linhagens no modelo bidimensional.

Inicialmente, as células PANC-1 e Mia PaCa-2 foram submetidas à transfecção com siRNA para Gal-3, e para comprovar o silenciamento específico e eficaz, a expressão de Gal-3 foi avaliada. A transfecção com o siRNA provocou a inibição de Gal-3, diminuindo sua expressão em 0,50 vez em PANC-1 e 0,70 vez em Mia PaCa-2 (Fig. 31A e 31B).

Uma vez tendo a Gal-3 sido silenciada, as células foram submetidas às condições de privação nutricional, específicas para cada linhagem, em simultaneidade ou não com a hipóxia por 24 horas. Para uma análise mais sensível e específica do fluxo autofágico, a influência do silenciamento de Gal-3 sobre a expressão de LC3 foi avaliada de duas formas: através da densitometria das bandas de LC3 II, e através da razão entre as densitometrias de LC3II e LC3I, em ambas as situações comparando as condições de silenciamento e controle.

Para PANC-1, houve diminuição da expressão de LC-3II nas condições transfectadas N10 (0,07 vez), N1 (0,11 vez) e H10 (0,04 vez) em relação às expressões nas mesmas condições não silenciadas. Apenas na condição H1, houve aumento de 0,14 vez. Em Mia PaCa-2, o silenciamento de Gal-3 provocou diminuição da expressão de LC3II em todas as condições em comparação aos pares não silenciados. A expressão de LC3II diminuiu 0,04 vez em N10, 0,11 vez em N0, 0,25 vez em H10 e 0,16 em H0 (Fig. 31C – F).

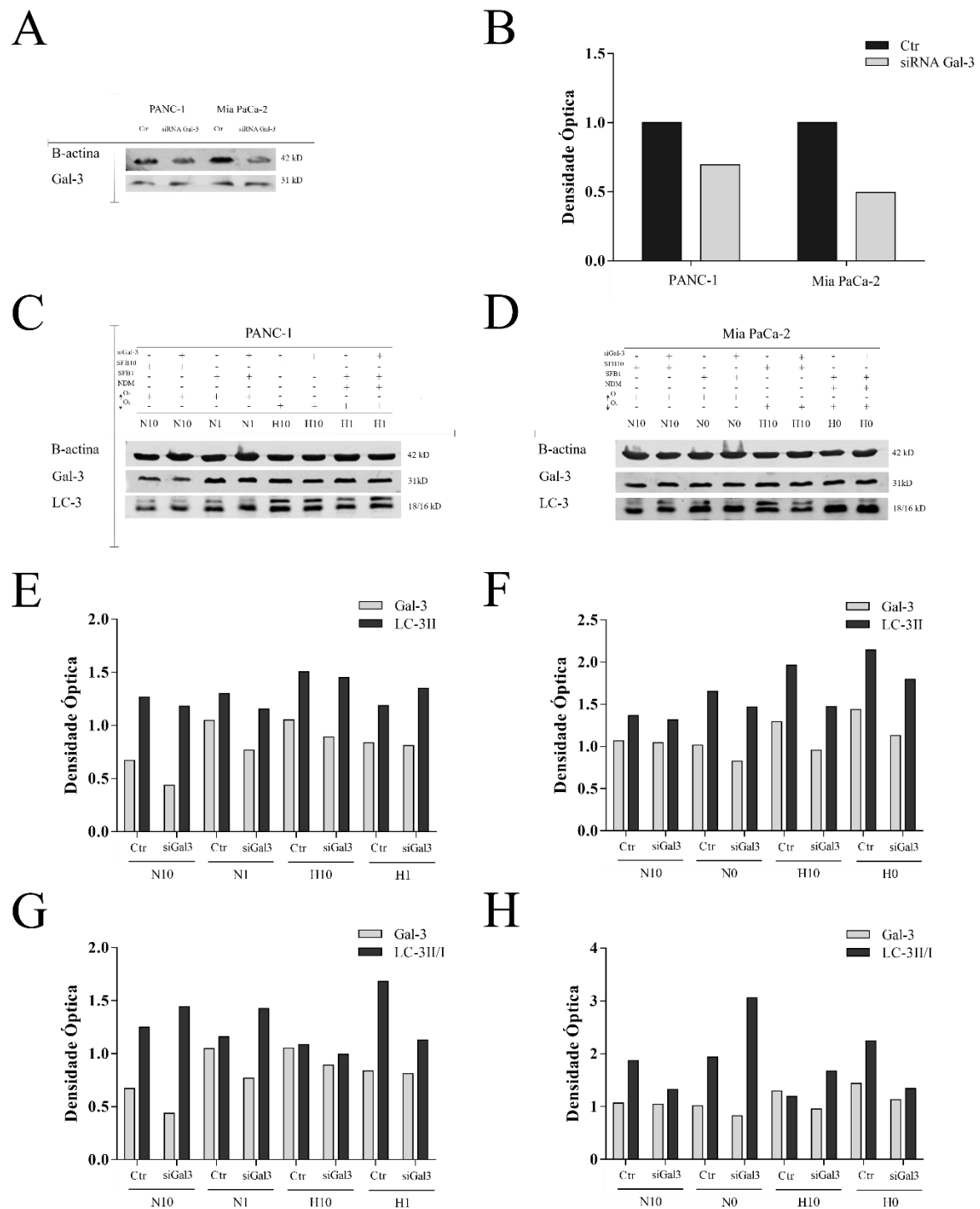
Quando o fluxo autofágico foi avaliado através da razão LC3II/LC3I, resultados distintos foram obtidos. Para PANC-1, houve aumento da razão nas condições N10 (0,16 vez) e N1 (0,23 vez) e diminuição nas condições H10 (0,08 vez) e H1 (0,33 vez). Para Mia PaCa-2, houve diminuições do valor da razão nas condições N10 (0,30 vez) e H0 (0,40 vez), mas nas condições N0 e H10, os valores aumentaram 0,58 e 0,40 vez, respectivamente. Todos os valores de expressão são apresentados em relação aos pares não silenciados (Fig. 31C e D, e Fig. 31G e H).

Entretanto, as variações nos valores da razão LC3II/LC3I em todas as condições ocorreu em detrimento das variações na densidade das bandas de LC3I e não de LC3II, que se mantem

menor na maioria das condições. Quando há aumentos nos valores da razão LC3II/LC3I, isto se deve à diminuição de LC3I e não ao aumento de LC3II, e o inverso também ocorreu.

Portanto, os resultados indicam que a inibição de Gal-3 provocou diminuição do fluxo autofágico independente dos estímulos do microambiente, privação nutricional e hipóxia.

Figura 31. Impacto da Inibição de Galectina-3 na Autofagia. Comprovação do silenciamento de Gal-3 nas linhagens de câncer pancreático e análise das alterações na marcação de LC3 após o silenciamento. As células foram cultivadas em modelo bidimensional sob privação nutricional associada ou não à hipóxia. A) Marcação de Gal-3 nas linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente, após silenciamento em comparação com controle. B) Densitometria das bandas de Gal-3 após normalização com β -actina. C e D) Marcação de Gal-3 e LC3 nas linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2, respectivamente, após silenciamento de Gal-3 e posterior privação nutricional em combinação, simultânea ou não, com hipóxia. E e F) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-3 em comparação à LC3II. G e H) Densitometrias das bandas referentes às marcações de Gal-3 em comparação à razão LC3II/I. N10 – normóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; N1 (PANC-1) – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; N0 (Mia PaCa-2) – normóxia + NDM; H10 - hipóxia + solução de DMEN com 10% de SFB; H1 (PANC-1) – normóxia + solução de DMEN com 1% de SFB; H0 (Mia PaCa-2) – hipóxia + NDM; Ctr – Controle; siGal-3 – siRNA Gal-3.



5 DISCUSSÃO

O presente trabalho, ao buscar esclarecer se as galectinas -1 e -3 são importantes para o fenômeno autofágico, caracteriza a expressão das mesmas num microambiente mimético formado por fatores determinantes para a seleção natural de células tumorais resistentes. Ao estabelecer um microambiente com tumores de estrutura tridimensional crescendo cercados por matriz extracelular de composição fidedigna, sob privação nutricional e hipóxia, o estudo acaba por apresentar caráter inédito, inovador e comparativo.

A experimentação de condições de *starving* distintas, possibilitou a determinação de dois modelos privados de nutrientes, específicos para PANC-1 e Mia PaCa-2, eficazes em promover o aumento do marcador autofágico LC3. A análise deste modelo através de microscopia eletrônica de transmissão, comprovou o aumento da formação de organelas autofágicas nas situações de privação nutricional. Uma vez determinadas as condições ótimas de indução autofágica, a expressão das galectinas -1 e -3 e de LC3 foram aferidas no microambiente de cultivo bidimensional hipóxico e privado de nutrientes. Para as ambas as linhagens, houve aumento na expressão de LC3 e Gal-1 na condição simultânea de privação nutricional e hipóxia. Em PANC-1, o mesmo resultado foi observado com Gal-3.

O padrão de expressão de Gal-3 tem sido investigado em diversos tumores, sendo superexpressa em tumores de fígado, rim, língua e bexiga e pouco expressa em tumores de ovário, útero e mama (HANN et al., 2011). Entretanto, a expressão em determinados tumores continua em discussão, alguns estudos apontam o aumento da expressão de Gal-3 em câncer de cólon (SCHOEPPNER et al., 1995; NAKAMURA et al., 1999), enquanto outros relatam diminuição (LOTZ et al., 1993; SANJUAN et al., 1997). Em tumores de mama, a expressão de Gal-3 depende do estágio de diferenciação tumoral (ILMER et al., 2016). A expressão de Gal-3 é confirmada como superexpressa em tumores pancreáticos em comparação ao tecido normal (TERRIS et al., 2002; GRUTZMANN et al., 2004). Nos resultados obtidos através do western blot e imunofluorescência, é possível visualizar uma expressão significativa a partir dos lisados proteicos e no citoplasma das duas linhagens, respectivamente.

A superexpressão de Gal-3 foi relatada para células de PDAC humano e de camundongo e sua presença, relacionada ao favorecimento da progressão tumoral (SONG et al., 2012). Gal-3 também foi relacionada com alterações no funcionamento direto de K-Ras, promovendo seu recrutamento para a membrana plasmática e contribuindo para sua ativação, em modelo *in vitro* bidimensional de PDAC (SONG et al., 2012). Este papel de Gal-3 sobre o recrutamento membranar de K-Ras também foi demonstrado em modelo tridimensional *in vitro* de células não pequenas de câncer de pulmão (TERRIS et al., 2002; GRUTZMANN et al., 2004). Com

base na importância da expressão de K-Ras mutado para a sobrevivência e proliferação das células tumorais pancreáticas, estes achados apontam um possível papel de Gal-3 no comportamento maligno do PDAC (SONG, et al., 2012).

No presente estudo, a expressão de Gal-3 e Gal-1 ocorreu em níveis distintos entre as linhagens de câncer pancreático e entre os modelos bi e tridimensional. Em PANC-1, os níveis de Gal-3 e LC3 aumentam nas condições envolvendo a privação nutricional N1 e H1 no modelo bidimensional, enquanto que no modelo tridimensional, este aumento foi exclusivo na condição hipóxica isolada para as ambas as proteínas. Para Mia PaCa-2, ocorre aumento de Gal-3 na condição de privação nutricional isolada e diminuição na condição simultânea associada à hipóxia no modelo tridimensional, mas estes resultados não são observados no modelo bidimensional. Esta diferença nos perfis de expressão de Gal-3 pode estar relacionada à tumorigenicidade das linhagens. PANC-1 e Mia PaCa-2 não apresentam diferenças significativas quanto a presença de mutações em genes determinantes da carcinogênese do PDAC, como K-Ras, TP53 ou SMAD4/DPC4 (DEER et al., 2010). Entretanto, a capacidade tumorigênica de PANC-1 é ligeiramente maior que a de Mia PaCa-2, e PANC-1 não possui expressão de E-caderina, demonstrando um fenótipo menos epitelial e consequentemente mais invasivo (GRADIZ et al., 2016). Portanto, a modulação de Gal-3 e LC3 em PANC-1 diante de condições de privação nutricional e hipóxicas pode estar relacionada ao comportamento mais agressivo da linhagem.

