



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA**

EVELYN EMYLI BARROS ROSA

**ANÁLISE DO SECRETOMA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO SILENCIADAS PARA GALECTINA-3**

Rio de Janeiro
2025

EVELYN EMYLI BARROS ROSA

ANÁLISE DO SECRETOMA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO
SILENCIADAS PARA GALECTINA-3

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Medicina ao
Programa de Pós-graduação em Anatomia
Patológica, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Orientadoras: Márcia Cury El-Cheikh;
Coorientadora: Denise de Abreu Pereira.

Laboratório de Proliferação e Diferenciação
Celular (LPDC/UFRJ).

Rio de Janeiro, RJ
Junho, 2025

EVELYN EMYLI BARROS ROSA

ANÁLISE DO SECRETOMA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO
SILENCIADAS PARA GALECTINA-3

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Medicina ao
Programa de Pós-graduação em Anatomia
Patológica, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

APROVADA POR:

Dr^a Verônica Aran Ponte — **Banca** —
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Heitor Affonso de Paula Neto — **Banca** —
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr^a Márcia Cury El-Cheikh — **Orientadora** — **Banca** —
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ
Junho, 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

R93a Rosa