Em condições hipóxicas a expressão de Gal-3 é modulada por HIF1- α . Este fator transcricional liga-se ao HRE e estimula a atividade do promotor de Gal-3 (ZENG et al., 2007). Como apontado por Ikemori et al. 2014, o aumento da expressão de Gal-3 sob condições hipóxicas pode estar associado a dois contextos. No primeiro, Gal-3 funcionaria como participante na sensibilização das células tumorais à morte, comumente aumentada em condições hipóxicas. No segundo e mais aceito, haveria a articulação e desenvolvimento de um mecanismo de conservação e sobrevivência celular tumoral, do qual Gal-3 participaria ativamente (XU et al., 2013; IKEMORI et al., 2014). Resultados prévios do grupo de pesquisa demonstraram aumento da taxa de morte das linhagens PANC-1 e Mia PaCa-2 na condição de hipóxia isolada, enquanto apenas Mia PaCa-2 apresentou aumento da morte na condição simultânea associada à privação nutricional. Em nossos resultados, Gal-3 e Gal-1 são fortemente expressas na condição hipóxica para PANC-1 e diminuem em Mia PaCa-2. Neste contexto, Gal-3 poderia estar exercendo um papel dual de acordo com a linhagem analisada, participando de um mecanismo de sobrevivência em PANC-1, enquanto em Mia PaCa-2, promoveria a sensibilização das células à hipóxia.

A expressão de Gal-1 tem sido reportada em tumores de cólon, mama, pulmão, gliomas, próstata, e também em adenocarcinoma pancreático, frequentemente presente no estroma associado ao tumor (CHEN et al., 2012; ASTORGUES-XERRI et al., 2014). Como apresentado por Xue e colaboradores (2011), a baixa expressão celular neoplásica de Gal-1 é contrabalanceada pelos níveis presentes na matriz extracelular e em células associadas como fibroblastos ativados e α -SMA-miofibroblastos (XUE et al., 2011). Em tumores de pâncreas, Gal-1 secretada influencia marcadamente o desenvolvimento tumoral de duas maneiras, propiciando o escape da resposta imunológica e no remodelamento da matriz extracelular (PAZ et al., 2001).

Em condições hipóxicas, com a estabilização de HIF-1 α , o aumento da expressão de Gal-1 tem sido reportado em sarcoma de Kaposi, melanoma, câncer de mama, próstata e câncer de cólon (CROCI et al., 2012). Gal-1 é capaz de ativar a sinalização de VEGFR2 por meio da ligação com N-glicanos em tumores hipóxicos, preservando a formação vascular (CROCI; RABINOVICH, 2014). Em gliomas, os efeitos proangiogênicos de galectina-1 regulam a expressão de VEGF através de IRE-1 α (Enzima dependente de Inositol-1 α) e outros genes relacionados à hipóxia (LE MERCIER et al., 2008). A inibição por shRNA de Gal-1 em linhagens de câncer de cólon diminui significativamente a capacidade de invasão/migração celular, e a injeção de Gal-1 no meio reestimula essa característica (ZHAO et al., 2010). Portanto, estes resultados indicam a relevância de Gal-1 para a progressão tumoral em condições estressantes (ASTORGUES-XERRI et al., 2014).

Gal-1 é uma das principais moléculas responsáveis pela progressão do câncer pancreático e *crosstalk* tumor-estroma. Dados na literatura mostram que a Gal-1 derivada das células estreladas do pâncreas é capaz de promover proliferação, invasão, transição EMT e sobrevivência (efeitos anti-apoptóticos) de células PANC-1 (TANG et al., 2017). A deleção genética de Gal-1 em um modelo tumoral de camundongo K-Ras dirigido resulta em aumento significativo na sobrevida através de mecanismos envolvendo diminuição da ativação do estroma, vascularização atenuada e infiltração aumentada de células T levando a taxas reduzidas de metástase (OROZCO et al., 2018). Análises de expressão gênica de células tumorais pancreáticas expostas a Gal-1 revelam modulação de múltiplas vias regulatórias envolvidas na progressão tumoral, incluindo aquelas com participação de NF-kB (QIAN et al., 2017). Nos resultados obtidos através da imunofluorescência e do western blot, a expressão de Gal-1 foi menor que a de Gal-3, o que corrobora achados da literatura e indica sua secreção.

Os estudos sobre o papel de Gal-1 na autofagia são pouco numerosos mas delineiam a sua relação com a resistência terapêutica. Os ensaios *in vitro* com células de neuroblastoma e

hepatocarcinoma mostraram que o *knockdown* de Gal-1 provoca diminuição da resistência à cisplatina e diminui a autofagia provocada pelo fármaco. Ao mesmo tempo, o tratamento das células inibidores de autofagia induz aumento da sensibilidade à cisplatina (SU et al., 2016; GAO; WANG, 2019). Os resultados apresentados aqui apontam que, com exceção de N1 para o modelo bidimensional de PANC-1, a expressão de Gal-1 foi semelhante à expressão de LC3 em todas as condições das duas linhagens de câncer pancreático e em ambos os modelos. Estes achados indicam a possível associação de Gal-1 com o fenômeno autofágico nas células tumorais.

Análise morfológica do crescimento tridimensional das linhagens representativas de câncer pancreático revelou padrões distintos de crescimento de acordo com a concentração de colágeno do tipo I na matriz. Permitindo assim, a seleção de dois modelos cuja a indução autofágica foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com a quantificação de organelas relacionadas à autofagia, o modelo contendo matriz extracelular com adição de colágeno à 2mg/mL se mostrou mais eficaz na indução do processo autofágico, sendo escolhido para a caracterização da expressão proteica. Neste modelo, e sob as condições de hipóxia e privação nutricional específicas para cada linhagem, foi observado que a hipóxia isolada foi o fator determinante na modulação da expressão das galectinas em PANC-1. Enquanto em Mia PaCa-2, a privação nutricional associada à hipóxia provocaram diminuição relevante das galectinas. Em ambos os casos, a expressão das galectinas e do marcador autofágico LC3 foram congruentes, indicando uma possível associação.

Os perfis de crescimento dos esferoides provenientes de PANC-1 e Mia PaCa-2 são distintos devido, entre outros fatores, à composição da matriz extracelular e capacidade de adesão a seus componentes. Quando cultivados em matriz formada apenas por colágeno do tipo I, os esferoides de PANC-1 apresentam extensões para o interior da matriz, o que não acontece nos esferoides provenientes de Mia PaCa-2. Este comportamento pode ser explicado pelo fato das células PANC-1 apresentarem uma maior capacidade de adesão às moléculas de colágeno dos tipos I e IV, além de possuírem um perfil menos epitelial em comparação à Mia PaCa-2 (MCINTYRE; KIM, 1984; SAWAI et al., 2001; GRECO et al., 2005). Ao mesmo tempo, os esferoides das duas linhagens apresentaram capacidades invasivas semelhantes nas matrizes compostas por Geltrex e colágeno. Este perfil reflete um padrão de adesividade similar entre as duas linhagens em relação a outros componentes da matriz, como fibronectina e laminina, assim como, a outras matrizes extracelulares complexas e semelhantes à Geltrex, como a Matrigel (NAVAGLIA et al., 2003; GRECO et al., 2005).

A inibição da tradução de Gal-3 com siRNA, comprovou a importância da lectina para o evento autofágico. O silenciamento de Gal-3 provocou diminuição da expressão de LC3II e consequentemente do fluxo autofágico nas condições de privação nutricional e hipóxia isoladas para PANC-1 e em todas as condições experimentais para Mia PaCa-2.

A inibição de Gal-3 com o fármaco GCS-100 em células não pequenas de câncer de pulmão, além de prevenir o recrutamento membranar de K-Ras, provocou alterações no processo de segregação membranar e englobamento de conteúdo extracelular por pinocitose. Em modelo tridimensional, xenoinxerto *in vivo* e PDX *ex vivo*, o knockdown de Gal-3 provocou acúmulo de ROS (KATAOKA et al., 2019). No nosso estudo, a inibição de Gal-3 provocou inibição da autofagia, que além de representar um processo de segregação membranar, impede o acúmulo de ROS nas células tumorais (CARDOSO et al., 2016). Recentemente, o envolvimento de Gal-3 com os mecanismos do fenômeno autofágico foi parcialmente relatado. Segundo Chauran et al (2016), o complexo formado por TRIM16, proteína da família TRIM que atua como regulador e receptor autofágico, e Gal-3 atuaria no reconhecimento coordenado de membranas danificadas e sinalizaria para a mobilização dos reguladores centrais da autofagia ATG16L1, ULK1 e Beclin 1 para formação do fagóforo. Estes resultados foram observados em modelo *in vitro* com linhagens de diferentes tumores (CHAUHAN et al., 2016).

Os poucos estudos que realizaram inibição de Gal-3 em tumores pancreáticos relataram diminuição do crescimento do tumor, seja em modelo *in vitro*, *in vivo* ou PDX. A inibição de Gal-3 com o fármaco RN1 impede a interação entre Gal-3 e EGFR, assim como inibe as vias relacionadas à Gal-3, EGFR/ERK/Runx1, BMP/smad/Id-3 e integrina/FAK/JNK (ZHANG et al., 2017). A inibição de Gal-3 com o polissacarídeo HH1-1, o qual também impede a interação entre Gal-3 e EGFR, suprime a proliferação das células tumorais pancreáticas, interrompe o ciclo celular na fase S, induz apoptose, inibe a angiogênese, migração e invasão celular *in vitro*. Além disso, o HH1-1 afeta a via de sinalização Galectina-3/EGFR/AKT/FOXO3 e possui atividade anticâncer *in vivo*, especialmente em xenoinxertos derivados de pacientes (YAO et al., 2019).

Contudo, a literatura a respeito dos mecanismos moleculares associados ao papel das galectinas -1 e -3 no microambiente do câncer de pâncreas, assim como, em aspectos-chave para a sua progressão, como a autofagia, é demasiado deficiente. Este contexto dificulta o estabelecimento de padrões de comportamento e perfis de expressão molecular em modelos distintos para o mesmo tumor.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos é possível concluir que a expressão das galectinas -1 e -3 é modulada pelas condições do microambiente tumoral e o desenvolvimento do tumor é influenciado pela composição da matriz extracelular. Comprovou-se que a expressão das galectinas -1 e -3 e do marcador autofágico LC3 pode apresentar diferentes padrões de acordo com o modelo utilizado no estudo. Ademais, a partir de modelo bidimensional foi provado que a expressão de Gal-3 é importante para o fluxo autofágico do câncer pancreático.

7 PERSPECTIVAS

O presente estudo apresenta as seguintes perspectivas:

- ◆ Avaliar as consequências do silenciamento de Gal-1 sobre o fluxo autofágico das linhagens de câncer pancreático;
- ◆ Estabelecer modelo mimético do microambiente tumoral pancreático com co-cultivo bi e tridimensional das células tumorais pancreáticas e as células estreladas do pâncreas, além das condições nutricionais, gasosas e já determinadas;
- ◆ Compreender a importância das galectinas -1 e -3 para o fenômeno autofágico em modelo murino de PDAC.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.; SCOTT, G. K.; WEINBERG, C. S. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1312, n. 2, p. 137–144, 1996.
- ADHAULIYA, N.; KALAPPANAVAR, A. N.; ALI, I. M.; ANNIGERI, R. G. Autophagy: A Boon or Bane in Oral Cancer. **Oral oncology**, v. 61, p. 120–126, out. 2016.
- ADSAY, N. V.; BASTURK, O.; CHENG, J. D.; ANDEA, A. A. Ductal Neoplasia of the Pancreas: Nosologic, Clinicopathologic, and Biologic Aspects. **Seminars in radiation oncology**, v. 15, n. 4, p. 254–264, out. 2005.
- AGGARWAL, S.; SHARMA, S. C.; DAS, S. N. Galectin-1 and galectin-3: plausible tumour markers for oral squamous cell carcinoma and suitable targets for screening high-risk population. **Clinica Chimica Acta**, v. 442, p. 13–21, 2015.
- AGRAWAL, S. Potential Prognostic Biomarkers in Pancreatic Juice of Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **World journal of clinical oncology**, v. 8, n. 3, p. 255–260, jun. 2017.
- AHMED, H.; ALSADEK, D. M. M. Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 9, p. 113–121, 2015.
- AKAKURA, N.; KOBAYASHI, M.; HORIUCHI, I.; SUZUKI, A.; WANG, J.; CHEN, J.; NIIZEKI, H.; KI, K.; HOSOKAWA, M.; ASAKA, M. Constitutive Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Renders Pancreatic Cancer Cells Resistant to Apoptosis Induced by Hypoxia and Nutrient Deprivation. **Cancer research**, v. 61, n. 17, p. 6548–6554, set. 2001.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. Atlanta: American Cancer Society; 2019.
- ANSARI, D.; CARVAJO, M.; BAUDEN, M.; ANDERSSON, R. Pancreatic Cancer Stroma: Controversies and Current Insights. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 52, n. 6–7, p. 641–646, jun. 2017.
- ASTORGUES-XERRI, L.; RIVEIRO, M. E.; TIJERAS-RABALLAND, A.; SEROVA, M.; NEUZILLET, C.; ALBERT, S.; RAYMOND, E.; FAIVRE, S. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 2, p. 307–319, 2014.
- AUNE, D.; GREENWOOD, D. C.; CHAN, D. S. M.; VIEIRA, R.; VIEIRA, A. R.; NAVARRO ROSENBLATT, D. A.; CADE, J. E.; BURLEY, V. J.; NORAT, T. Body Mass Index, Abdominal Fatness and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Non-Linear Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 23, n. 4, p. 843–852, abr. 2012.
- AVALOS, Y.; CANALES, J.; BRAVO-SAGUA, R.; CRIOLLO, A.; LAVANDERO, S.; QUEST, A. F. G. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. **BioMed research international**, v. 2014, p. 603980, 2014.

AZMI, A. S. **Systems biology in cancer research and drug discovery**. [s.l.] Springer, 2012.
BACIGALUPO, M. L.; CARABIAS, P.; TRONCOSO, M. F. Contribution of Galectin-1, a Glycan-Binding Protein, to Gastrointestinal Tumor Progression. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 29, p. 5266–5281, ago. 2017.

BARONDES, S. H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D. N.; CUMMINGS, R. D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M. A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597–598, 1994.

BARONE, E.; CORRADO, A.; GEMIGNANI, F.; LANDI, S. Environmental risk factors for pancreatic cancer : an update. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 11, p. 2617–2642, 2016.

BATABYAL, P.; VANDER HOORN, S.; CHRISTOPHI, C.; NIKFARJAM, M. Association of Diabetes Mellitus and Pancreatic Adenocarcinoma: A Meta-Analysis of 88 Studies. **Annals of surgical oncology**, v. 21, n. 7, p. 2453–2462, jul. 2014.

BEANEY, A. J.; BANIM, P. J. R.; LUBEN, R.; LENTJES, M. A. H.; KHAW, K.-T.; HART, A. R. Higher Meat Intake Is Positively Associated With Higher Risk of Developing Pancreatic Cancer in an Age-Dependent Manner and Are Modified by Plasma Antioxidants: A Prospective Cohort Study (EPIC-Norfolk) Using Data From Food Diaries. **Pancreas**, v. 46, n. 5, p. 672–678, 2017.

BELLELLI, R.; VITAGLIANO, D.; FEDERICO, G.; MAROTTA, P.; TAMBURRINO, A.; SALERNO, P.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, S.; KNAUF, J. A.; FAGIN, J. A.; REFETOFF, S.; TRONCONE, G.; SANTORO, M. Oncogene-Induced Senescence and Its Evasion in a Mouse Model of Thyroid Neoplasia. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 460, p. 24–35, jan. 2018.

BERBERAT, P. O.; FRIESS, H.; WANG, L.; ZHU, Z.; BLEY, T.; FRIGERI, L.; ZIMMERMANN, A.; BUCHLER, M. W. Comparative Analysis of Galectins in Primary Tumors and Tumor Metastasis in Human Pancreatic Cancer. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 49, n. 4, p. 539–549, abr. 2001.

BERLIN, J. D.; CATALANO, P.; THOMAS, J. P.; KUGLER, J. W.; HALLER, D. G.; BENSON, A. B. 3rd. Phase III Study of Gemcitabine in Combination with Fluorouracil versus Gemcitabine Alone in Patients with Advanced Pancreatic Carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 15, p. 3270–3275, ago. 2002.

BERTOUT, J. A.; MAJMUNDAR, A. J.; GORDAN, J. D.; LAM, J. C.; DITSWORTH, D.; KEITH, B.; BROWN, E. J.; NATHANSON, K. L.; SIMON, M. C. HIF2alpha Inhibition Promotes P53 Pathway Activity, Tumor Cell Death, and Radiation Responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 34, p. 14391–14396, ago. 2009.

BORAZANCI, E.; VON HOFF, D. D. Nab-Paclitaxel and Gemcitabine for the Treatment of Patients with Metastatic Pancreatic Cancer. **Expert review of gastroenterology &**

hepatology, v. 8, n. 7, p. 739–747, set. 2014.

BORTESI, L.; PESCI, A.; BOGINA, G.; CASTELLI, P.; ZAMBONI, G. Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. **Surgical pathology clinics**, v. 4, n. 2, p. 487–521, jun. 2011.

BOSCHER, C.; ZHENG, Y. Z.; LAKSHMINARAYAN, R.; JOHANNES, L.; DENNIS, J. W.; FOSTER, L. J.; NABI, I. R. Galectin-3 Protein Regulates Mobility of N-Cadherin and GM1 Ganglioside at Cell-Cell Junctions of Mammary Carcinoma Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32940–32952, set. 2012.

BOSETTI, C.; BERTUCCIO, P.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C.; ZEEGERS, M. P.; BOFFETTA, P. Pancreatic Cancer: Overview of Descriptive Epidemiology. **Molecular carcinogenesis**, v. 51, n. 1, p. 3–13, jan. 2012.

BOSETTI, C.; ROSATO, V.; LI, D.; SILVERMAN, D.; PETERSEN, G. M.; BRACCI, P. M.; NEALE, R. E.; MUSCAT, J.; ANDERSON, K.; GALLINGER, S.; OLSON, S. H.; MILLER, A. B.; BAS BUENO-DE-MESQUITA, H.; SCELO, G.; JANOUT, V.; HOLCATOVA, I.; LAGIOU, P.; SERRAINO, D.; LUCENTEFORTE, E.; FABIANOVA, E.; GHADIRIAN, P.; BAGHURST, P. A.; ZATONSKI, W.; FORETOVA, L.; FONTHAM, E.; BAMLET, W. R.; HOLLY, E. A.; NEGRI, E.; HASSAN, M.; PRIZMENT, A.; COTTERCHIO, M.; CLEARY, S.; KURTZ, R. C.; MAISONNEUVE, P.; TRICHOPOULOS, D.; POLESEL, J.; DUELL, E. J.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Diabetes, Antidiabetic Medications, and Pancreatic Cancer Risk: An Analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 2065–2072, out. 2014.

BOSMAN, F. T.; CARNEIRO, F.; HRUBAN, R. H.; THEISE, N. D. **WHO classification of tumours of the digestive system**. [s.l.] World Health Organization, 2010.

BRAT, D. J.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. A.; HUNTER, S. B.; PECOT, M.; COHEN, C.; HAMMOND, E. H.; DEVI, S. N.; KAUR, B.; VAN MEIR, E. G. Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population. **Cancer research**, v. 64, n. 3, p. 920–927, fev. 2004.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRISTOW, R. G.; HILL, R. P. Hypoxia and Metabolism. Hypoxia, DNA Repair and Genetic Instability. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 3, p. 180–192, mar. 2008.

BROSENS, L. A. A.; HACKENG, W. M.; OFFERHAUS, G. J.; HRUBAN, R. H.; WOOD, L. D. Pancreatic Adenocarcinoma Pathology: Changing “Landscape”. **Journal of gastrointestinal oncology**, v. 6, n. 4, p. 358–374, ago. 2015.

BROWN, E. J.; ALBERS, M. W.; SHIN, T. B.; ICHIKAWA, K.; KEITH, C. T.; LANE, W. S.; SCHREIBER, S. L. A Mammalian Protein Targeted by G1-Arresting Rapamycin-

Receptor Complex. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 756–758, jun. 1994.

BROWN, L. M.; COWEN, R. L.; DEBRAY, C.; EUSTACE, A.; ERLER, J. T.; SHEPPARD, F. C. D.; PARKER, C. A.; STRATFORD, I. J.; WILLIAMS, K. J. Reversing Hypoxic Cell Chemoresistance in Vitro Using Genetic and Small Molecule Approaches Targeting Hypoxia Inducible Factor-1. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 411–418, fev. 2006.

BRUICK, R. K.; MCKNIGHT, S. L. A Conserved Family of Prolyl-4-Hydroxylases That Modify HIF. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5545, p. 1337–1340, nov. 2001.

CAFFERKEY, R.; YOUNG, P. R.; MCLAUGHLIN, M. M.; BERGSMA, D. J.; KOLTIN, Y.; SATHE, G. M.; FAUCETTE, L.; ENG, W. K.; JOHNSON, R. K.; LIVI, G. P. Dominant Missense Mutations in a Novel Yeast Protein Related to Mammalian Phosphatidylinositol 3-Kinase and VPS34 Abrogate Rapamycin Cytotoxicity. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 10, p. 6012–6023, out. 1993.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 17, p. 1625–1638, abr. 2003.

CAMARA, S. N.; YIN, T.; YANG, M.; LI, X.; GONG, Q.; ZHOU, J.; ZHAO, G.; YANG, Z.-Y.; AROUN, T.; KUETE, M.; RAMDANY, S.; CAMARA, A. K.; DIALLO, A. T.; FENG, Z.; NING, X.; XIONG, J.-X.; TAO, J.; QIN, Q.; ZHOU, W.; CUI, J.; HUANG, M.; GUO, Y.; GOU, S.-M.; WANG, B.; LIU, T.; OLIVIER, O. E. T.; CONDE, T.; CISSE, M.; MAGASSOUBA, A. S.; BALLAH, S.; KEITA, N. L. M.; SOUARE, I. S.; TOURE, A.; TRAORE, S.; BALDE, A. K.; KEITA, N.; CAMARA, N. D.; EMMANUEL, D.; WU, H.-S.; WANG, C.-Y. High Risk Factors of Pancreatic Carcinoma. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban**, v. 36, n. 3, p. 295–304, jun. 2016.

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

CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-Related Inflammation. **Journal of clinical immunology**, v. 33 Suppl 1, p. S79-84, jan. 2013.

CARDOSO, A. C. F.; ANDRADE, L. N. de S.; BUSTOS, S. O.; CHAMMAS, R. Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in oncology**, v. 6, p. 127, 2016.

CARLONI, S.; ALBERTINI, M. C.; GALLUZZI, L.; BUONOCORE, G.; PROIETTI, F.; BALDUINI, W. Increased Autophagy Reduces Endoplasmic Reticulum Stress after Neonatal Hypoxia-Ischemia: Role of Protein Synthesis and Autophagic Pathways. **Experimental neurology**, v. 255, p. 103–112, maio 2014.

CASTRO, R. Câncer na Mídia : uma Questão de Saúde Pública Cancer in the Media : a Matter of Public Health. v. 55, n. 1, p. 41–48, 2007.

CHANG, Q.; QIN, R.; HUANG, T.; GAO, J.; FENG, Y. Effect of Antisense Hypoxia-

Inducible Factor 1alpha on Progression, Metastasis, and Chemosensitivity of Pancreatic Cancer. **Pancreas**, v. 32, n. 3, p. 297–305, abr. 2006.

CHAUHAN, S.; KUMAR, S.; JAIN, A.; PONPUAK, M.; MUDD, M. H.; KIMURA, T.; CHOI, S. W.; PETERS, R.; MANDELL, M.; BRUUN, J.-A.; JOHANSEN, T.; DERETIC, V. TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-Direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. **Developmental cell**, v. 39, n. 1, p. 13–27, out. 2016.

CHAUHAN, V. P.; MARTIN, J. D.; LIU, H.; LACORRE, D. A.; JAIN, S. R.; KOZIN, S. V.; STYLIANOPOULOS, T.; MOUSA, A. S.; HAN, X.; ADSTAMONGKONKUL, P. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. **Nature communications**, v. 4, 2013.

CHEN, C.; LOU, T. Hypoxia Inducible Factors in Hepatocellular Carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, p. 46691–46703, jul. 2017.

CHEN, C.; ZHANG, X. IRE1alpha-XBP1 Pathway Promotes Melanoma Progression by Regulating IL-6/STAT3 Signaling. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 42, fev. 2017.

CHEN, R.; PAN, S.; OTTENHOF, N. A.; DE WILDE, R. F.; WOLFGANG, C. L.; LANE, Z.; POST, J.; BRONNER, M. P.; WILLMANN, J. K.; MAITRA, A. Stromal galectin-1 expression is associated with long-term survival in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer biology & therapy**, v. 13, n. 10, p. 899–907, 2012.

CHEN, Z.; WU, H.; HUANG, S.; LI, W.; ZHANG, S.; ZHENG, P.; ZHOU, X.; LIU, W.; ZHANG, D. Expression of BNIP3 and Its Correlations to Hypoxia-Induced Autophagy and Clinicopathological Features in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. **Cancer biomarkers : section A of Disease markers**, v. 15, n. 4, p. 467–475, 2015.

CHOURASIA, A. H.; MACLEOD, K. F. Tumor Suppressor Functions of BNIP3 and Mitophagy. **Autophagy**, v. 11, n. 10, p. 1937–1938, 2015.

CLAUSSE, N.; VAN DEN BRULE, F.; WALTREGNY, D.; GARNIER, F.; CASTRONOVO, V. Galectin-1 Expression in Prostate Tumor-Associated Capillary Endothelial Cells Is Increased by Prostate Carcinoma Cells and Modulates Heterotypic Cell-Cell Adhesion. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 317–325, 1999.

COLBERT, L. E.; FISHER, S. B.; BALCI, S.; SAKA, B.; CHEN, Z.; KIM, S.; EL-RAYES, B. F.; ADSAY, N. V.; MAITHEL, S. K.; LANDRY, J. C.; CURRAN, W. J. J. High Nuclear Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Expression Is a Predictor of Distant Recurrence in Patients with Resected Pancreatic Adenocarcinoma. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 91, n. 3, p. 631–639, mar. 2015.

COLEMAN, M. P.; FORMAN, D.; BRYANT, H.; BUTLER, J.; RACHET, B.; MARINGE, C.; NUR, U.; TRACEY, E.; COORY, M.; HATCHER, J.; MCGAHAN, C. E.; TURNER, D.; MARRETT, L.; GJERSTORFF, M. L.; JOHANNESSEN, T. B.; ADOLFSSON, J.; LAMBE, M.; LAWRENCE, G.; MEECHAN, D.; MORRIS, E. J.; MIDDLETON, R.; STEWARD, J.; RICHARDS, M. A. Cancer Survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and

the UK, 1995-2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): An Analysis of Population-Based Cancer Registry Data. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9760, p. 127–138, jan. 2011.

COLLISSON, E. A.; BAILEY, P.; CHANG, D. K.; BIANKIN, A. V. Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, fev. 2019.

COPPE, J.-P.; DESPREZ, P.-Y.; KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. **Annual review of pathology**, v. 5, p. 99–118, 2010.

CROCI, D. O.; RABINOVICH, G. A. Linking tumor hypoxia with VEGFR2 signaling and compensatory angiogenesis: Glycans make the difference. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 6, p. e29380, 2014.

CROCI, D. O.; SALATINO, M.; RUBINSTEIN, N.; CERLIANI, J. P.; CAVALLIN, L. E.; LEUNG, H. J.; OUYANG, J.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; DOMAICA, C. I.; CROCI, M. C.; SHIPP, M. A.; MESRI, E. A.; ALBINI, A.; RABINOVICH, G. A. Disrupting Galectin-1 Interactions with N-Glycans Suppresses Hypoxia-Driven Angiogenesis and Tumorigenesis in Kaposi's Sarcoma. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 11, p. 1985–2000, out. 2012.

CRUCHO, C. I. C.; CORREIA-DA-SILVA, P.; PETROVA, K. T.; BARROS, M. T. Recent progress in the field of glycoconjugates. **Carbohydrate research**, v. 402, p. 124–132, 2015.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Essentials of Glycobiology In Varki, A. **Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME**, 2009.

DALOTTO-MORENO, T.; CROCI, D. O.; CERLIANI, J. P.; MARTINEZ-ALLO, V. C.; DERGAN-DYLON, S.; MENDEZ-HUERGO, S. P.; STUPIRSKI, J. C.; MAZAL, D.; OSINAGA, E.; TOSCANO, M. A.; SUNDBLAD, V.; RABINOVICH, G. A.; SALATINO, M. Targeting Galectin-1 Overcomes Breast Cancer-Associated Immunosuppression and Prevents Metastatic Disease. **Cancer research**, v. 73, n. 3, p. 1107–1117, fev. 2013.

DE OLIVEIRA, J. T.; DE MATOS, A. J.; BARROS, R.; RIBEIRO, C.; CHEN, A.; HESPANHOL, V.; RUTTEMAN, G. R.; GAERTNER, F. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in canine non-malignant and malignant mammary tissues and in progression to metastases in mammary tumors. **Anticancer research**, v. 34, n. 5, p. 2211–2221, 2014.

DECAPRIO, J. A.; MAYER, R. J.; GONIN, R.; ARBUCK, S. G. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously untreated patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas: results of a phase II trial. **Journal of clinical oncology**, v. 9, n. 12, p. 2128–2133, 1991.

DEER, E. L.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.; COURSEN, J. D.; SHEA, J. E.; NGATIA, J.; SCAIFE, C. L.; FIRPO, M. A.; MULVIHILL, S. J. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. **Pancreas**, v. 39, n. 4, p. 425–435, maio 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418756>>.

DEGENHARDT, K.; MATHEW, R.; BEAUDOIN, B.; BRAY, K.; ANDERSON, D.; CHEN, G.; MUKHERJEE, C.; SHI, Y.; GELINAS, C.; FAN, Y.; NELSON, D. A.; JIN, S.; WHITE,

E. Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Restricts Necrosis, Inflammation, and Tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, jul. 2006.

DI MASO, M.; TALAMINI, R.; BOSETTI, C.; MONTELLA, M.; ZUCCHETTO, A.; LIBRA, M.; NEGRI, E.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C.; FRANCESCHI, S.; SERRAINO, D.; POLESEL, J. Red Meat and Cancer Risk in a Network of Case-Control Studies Focusing on Cooking Practices. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 24, n. 12, p. 3107–3112, dez. 2013.

DRAKE, L. E.; SPRINGER, M. Z.; POOLE, L. P.; KIM, C. J.; MACLEOD, K. F. Expanding Perspectives on the Significance of Mitophagy in Cancer. **Seminars in cancer biology**, v. 47, p. 110–124, dez. 2017.

DUECHLER, M.; PECZEK, L.; SZUBERT, M.; SUZIN, J. Influence of hypoxia inducible factors on the immune microenvironment in ovarian cancer. **Anticancer research**, v. 34, n. 6, p. 2811–2819, 2014.

DUELL, E. J.; LUCENTEFORTE, E.; OLSON, S. H.; BRACCI, P. M.; LI, D.; RISCH, H. A.; SILVERMAN, D. T.; JI, B. T.; GALLINGER, S.; HOLLY, E. A.; FONTHAM, E. H.; MAISONNEUVE, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; GHADIRIAN, P.; KURTZ, R. C.; LUDWIG, E.; YU, H.; LOWENFELS, A. B.; SEMINARA, D.; PETERSEN, G. M.; LA VECCHIA, C.; BOFFETTA, P. Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 23, n. 11, p. 2964–2970, nov. 2012.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, 2006.

EBRAHIM, A. H.; ALALAWI, Z.; MIRANDOLA, L.; RAKHSHANDA, R.; DAHLBECK, S.; NGUYEN, D.; JENKINS, M.; GRIZZI, F.; COBOS, E.; FIGUEROA, J. A. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 9, 2014.

FEIG, C.; GOPINATHAN, A.; NEESSE, A.; CHAN, D. S.; COOK, N.; TUVESON, D. A. The pancreas cancer microenvironment. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 16, p. 4266–4276, 15 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442232/>>.

FERDEK, P. E.; JAKUBOWSKA, M. A. Biology of Pancreatic Stellate Cells-More than Just Pancreatic Cancer. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, abr. 2017.

FIMIA, G. M.; STOYKOVA, A.; ROMAGNOLI, A.; GIUNTA, L.; DI BARTOLOMEO, S.; NARDACCI, R.; CORAZZARI, M.; FUOCO, C.; UCAR, A.; SCHWARTZ, P.; GRUSS, P.; PIACENTINI, M.; CHOWDHURY, K.; CECCONI, F. Ambra1 Regulates Autophagy and Development of the Nervous System. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1121–1125, jun. 2007.

FITZNER, B.; WALZEL, H.; SPARMANN, G.; EMMRICH, J.; LIEBE, S.; JASTER, R. Galectin-1 Is an Inductor of Pancreatic Stellate Cell Activation. **Cellular signalling**, v. 17, n. 10, p. 1240–1247, out. 2005.

FORTUNA-COSTA, A.; GOMES, A. M.; KOZLOWSKI, E. O.; STELLING, M. P.; PAVÃO, M. S. G. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 4, 2014.

FURTAK, V.; HATCHER, F.; OCHIENG, J. Galectin-3 mediates the endocytosis of β -1 integrins by breast carcinoma cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 4, p. 845–850, 2001.

GALLUZZI, L.; BAEHRECKE, E. H.; BALLABIO, A.; BOYA, P.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; CECCONI, F.; CHOI, A. M.; CHU, C. T.; CODOGNO, P.; COLOMBO, M. I.; CUERVO, A. M.; DEBNATH, J.; DERETIC, V.; DIKIC, I.; ESKELINEN, E.-L.; FIMIA, G. M.; FULDA, S.; GEWIRTZ, D. A.; GREEN, D. R.; HANSEN, M.; HARPER, J. W.; JAATTELA, M.; JOHANSEN, T.; JUHASZ, G.; KIMMELMAN, A. C.; KRAFT, C.; KTISTAKIS, N. T.; KUMAR, S.; LEVINE, B.; LOPEZ-OTIN, C.; MADEO, F.; MARTENS, S.; MARTINEZ, J.; MELENDEZ, A.; MIZUSHIMA, N.; MUNZ, C.; MURPHY, L. O.; PENNINGER, J. M.; PIACENTINI, M.; REGGIORI, F.; RUBINSZTEIN, D. C.; RYAN, K. M.; SANTAMBROGIO, L.; SCORRANO, L.; SIMON, A. K.; SIMON, H.-U.; SIMONSEN, A.; TAVERNARAKIS, N.; TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T.; YUAN, J.; YUE, Z.; ZHONG, Q.; KROEMER, G. Molecular Definitions of Autophagy and Related Processes. **The EMBO journal**, v. 36, n. 13, p. 1811–1836, jul. 2017.

GAMMOH, N.; FRASER, J.; PUENTE, C.; SYRED, H. M.; KANG, H.; OZAWA, T.; LAM, D.; ACOSTA, J. C.; FINCH, A. J.; HOLLAND, E.; JIANG, X. Suppression of Autophagy Impedes Glioblastoma Development and Induces Senescence. **Autophagy**, v. 12, n. 9, p. 1431–1439, set. 2016.

GAO, J.; WANG, W. Knockdown of Galectin-1 Facilitated Cisplatin Sensitivity by Inhibiting Autophagy in Neuroblastoma Cells. **Chemico-biological interactions**, v. 297, p. 50–56, jan. 2019.

GILKES, D. M.; SEMENZA, G. L. Role of Hypoxia-Inducible Factors in Breast Cancer Metastasis. **Future oncology (London, England)**, v. 9, n. 11, p. 1623–1636, nov. 2013.

GILLIES, R. J.; ROBEY, I.; GATENBY, R. A. Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 49 Suppl 2, p. 24S–42S, jun. 2008.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactive Species: A Cell Damaging Rout Assisting to Chemical Carcinogens. **Cancer letters**, v. 266, n. 1, p. 73–83, jul. 2008.

GONG, J.; WANG, X.-Z.; WANG, T.; CHEN, J.-J.; XIE, X.-Y.; HU, H.; YU, F.; LIU, H.-L.; JIANG, X.-Y.; FAN, H.-D. Molecular Signal Networks and Regulating Mechanisms of the Unfolded Protein Response. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

GRADIZ, R.; SILVA, H. C.; CARVALHO, L.; BOTELHO, M. F.; MOTA-PINTO, A. MIA PaCa-2 and PANC-1 - Pancreas Ductal Adenocarcinoma Cell Lines with Neuroendocrine Differentiation and Somatostatin Receptors. **Scientific reports**, v. 6, p. 21648, fev. 2016.

GRAEBER, T. G.; OSMANIAN, C.; JACKS, T.; HOUSMAN, D. E.; KOCH, C. J.; LOWE, S. W.; GIACCIA, A. J. Hypoxia-Mediated Selection of Cells with Diminished Apoptotic Potential in Solid Tumours. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 88–91, jan. 1996.

GRAHAM, K.; UNGER, E. Overcoming Tumor Hypoxia as a Barrier to Radiotherapy, Chemotherapy and Immunotherapy in Cancer Treatment. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 6049–6058, 2018.

GRECO, E.; BASSO, D.; FOGAR, P.; MAZZA, S.; NAVAGLIA, F.; ZAMBON, C. F.; FALDA, A.; PEDRAZZOLI, S.; ANCONA, E.; PLEBANI, M. Pancreatic Cancer Cells Invasiveness Is Mainly Affected by Interleukin-1 β Not by Transforming Growth Factor-Beta1. **The International journal of biological markers**, v. 20, n. 4, p. 235–241, 2005.

GREIJER, A. E.; VAN DER GROEP, P.; KEMMING, D.; SHVARTS, A.; SEMENZA, G. L.; MEIJER, G. A.; VAN DE WIEL, M. A.; BELIEN, J. A. M.; VAN DIEST, P. J.; VAN DER WALL, E. Up-Regulation of Gene Expression by Hypoxia Is Mediated Predominantly by Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1). **The Journal of pathology**, v. 206, n. 3, p. 291–304, jul. 2005.

GRUTZMANN, R.; PILARSKY, C.; AMMERPOHL, O.; LUTTGES, J.; BOHME, A.; SIPOS, B.; FOERDER, M.; ALLDINGER, I.; JAHNKE, B.; SCHACKERT, H. K.; KALTHOFF, H.; KREMER, B.; KLOPPPEL, G.; SAEGER, H. D. Gene Expression Profiling of Microdissected Pancreatic Ductal Carcinomas Using High-Density DNA Microarrays. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 6, n. 5, p. 611–622, 2004.

GUILLAUMOND, F.; IOVANNA, J. L.; VASSEUR, S. Pancreatic Tumor Cell Metabolism: Focus on Glycolysis and Its Connected Metabolic Pathways. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 545, p. 69–73, mar. 2014.

GUO, J. Y.; CHEN, H.-Y.; MATHEW, R.; FAN, J.; STROHECKER, A. M.; KARSLI-UZUNBAS, G.; KAMPHORST, J. J.; CHEN, G.; LEMONS, J. M. S.; KARANTZA, V.; COLLIER, H. A.; DIPAOLO, R. S.; GELINAS, C.; RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Activated Ras Requires Autophagy to Maintain Oxidative Metabolism and Tumorigenesis. **Genes & development**, v. 25, n. 5, p. 460–470, mar. 2011.

GUO, K.; SEARFOSS, G.; KROLIKOWSKI, D.; PAGNONI, M.; FRANKS, C.; CLARK, K.; YU, K. T.; JAYE, M.; IVASHCHENKO, Y. Hypoxia Induces the Expression of the Pro-Apoptotic Gene BNIP3. **Cell death and differentiation**, v. 8, n. 4, p. 367–376, abr. 2001.

GUPTA, R.; AMANAM, I.; CHUNG, V. Current and Future Therapies for Advanced Pancreatic Cancer. **Journal of surgical oncology**, v. 116, n. 1, p. 25–34, jul. 2017.

HANN, A.; GRUNER, A.; CHEN, Y.; GRESS, T. M.; BUCHHOLZ, M. Comprehensive analysis of cellular galectin-3 reveals no consistent oncogenic function in pancreatic cancer cells. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20859, 2011.

HAUGVIK, S.-P.; HEDENSTROM, P.; KORSÆTH, E.; VALENTE, R.; HAYES, A.; SIUKA, D.; MAISONNEUVE, P.; GLADHAUG, I. P.; LINDKVIST, B.; CAPURSO, G. Diabetes, Smoking, Alcohol Use, and Family History of Cancer as Risk Factors for Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis.

Neuroendocrinology, v. 101, n. 2, p. 133–142, 2015.

HE, J.; BAUM, L. G. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. **Laboratory investigation**, v. 86, n. 6, p. 578, 2006.

HEITMAN, J.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. **Science (New York, N.Y.)**, v. 253, n. 5022, p. 905–909, ago. 1991.

HRUBAN, R. H.; KLIMSTRA, D. S. Adenocarcinoma of the pancreas. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 31, n. 6, p. 443–451, 2 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313868/>>.

HUSSEIN, D.; ESTLIN, E. J.; DIVE, C.; MAKIN, G. W. J. Chronic Hypoxia Promotes Hypoxia-Inducible Factor-1alpha-Dependent Resistance to Etoposide and Vincristine in Neuroblastoma Cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 5, n. 9, p. 2241–2250, set. 2006.

IKEMORI, R. Y.; MACHADO, C. M.; FURUZAWA, K. M.; NONOGAKI, S.; OSINAGA, E.; UMEZAWA, K.; DE CARVALHO, M. A.; VERINAUD, L.; CHAMMAS, R. Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived. 2014.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of Pancreatic Cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 44, p. 9694–9705, nov. 2016.

ILMER, M.; MAZUREK, N.; GILCREASE, M. Z.; BYRD, J. C.; WOODWARD, W. A.; BUCHHOLZ, T. A.; ACKLIN, K.; RAMIREZ, K.; HAFLEY, M.; ALT, E.; VYKOUKAL, J.; BRESALIER, R. S. Low Expression of Galectin-3 Is Associated with Poor Survival in Node-Positive Breast Cancers and Mesenchymal Phenotype in Breast Cancer Stem Cells. **Breast cancer research : BCR**, v. 18, n. 1, p. 97, set. 2016.

INAMI, Y.; WAGURI, S.; SAKAMOTO, A.; KOUNO, T.; NAKADA, K.; HINO, O.; WATANABE, S.; ANDO, J.; IWADATE, M.; YAMAMOTO, M.; LEE, M.-S.; TANAKA, K.; KOMATSU, M. Persistent Activation of Nrf2 through P62 in Hepatocellular Carcinoma Cells. **The Journal of cell biology**, v. 193, n. 2, p. 275–284, abr. 2011.

ITO, K.; STANNARD, K.; GABUTERO, E.; CLARK, A. M.; NEO, S.-Y.; ONTURK, S.; BLANCHARD, H.; RALPH, S. J. Galectin-1 as a Potent Target for Cancer Therapy: Role in the Tumor Microenvironment. **Cancer metastasis reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 763–778, dez. 2012.

JANJI, B.; VIRY, E.; BAGINSKA, J.; VAN MOER, K.; BERCHEM, G. Role of autophagy in cancer and tumor progression. In: **Autophagy-A Double-Edged Sword-Cell Survival or Death?** [s.l.] IntechOpen, 2013.

JAWHARI, S.; VERDIER, M.; DEATH, C. Glioblastoma , hypoxia and autophagy : a survival-prone ‘ ménage-à-trois ’. p. 1–10, 2016.

JIAO, L.; DE GONZALEZ, A. B.; HARTGE, P.; PFEIFFER, R. M.; PARK, Y.; FREEDMAN, D. M.; GAIL, M. H.; ALAVANJA, M. C. R.; ALBANES, D.; BEANE

FREEMAN, L. E.; CHOW, W.-H.; HUANG, W.-Y.; HAYES, R. B.; HOPPIN, J. A.; JI, B.; LEITZMANN, M. F.; LINET, M. S.; MEINHOLD, C. L.; SCHAIRER, C.; SCHATZKIN, A.; VIRTAMO, J.; WEINSTEIN, S. J.; ZHENG, W.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts. **Cancer causes & control : CCC**, v. 21, n. 8, p. 1305–1314, 10 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904431/>>.

JUNG, Y. Y.; LEE, Y. K.; KOO, J. S. The Potential of Beclin 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Breast Cancer. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 20, n. 2, p. 167–178, 2016.

KATAOKA, Y.; OHSHIO, Y.; TERAMOTO, K.; IGARASHI, T.; ASAI, T.; HANAOKA, J. Hypoxia-induced Galectin3 Enhances RhoA Function to Activate the Motility of Tumor Cells in Non-small Cell Lung Cancer. **Oncology reports**, v. 41, n. 2, p. 853–862, fev. 2019.

KIHARA, A.; KABEYA, Y.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. Beclin-Phosphatidylinositol 3-Kinase Complex Functions at the Trans-Golgi Network. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 330–335, abr. 2001.

KIMMELMAN, A. C.; WHITE, E. Autophagy and Tumor Metabolism. **Cell metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1037–1043, maio 2017.

KIRKEGARD, J.; MORTENSEN, F. V.; CRONIN-FENTON, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American journal of gastroenterology**, ago. 2017.

KITADA, T.; SEKI, S.; SAKAGUCHI, H.; SAWADA, T.; HIRAKAWA, K.; WAKASA, K. Clinicopathological Significance of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Human Pancreatic Carcinoma. **Histopathology**, v. 43, n. 6, p. 550–555, dez. 2003.

KLAIBER, U.; LEONHARDT, C.-S.; STROBEL, O.; TJADEN, C.; HACKERT, T.; NEOPTOLEMOS, J. P. Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy in Pancreatic Cancer. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 403, n. 8, p. 917–932, dez. 2018.

KLEIN, A. P. Identifying People at a High Risk of Developing Pancreatic Cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 1, p. 66–74, jan. 2013.

KLOPPEL, G.; LUTTGES, J. The Pathology of Ductal-Type Pancreatic Carcinomas and Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Insights for Clinicians. **Current gastroenterology reports**, v. 6, n. 2, p. 111–118, abr. 2004.

KNAPP, J. S.; LOKESHWAR, S. D.; VOGEL, U.; HENNENLOTTER, J.; SCHWENTNER, C.; KRAMER, M. W.; STENZL, A.; MERSEBURGER, A. S. Galectin-3 expression in prostate cancer and benign prostate tissues: correlation with biochemical recurrence. **World journal of urology**, v. 31, n. 2, p. 351–358, 2013.

KOBAYASHI, T.; SHIMURA, T.; YAJIMA, T.; KUBO, N.; ARAKI, K.; TSUTSUMI, S.; SUZUKI, H.; KUWANO, H.; RAZ, A. Transient Gene Silencing of Galectin-3 Suppresses Pancreatic Cancer Cell Migration and Invasion through Degradation of Beta-Catenin. **International journal of cancer**, v. 129, n. 12, p. 2775–2786, dez. 2011.

KOONG, A. C.; MEHTA, V. K.; LE, Q. T.; FISHER, G. A.; TERRIS, D. J.; BROWN, J. M.; BASTIDAS, A. J.; VIERRA, M. Pancreatic Tumors Show High Levels of Hypoxia.

International journal of radiation oncology, biology, physics, v. 48, n. 4, p. 919–922, nov. 2000.

KOSMAHL, M.; PAUSER, U.; ANLAUF, M.; KLOPPPEL, G. Pancreatic Ductal Adenocarcinomas with Cystic Features: Neither Rare nor Uniform. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 9, p. 1157–1164, set. 2005.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

KUNG, C.-P.; BUDINA, A.; BALABURSKI, G.; BERGENSTOCK, M. K.; MURPHY, M. Autophagy in Tumor Suppression and Cancer Therapy. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 21, n. 1, p. 71–100, 2011.

KUNZ, J.; HENRIQUEZ, R.; SCHNEIDER, U.; DEUTER-REINHARD, M.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. Target of Rapamycin in Yeast, TOR2, Is an Essential Phosphatidylinositol Kinase Homolog Required for G1 Progression. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 585–596, maio 1993.

LAHM, H.; ANDRÉ, S.; HOEFLICH, A.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.-C.; SORDAT, B.; VON DER LIETH, C.-W.; WOLF, E.; GABIUS, H.-J. Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. **Glycoconjugate journal**, v. 20, n. 4, p. 227–238, 2003.

LAL, G.; LIU, G.; SCHMOCKER, B.; KAURAH, P.; OZCELIK, H.; NAROD, S. A.; REDSTON, M.; GALLINGER, S. Inherited Predisposition to Pancreatic Adenocarcinoma: Role of Family History and Germ-Line P16, BRCA1, and BRCA2 Mutations. **Cancer research**, v. 60, n. 2, p. 409–416, jan. 2000.

LAU, S. C.; CHEUNG, W. Y. Evolving Treatment Landscape for Early and Advanced Pancreatic Cancer. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 9, n. 7, p. 281–292, jul. 2017.

LE MERCIER, M.; MATHIEU, V.; HAIBE-KAINS, B.; BONTEMPI, G.; MIJATOVIC, T.; DECAESTECKER, C.; KISS, R.; LEFRANC, F. Knocking down Galectin 1 in Human Hs683 Glioblastoma Cells Impairs Both Angiogenesis and Endoplasmic Reticulum Stress Responses. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 67, n. 5, p. 456–469, maio 2008.

LEE, H. S.; PARK, S. W. Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. **Gut and Liver**, v. 10, n. 3, p. 340–347, 15 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4849685/>>.

LEE, K.-E.; HEO, J.-E.; KIM, J.-M.; HWANG, C.-S. N-Terminal Acetylation-Targeted N-End Rule Proteolytic System: The Ac/N-End Rule Pathway. **Molecules and cells**, v. 39, n. 3, p. 169–178, mar. 2016.

LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to

galectins. **Glycoconjugate journal**, v. 19, n. 7, p. 433–440, 2002.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, C. G.; THORBURN, A. Targeting Autophagy in Cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 17, n. 9, p. 528–542, set. 2017.

LI, Q.; YAN, H.; LIU, W.; ZHEN, H.; YANG, Y.; CAO, B. Efficacy and Safety of Gemcitabine-Fluorouracil Combination Therapy in the Management of Advanced Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104346, 2014.

LIANG, C.; FENG, P.; KU, B.; DOTAN, I.; CANAANI, D.; OH, B.-H.; JUNG, J. U. Autophagic and Tumour Suppressor Activity of a Novel Beclin1-Binding Protein UVRAG. **Nature cell biology**, v. 8, n. 7, p. 688–699, jul. 2006.

LIANG, X. H.; JACKSON, S.; SEAMAN, M.; BROWN, K.; KEMPKE, B.; HIBSHOOSH, H.; LEVINE, B. Induction of Autophagy and Inhibition of Tumorigenesis by Beclin 1. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 672–676, dez. 1999.

LIGHTSEY, D. Comment on “Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies”. **British journal of cancer** England, ago. 2012. .

LILIENBAUM, A. Relationship between the Proteasomal System and Autophagy. **International journal of biochemistry and molecular biology**, v. 4, n. 1, p. 1–26, 2013.

LIU, L.; LIAO, J.-Z.; HE, X.-X.; LI, P.-Y. The Role of Autophagy in Hepatocellular Carcinoma: Friend or Foe. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 57707–57722, ago. 2017.

LIU, Q.; LIAO, Q.; ZHAO, Y. Chemotherapy and Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer. **Cancer cell international**, v. 17, p. 68, 2017.

LIU, S.-Z.; CHEN, W.-Q.; WANG, N.; YIN, M.-M.; SUN, X.-B.; HE, Y.-T. Dietary Factors and Risk of Pancreatic Cancer: A Multi-Centre Case-Control Study in China. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 18, p. 7947–7950, 2014.

LIU, Z.-J.; SEMENZA, G. L.; ZHANG, H.-F. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Breast Cancer Metastasis. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 16, n. 1, p. 32–43, jan. 2015.

LOBSANOV, Y. D.; GITT, M. A.; LEFFLER, H.; BARONDES, S. H.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 36, p. 27034–27038, 1993.

LOTZ, M. M.; ANDREWS, C. W.; KORZELIUS, C. A.; LEE, E. C.; STEELE, G. D.; CLARKE, A.; MERCURIO, A. M. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3466–3470, 1993.

LOZY, F.; KARANTZA, V. Autophagy and Cancer Cell Metabolism. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, n. 4, p. 395–401, jun. 2012.

LUCHINI, C.; CAPELLI, P.; SCARPA, A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. **Surgical pathology clinics**, v. 9, n. 4, p. 547–560, dez. 2016.

LUGO, A.; PEVERI, G.; BOSETTI, C.; BAGNARDI, V.; CRIPPA, A.; ORSINI, N.; ROTA, M.; GALLUS, S. Strong Excess Risk of Pancreatic Cancer for Low Frequency and Duration of Cigarette Smoking: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 104, p. 117–126, nov. 2018.

LUO, B.; LEE, A. S. The Critical Roles of Endoplasmic Reticulum Chaperones and Unfolded Protein Response in Tumorigenesis and Anticancer Therapies. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 805–818, fev. 2013.

MALKA, D.; HAMMEL, P.; MAIRE, F.; RUFAT, P.; MADEIRA, I.; PESSIONE, F.; LEVY, P.; RUSZNIEWSKI, P. Risk of Pancreatic Adenocarcinoma in Chronic Pancreatitis. **Gut**, v. 51, n. 6, p. 849–852, dez. 2002.

MASAMUNE, A.; SATOH, M.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; SATOH, K.; SHIMOSEGAWA, T. Galectin-1 Induces Chemokine Production and Proliferation in Pancreatic Stellate Cells. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 290, n. 4, p. G729–36, abr. 2006.

MATHEW, R.; KARP, C. M.; BEAUDOIN, B.; VUONG, N.; CHEN, G.; CHEN, H.-Y.; BRAY, K.; REDDY, A.; BHANOT, G.; GELINAS, C.; DIPOLA, R. S.; KARANTZA-WADSWORTH, V.; WHITE, E. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of P62. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1062–1075, jun. 2009.

MCGUIGAN, A.; KELLY, P.; TURKINGTON, R. C.; JONES, C.; COLEMAN, H. G.; MCCAIN, R. S. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 43, p. 4846–4861, nov. 2018.

MCINTYRE, L. J.; KIM, Y. S. Effects of Sodium Butyrate and Dimethylsulfoxide on Human Pancreatic Tumor Cell Lines. **European journal of cancer & clinical oncology**, v. 20, n. 2, p. 265–271, fev. 1984.

MOLE-BAJER, J.; BAJER, A. S. Action of taxol on mitosis: modification of microtubule arrangements and function of the mitotic spindle in *Haemanthus endosperm*. **The Journal of cell biology**, v. 96, n. 2, p. 527–540, 1983.

MORSELLI, E.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; VICENCIO, J.-M.; CRIOLLO, A.; MAIURI, M. C.; KROEMER, G. Anti- and pro-Tumor Functions of Autophagy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1793, n. 9, p. 1524–1532, set. 2009.

MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M. T. P62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1001–1004, jun. 2009.

MOVAFAGH, S.; CROOK, S.; VO, K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 696–703, 2015.

MPEKRIS, F.; PAPAGEORGIS, P.; POLYDOROU, C.; VOUTOURI, C.; KALLI, M.; PIRENTIS, A. P.; STYLIANOPOULOS, T. Sonic-Hedgehog Pathway Inhibition Normalizes Desmoplastic Tumor Microenvironment to Improve Chemo- and Nanotherapy. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 261, p. 105–112, set. 2017.

MURPHY, J. E.; WO, J. Y.-L.; FERRONE, C.; JIANG, W.; YEAP, B. Y.; BLASZKOWSKY, L. S.; KWAK, E. L.; ALLEN, J. N.; CLARK, J. W.; FARIS, J. E. **TGF- β 1 inhibition with losartan in combination with FOLFIRINOX (F-NOX) in locally advanced pancreatic cancer (LAPC): Preliminary feasibility and R0 resection rates from a prospective phase II study.** American Society of Clinical Oncology, , 2017. .

NAKAHARA, S.; RAZ, A. Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3, p. 605–610, 2007.

NAKAMURA, M.; INUFUSA, H.; ADACHI, T.; AGA, M.; KURIMOTO, M.; NAKATANI, Y.; WAKANO, T.; NAKAJIMA, A.; HIDA, J. I.; MIYAKE, M. Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. **International journal of oncology**, v. 15, n. 1, p. 143–151, 1999.

NAKAYAMA, R.; KURODA, J.; TANIYAMA, N.; YAMAMOTO-SUGITANI, M.; WADA, S.; KIYOTA, M.; MIZUTANI, S.; CHINEN, Y.; MATSUMOTO, Y.; NAGOSHI, H. Suppression of SERPINA1-albumin complex formation by galectin-3 overexpression leads to paracrine growth promotion of chronic myelogenous leukemia cells. **Leukemia research**, v. 38, n. 1, p. 103–108, 2014.

NAVAGLIA, F.; FOGAR, P.; GRECO, E.; BASSO, D.; STEFANI, A. L.; MAZZA, S.; ZAMBON, C. F.; HABELER, W.; ALTAVILLA, G.; AMADORI, A.; CECCHETTO, A.; PLEBANI, M. CD44v10: An Antimetastatic Membrane Glycoprotein for Pancreatic Cancer. **The International journal of biological markers**, v. 18, n. 2, p. 130–138, 2003.

NEESSE, A.; MICHL, P.; FRESE, K. K.; FEIG, C.; COOK, N.; JACOBETZ, M. A.; LOLKEMA, M. P.; BUCHHOLZ, M.; OLIVE, K. P.; GRESS, T. M.; TUVESON, D. A. Stromal Biology and Therapy in Pancreatic Cancer. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 861–868, jun. 2011.

NGAMRUENGPHONG, S.; CANTO, M. I. S c r e e n i n g f o r P a n c r e a t i c Cancer. v. 96, p. 1223–1233, 2016.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855–867, 2006.

OKUNIEFF, P.; FENTON, B.; CHEN, Y. Past, present, and future of oxygen in cancer research. In: **Oxygen Transport to Tissue XXVI**. [s.l.] Springer, 2005. p. 213–222.

OMARY, M. B.; LUGEA, A.; LOWE, A. W.; PANDOL, S. J. The Pancreatic Stellate Cell: A Star on the Rise in Pancreatic Diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 50–59, jan. 2007.

OROZCO, C. A.; MARTINEZ-BOSCH, N.; GUERRERO, P. E.; VINAIXA, J.; DALOTTO-MORENO, T.; IGLESIAS, M.; MORENO, M.; DJUREC, M.; POIRIER, F.; GABIUS, H.-J.; FERNANDEZ-ZAPICO, M. E.; HWANG, R. F.; GUERRA, C.; RABINOVICH, G. A.; NAVARRO, P. Targeting Galectin-1 Inhibits Pancreatic Cancer Progression by Modulating Tumor-Stroma Crosstalk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 16, p. E3769–E3778, abr. 2018.

OSINSKY, S.; ZAVELEVICH, M.; VAUPEL, P. **Tumor hypoxia and malignant progression**. **Experimental oncology** Ukraine, jun. 2009. .

PALUSZKIEWICZ, P.; SMOLINSKA, K.; DEBINSKA, I.; TURSKI, W. A. Main Dietary Compounds and Pancreatic Cancer Risk. The Quantitative Analysis of Case-Control and Cohort Studies. **Cancer epidemiology**, v. 36, n. 1, p. 60–67, fev. 2012.

PANG, T. C. Y.; WILSON, J. S.; APTE, M. V. Pancreatic Stellate Cells: What's New? **Current opinion in gastroenterology**, v. 33, n. 5, p. 366–373, set. 2017.

PARKIN, D. M.; BOYD, L.; WALKER, L. C. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. **British journal of cancer**, v. 105, n. S2, p. S77, 2011.

PARTRIDGE, E. A.; LE ROY, C.; DI GUGLIELMO, G. M.; PAWLING, J.; CHEUNG, P.; GRANOVSKY, M.; NABI, I. R.; WRANA, J. L.; DENNIS, J. W. Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5693, p. 120–124, out. 2004.

PATEL, A. G.; TOYAMA, M. T.; ALVAREZ, C.; NGUYEN, T. N.; REBER, P. U.; ASHLEY, S. W.; REBER, H. A. Pancreatic Interstitial PH in Human and Feline Chronic Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 109, n. 5, p. 1639–1645, nov. 1995.

PATTINGRE, S.; LEVINE, B. Bcl-2 Inhibition of Autophagy: A New Route to Cancer? **Cancer research**, v. 66, n. 6, p. 2885–2888, mar. 2006.

PAZ, A.; HAKLAI, R.; ELAD-SFADIA, G.; BALLAN, E.; KLOOG, Y. Galectin-1 Binds Oncogenic H-Ras to Mediate Ras Membrane Anchorage and Cell Transformation. **Oncogene**, v. 20, n. 51, p. 7486–7493, nov. 2001.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: Versatile Modulators of Cell Adhesion, Cell Proliferation, and Cell Death. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 76, n. 6, p. 402–412, maio 1998.

POLYDOROU, C.; MPEKRIS, F.; PAPAGEORGIS, P.; VOUTOURI, C.; STYLIANOPOULOS, T. Pirfenidone normalizes the tumor microenvironment to improve chemotherapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 15, p. 24506, 2017.

PROST, P.; YCHOU, M.; AZRIA, D. [Gemcitabine and pancreatic cancer]. **Bulletin du cancer**, v. 89 Spec No, p. S91-5, ago. 2002.

QIAN, D.; LU, Z.; XU, Q.; WU, P.; TIAN, L.; ZHAO, L.; CAI, B.; YIN, J.; WU, Y.;

STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; JIANG, K.; MIAO, Y.; LI, G. Galectin-1-Driven Upregulation of SDF-1 in Pancreatic Stellate Cells Promotes Pancreatic Cancer Metastasis. **Cancer letters**, v. 397, p. 43–51, jul. 2017.

RABINOVICH, G. A. Galectin-1 as a potential cancer target. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 7, p. 1188–1192, 2005.

RATNER, D. M.; ADAMS, E. W.; DISNEY, M. D.; SEEBERGER, P. H. Tools for glycomics: mapping interactions of carbohydrates in biological systems. **ChemBioChem**, v. 5, n. 10, p. 1375–1383, 2004.

RAUFI, A. G.; MANJI, G. A.; CHABOT, J. A.; BATES, S. E. Neoadjuvant Treatment for Pancreatic Cancer. **Seminars in oncology**, v. 46, n. 1, p. 19–27, fev. 2019.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; GADUPUTI, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. **World journal of oncology**, v. 10, n. 1, p. 10–27, fev. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30834048>>.

REN, B.; LIU, X.; SURIAWINATA, A. A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. **The American journal of pathology**, v. 189, n. 1, p. 9–21, jan. 2019.

REN, X.; WEI, X.; DING, Y.; QI, F.; ZHANG, Y.; HU, X.; QIN, C.; LI, X. Comparison of neoadjuvant therapy and upfront surgery in resectable pancreatic cancer: a meta-analysis and systematic review. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 733–744, 22 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30774360>>.

ROHRMANN, S.; LINSEISEN, J.; NOTHLINGS, U.; OVERVAD, K.; EGEBERG, R.; TJONNELAND, A.; BOUTRON-ROUAULT, M. C.; CLAVEL-CHAPELON, F.; COTTET, V.; PALA, V.; TUMINO, R.; PALLI, D.; PANICO, S.; VINEIS, P.; BOEING, H.; PISCHON, T.; GROTE, V.; TEUCHER, B.; KHAW, K.-T.; WAREHAM, N. J.; CROWE, F. L.; GOUFA, I.; ORFANOS, P.; TRICHOPOULOU, A.; JEURNINK, S. M.; SIERSEMA, P. D.; PEETERS, P. H. M.; BRUSTAD, M.; ENGESET, D.; SKEIE, G.; DUELL, E. J.; AMIANO, P.; BARRICARTE, A.; MOLINA-MONTES, E.; RODRIGUEZ, L.; TORMO, M.-J.; SUND, M.; YE, W.; LINDKVIST, B.; JOHANSEN, D.; FERRARI, P.; JENAB, M.; SLIMANI, N.; WARD, H.; RIBOLI, E.; NORAT, T.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B. Meat and Fish Consumption and Risk of Pancreatic Cancer: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **International journal of cancer**, v. 132, n. 3, p. 617–624, fev. 2013.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-Mediated Drug Resistance: Novel Insights on the Functional Interaction of HIFs and Cell Death Pathways. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 14, n. 3, p. 191–201, jun. 2011.

ROHWER, N.; DAME, C.; HAUGSTETTER, A.; WIEDENMANN, B.; DETJEN, K.; SCHMITT, C. A.; CRAMER, T. Hypoxia-Inducible Factor 1alpha Determines Gastric Cancer Chemosensitivity via Modulation of P53 and NF-KappaB. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12038, ago. 2010.

ROSENFELDT, M. T.; RYAN, K. M. The Multiple Roles of Autophagy in Cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 955–963, jul. 2011.

ROTHENBERG, M. L.; MOORE, M. J.; CRIPPS, M. C.; ANDERSEN, J. S.; PORTENOY, R. K.; BURRIS, H. A. 3rd; GREEN, M. R.; TARASSOFF, P. G.; BROWN, T. D.; CASPER, E. S.; STORNILO, A. M.; VON HOFF, D. D. A Phase II Trial of Gemcitabine in Patients with 5-FU-Refractory Pancreas Cancer. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 7, n. 4, p. 347–353, abr. 1996.

ROUSCHOP, K. M. A.; WOUTERS, B. G. Regulation of Autophagy through Multiple Independent Hypoxic Signaling Pathways. **Current molecular medicine**, v. 9, n. 4, p. 417–424, maio 2009.

ROUSSEAU, A.; BERTOLOTTI, A. An Evolutionarily Conserved Pathway Controls Proteasome Homeostasis. **Nature**, v. 536, n. 7615, p. 184–189, ago. 2016.

ROZPEDEK, W.; PYTEL, D.; DZIKI, L.; NOWAK, A.; DZIKI, A.; DIEHL, J. A.; MAJSTEREK, I. Inhibition of PERK-Dependent pro-Adaptive Signaling Pathway as a Promising Approach for Cancer Treatment. **Polski przegląd chirurgiczny**, v. 89, n. 3, p. 7–10, jun. 2017.

SABATINI, D. M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; LUI, M.; TEMPST, P.; SNYDER, S. H. RAFT1: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs. **Cell**, v. 78, n. 1, p. 35–43, jul. 1994.

SABERS, C. J.; MARTIN, M. M.; BRUNN, G. J.; WILLIAMS, J. M.; DUMONT, F. J.; WIEDERRECHT, G.; ABRAHAM, R. T. Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 2, p. 815–822, jan. 1995.

SAH, R. P.; NAGPAL, S. J. S.; MUKHOPADHYAY, D.; CHARI, S. T. New insights into pancreatic cancer-induced paraneoplastic diabetes. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 7, p. 423–433, 26 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932322/>>.

SALATINO, M.; CROCI, D. O.; BIANCO, G. A.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 1, p. 45–57, 2008.

SANJUAN, X.; FERNANDEZ, P. L.; CASTELLS, A.; CASTRONOVO, V.; VAN DEN BRULE, F.; LIU, F. T.; CARDESA, A.; CAMPO, E. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1906–1915, 1997.

SAWAI, H.; YAMAMOTO, M.; OKADA, Y.; SATO, M.; AKAMO, Y.; TAKEYAMA, H.; MANABE, T. Alteration of Integrins by Interleukin-1alpha in Human Pancreatic Cancer Cells. **Pancreas**, v. 23, n. 4, p. 399–405, nov. 2001.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 169, n. 2, p. 361–371, abr. 2017.

SCHAFFERT, C.; POUR, P. M.; CHANEY, W. G. Localization of Galectin-3 in Normal and Diseased Pancreatic Tissue. **International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology**, v. 23, n. 1, p. 1–9, fev. 1998.

SCHITO, L.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. **Trends in cancer**, v. 2, n. 12, p. 758–770, dez. 2016.

SCHNEIDER, R.; SLATER, E. P.; SINA, M.; HABBE, N.; FENDRICH, V.; MATTHAI, E.; LANGER, P.; BARTSCH, D. K. German National Case Collection for Familial Pancreatic Cancer (FaPaCa): Ten Years Experience. **Familial cancer**, v. 10, n. 2, p. 323–330, jun. 2011.

SCHOEPPNER, H. L.; RAZ, A.; HO, S. B.; BRESALIER, R. S. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. **Cancer**, v. 75, n. 12, p. 2818–2826, 1995.

SEMENZA, G. L. Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Pulmonary Pathophysiology. **Chest**, v. 128, n. 6 Suppl, p. 592S–594S, dez. 2005.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors: Mediators of Cancer Progression and Targets for Cancer Therapy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 33, n. 4, p. 207–214, abr. 2012.
SHEN, Y.; WHITE, E. P53-Dependent Apoptosis Pathways. **Advances in cancer research**, v. 82, p. 55–84, 2001.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, jan. 2018.

SILVA-FILHO, A. F.; SENA, W. L. B.; LIMA, L. R. A.; CARVALHO, L. V. N.; PEREIRA, M. C.; SANTOS, L. G. S.; SANTOS, R. V. C.; TAVARES, L. B.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M. Glycobiology Modifications in Intratumoral Hypoxia: The Breathless Side of Glycans Interaction. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 1801–1829, abr. 2017.

SIMONE, G.; MALARA, N.; TRUNZO, V.; RENNE, M.; PEROZZIELLO, G.; DI FABRIZIO, E.; MANZ, A. Galectin-3 coats the membrane of breast cells and makes a signature of tumours. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 2, p. 258–265, 2014.

SMITH, J. P.; NADELLA, S.; OSBORNE, N. Gastrin and Gastric Cancer. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 4, n. 1, p. 75–83, jul. 2017.

SONG, L.; TANG, J.; OWUSU, L.; SUN, M.-Z.; WU, J.; ZHANG, J. Galectin-3 in cancer. **Clinica chimica acta**, v. 431, p. 185–191, 2014.

SONG, S.; JI, B.; RAMACHANDRAN, V.; WANG, H.; HAFLEY, M.; LOGSDON, C.; BRESALIER, R. S. Overexpressed Galectin-3 in Pancreatic Cancer Induces Cell Proliferation and Invasion by Binding Ras and Activating Ras Signaling. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42699,

2012.

STEVENS, R. J.; RODDAM, A. W.; BERAL, V. Pancreatic Cancer in Type 1 and Young-Onset Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis. **British journal of cancer**, v. 96, n. 3, p. 507–509, fev. 2007.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; CROSS, A. J.; SILVERMAN, D. T.; SCHAIRER, C.; THOMPSON, F. E.; KIPNIS, V.; SUBAR, A. F.; HOLLENBECK, A.; SCHATZKIN, A.; SINHA, R. Meat and Meat-Mutagen Intake and Pancreatic Cancer Risk in the NIH-AARP Cohort. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 12, p. 2664–2675, dez. 2007.

STROUS, G. J.; DEKKER, J. Mucin-type glycoproteins. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 27, n. 1–2, p. 57–92, 1992.

SU, Y.-C.; DAVULURI, G. V. N.; CHEN, C.-H.; SHIAU, D.-C.; CHEN, C.-C.; CHEN, C.-L.; LIN, Y.-S.; CHANG, C.-P. Galectin-1-Induced Autophagy Facilitates Cisplatin Resistance of Hepatocellular Carcinoma. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148408, 2016.

SUKER, M.; BEUMER, B. R.; SADOT, E.; MARTHEY, L.; FARIS, J. E.; MELLON, E. A.; EL-RAYES, B. F.; WANG-GILLAM, A.; LACY, J.; HOSEIN, P. J.; MOORCRAFT, S. Y.; CONROY, T.; HOHLA, F.; ALLEN, P.; TAIEB, J.; HONG, T. S.; SHRIDHAR, R.; CHAU, I.; VAN EIJCK, C. H.; KOERKAMP, B. G. FOLFIRINOX for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Patient-Level Meta-Analysis. **The Lancet. Oncology**, v. 17, n. 6, p. 801–810, jun. 2016.

SUZUKI, A. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) under hypoxic and nutrient-deprived conditions. [**Hokkaido igaku zasshi**] **The Hokkaido journal of medical science**, v. 77, n. 4, p. 351, 2002.

TAKAHASHI, Y.; COPPOLA, D.; MATSUSHITA, N.; CUALING, H. D.; SUN, M.; SATO, Y.; LIANG, C.; JUNG, J. U.; CHENG, J. Q.; MULE, J. J.; PLEDGER, W. J.; WANG, H.-G. Bif-1 Interacts with Beclin 1 through UVRAG and Regulates Autophagy and Tumorigenesis. **Nature cell biology**, v. 9, n. 10, p. 1142–1151, out. 2007.

TAKAMURA, A.; KOMATSU, M.; HARA, T.; SAKAMOTO, A.; KISHI, C.; WAGURI, S.; EISHI, Y.; HINO, O.; TANAKA, K.; MIZUSHIMA, N. Autophagy-Deficient Mice Develop Multiple Liver Tumors. **Genes & development**, v. 25, n. 8, p. 795–800, abr. 2011.

TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate journal**, v. 19, n. 7–9, p. 543–549, 2002.

TALAIEZADEH, A.; JALALI, F.; GALEHDARI, H.; KHODADADI, A. Time Depended Bcl-2 Inhibition Might Be Useful for a Targeted Drug Therapy. **Cancer cell international**, v. 15, p. 105, 2015.

TANG, D.; YUAN, Z.; XUE, X.; LU, Z.; ZHANG, Y.; WANG, H.; CHEN, M.; AN, Y.; WEI, J.; ZHU, Y.; MIAO, Y.; JIANG, K. High Expression of Galectin-1 in Pancreatic Stellate Cells Plays a Role in the Development and Maintenance of an Immunosuppressive

Microenvironment in Pancreatic Cancer. **International journal of cancer**, v. 130, n. 10, p. 2337–2348, maio 2012.

TANG, D.; ZHANG, J.; YUAN, Z.; ZHANG, H.; CHONG, Y.; HUANG, Y.; WANG, J.; XIONG, Q.; WANG, S.; WU, Q.; TIAN, Y.; LU, Y.; GE, X.; SHEN, W.; WANG, D. PSC-Derived Galectin-1 Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells by Activating the NF-KappaB Pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 86488–86502, out. 2017.

TEAGUE, A.; LIM, K.-H.; WANG-GILLAM, A. Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 68–84, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346211/>>.

TERRIS, B.; BLAVERI, E.; CRNOGORAC-JURCEVIC, T.; JONES, M.; MISSIAGLIA, E.; RUSZNIEWSKI, P.; SAUVANET, A.; LEMOINE, N. R. Characterization of Gene Expression Profiles in Intraductal Papillary-Mucinous Tumors of the Pancreas. **The American journal of pathology**, v. 160, n. 5, p. 1745–1754, maio 2002.

TEWARI, M. Significance of Pathological Positive Superior Mesenteric/Portal Venous Invasion in Pancreatic Cancer. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT**, v. 15, n. 6, p. 572–578, dez. 2016.

THIJSEN, V. L.; BARKAN, B.; SHOJI, H.; ARIES, I. M.; MATHIEU, V.; DELTOUR, L.; HACKENG, T. M.; KISS, R.; KLOOG, Y.; POIRIER, F. Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. **Cancer research**, v. 70, n. 15, p. 6216–6224, 2010.

THOMLINSON, R. H.; GRAY, L. H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. **British journal of cancer**, v. 9, n. 4, p. 539, 1955.

TIAN, H.; CALLAHAN, C. A.; DUPREE, K. J.; DARBONNE, W. C.; AHN, C. P.; SCALES, S. J.; DE SAUVAGE, F. J. Hedgehog Signaling Is Restricted to the Stromal Compartment during Pancreatic Carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4254–4259, mar. 2009.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TOTON, E.; LISIAK, N.; SAWICKA, P.; RYBCZYNSKA, M. Beclin-1 and Its Role as a Target for Anticancer Therapy. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 65, n. 4, p. 459–467, ago. 2014.

TRIAANTAFYLLOU, A.; FLETCHER, D.; SCOTT, J. Glycosylations in demilunar and central acinar cells of the submandibular salivary gland of ferret investigated by lectin histochemistry. **Archives of oral biology**, v. 49, n. 9, p. 697–703, 2004.

VAN DEN BRÛLE, F.; CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V. Expression of galectins in cancer: a critical review. **Glycoconjugate journal**, v. 19, n. 7, p. 537–542, 2002.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97–130, 1993.

VAS, V.; FAJKA-BOJA, R.; ION, G.; DUDICS, V.; MONOSTORI, É.; UHER, F. Biphasic Effect of Recombinant Galectin-1 on the Growth and Death of Early Hematopoietic Cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 2, p. 279–287, 2005.

VASAGIRI, N.; KUTALA, V. K. Structure, Function, and Epigenetic Regulation of BNIP3: A Pathophysiological Relevance. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 11, p. 7705–7714, nov. 2014.

VLADOIU, M. C.; LABRIE, M.; ST-PIERRE, Y. Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy. **International journal of oncology**, v. 44, n. 4, p. 1001–1014, 2014.

VON HOFF, D. D.; ERVIN, T.; ARENA, F. P.; CHIOREAN, E. G.; INFANTE, J.; MOORE, M.; SEAY, T.; TJULANDIN, S. A.; MA, W. W.; SALEH, M. N. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1691–1703, 2013.

WANEBO, H. J.; GLICKSMAN, A. S.; VEZERIDIS, M. P.; CLARK, J.; TIBBETTS, L.; KONESS, R. J.; LEVY, A. Preoperative Chemotherapy, Radiotherapy, and Surgical Resection of Locally Advanced Pancreatic Cancer. **Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)**, v. 135, n. 1, p. 81–7; discussion 88, jan. 2000.

WANG, Y.; HU, G.-F.; ZHANG, Q.-Q.; TANG, N.; GUO, J.; LIU, L.-Y.; HAN, X.; WANG, X.; WANG, Z.-H. Efficacy and Safety of Gemcitabine plus Erlotinib for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 1961–1972, 2016.

WEHR, A. Y.; FURTH, E. E.; SANGAR, V.; BLAIR, I. A.; YU, K. H. Analysis of the Human Pancreatic Stellate Cell Secreted Proteome. **Pancreas**, v. 40, n. 4, p. 557–566, maio 2011.

WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, problems, and perspectives. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 7, p. 679–696, 2013.

WU, H.; HUANG, S.; CHEN, Z.; LIU, W.; ZHOU, X.; ZHANG, D. Hypoxia-Induced Autophagy Contributes to the Invasion of Salivary Adenoid Cystic Carcinoma through the HIF-1 α /BNIP3 Signaling Pathway. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 5, p. 6467–6474, nov. 2015.

XIE, X.; KOH, J. Y.; PRICE, S.; WHITE, E.; MEHNERT, J. M. Atg7 Overcomes Senescence and Promotes Growth of BrafV600E-Driven Melanoma. **Cancer discovery**, v. 5, n. 4, p. 410–423, abr. 2015.

XIN, M.; DONG, X.-W.; GUO, X.-L. Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 69, p. 179–185, 2015.

XU, Y.; GU, X.; GONG, M.; GUO, G.; HAN, K.; AN, R. Galectin-3 inhibition sensitizes human renal cell carcinoma cells to arsenic trioxide treatment. **Cancer biology & therapy**, v. 14, n. 10, p. 897–906, 2013.

XUE, X.; LU, Z.; TANG, D.; YAO, J.; AN, Y.; WU, J.; LI, Q.; GAO, W.; XU, Z.; QIAN, Z. Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Pancreas**, v. 40, n. 6, p. 832–839, 2011.

YAMAGUCHI, J.; YOKOYAMA, Y.; KOKURYO, T.; EBATA, T.; NAGINO, M. Cells of Origin of Pancreatic Neoplasms. **Surgery today**, mar. 2017.

YANG, L.; LIN, P. C. Mechanisms That Drive Inflammatory Tumor Microenvironment, Tumor Heterogeneity, and Metastatic Progression. **Seminars in cancer biology**, ago. 2017.
 YANG, S.; WANG, X.; CONTINO, G.; LIESA, M.; SAHIN, E.; YING, H.; BAUSE, A.; LI, Y.; STOMMEL, J. M.; DELL'ANTONIO, G.; MAUTNER, J.; TONON, G.; HAIGIS, M.; SHIRIHAI, O. S.; DOGLIONI, C.; BARDEESY, N.; KIMMELMAN, A. C. Pancreatic Cancers Require Autophagy for Tumor Growth. **Genes & development**, v. 25, n. 7, p. 717–729, abr. 2011.

YANG, X.; LIU, S.; YAN, Q. Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. **Cell death & disease**, v. 4, n. 7, p. e735, 2013.

YAO, Y.; ZHOU, L.; LIAO, W.; CHEN, H.; DU, Z.; SHAO, C.; WANG, P.; DING, K. HH1-1, a Novel Galectin-3 Inhibitor, Exerts Anti-Pancreatic Cancer Activity by Blocking Galectin-3/EGFR/AKT/FOXO3 Signaling Pathway. **Carbohydrate polymers**, v. 204, p. 111–123, jan. 2019.

YAUCH, R. L.; SETTLEMAN, J. Recent Advances in Pathway-Targeted Cancer Drug Therapies Emerging from Cancer Genome Analysis. **Current opinion in genetics & development**, v. 22, n. 1, p. 45–49, fev. 2012.

YE, L.-Y.; ZHANG, Q.; BAI, X.-L.; PANKAJ, P.; HU, Q.-D.; LIANG, T.-B. Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression and Its Clinical Significance in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. **Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]**, v. 14, n. 5, p. 391–397, 2014.

YOUNG, A. R. J.; NARITA, M.; FERREIRA, M.; KIRSCHNER, K.; SADAIE, M.; DAROT, J. F. J.; TAVARE, S.; ARAKAWA, S.; SHIMIZU, S.; WATT, F. M.; NARITA, M. Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 798–803, abr. 2009.

YUE, Z.; JIN, S.; YANG, C.; LEVINE, A. J.; HEINTZ, N. Beclin 1, an Autophagy Gene Essential for Early Embryonic Development, Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15077–15082, dez. 2003.

ZENG, Y.; DANIELSON, K. G.; ALBERT, T. J.; SHAPIRO, I. M.; RISBUD, M. V. HIF-1 α

Is a Regulator of Galectin-3 Expression in the Intervertebral Disc. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1851–1861, 2007.

ZHANG, H.; BOSCH-MARCE, M.; SHIMODA, L. A.; TAN, Y. S.; BAEK, J. H.; WESLEY, J. B.; GONZALEZ, F. J.; SEMENZA, G. L. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-Dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 16, p. 10892–10903, abr. 2008.

ZHANG, H.; WANG, Z.; STUPAK, J.; GHRIBI, O.; GEIGER, J. D.; LIU, Q. Y.; LI, J. Targeted glycomics by selected reaction monitoring for highly sensitive glycan compositional analysis. **Proteomics**, v. 12, n. 15–16, p. 2510–2522, 2012.

ZHANG, J.; LIANG, Y.; LIN, Y.; LIU, Y.; YOUYOU; YIN, W. IRE1alpha-TRAF2-ASK1 Pathway Is Involved in CSTMP-Induced Apoptosis and ER Stress in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 82, p. 281–289, ago. 2016.

ZHANG, L.; WANG, P.; QIN, Y.; CONG, Q.; SHAO, C.; DU, Z.; NI, X.; LI, P.; DING, K. RN1, a Novel Galectin-3 Inhibitor, Inhibits Pancreatic Cancer Cell Growth in Vitro and in Vivo via Blocking Galectin-3 Associated Signaling Pathways. **Oncogene**, v. 36, n. 9, p. 1297–1308, mar. 2017.

ZHAO, J.; ZHAI, B.; GYGI, S. P.; GOLDBERG, A. L. MTOR Inhibition Activates Overall Protein Degradation by the Ubiquitin Proteasome System as Well as by Autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 52, p. 15790–15797, dez. 2015.

ZHAO, Q.; GUO, X.; NASH, G. B.; STONE, P. C.; HILKENS, J.; RHODES, J. M.; YU, L.-G. Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 6799–6806, 2009.

ZHAO, X.-Y.; CHEN, T.-T.; XIA, L.; GUO, M.; XU, Y.; YUE, F.; JIANG, Y.; CHEN, G.-Q.; ZHAO, K.-W. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 8, p. 1367–1375, 2010.

ZHONG, L.; WEI, K.; YANG, X.; PAN, H.; YE, D.; WANG, L.; ZHANG, Z. Overexpression of Galectin-1 is negatively correlated with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 136, n. 10, p. 1527–1535, 2010.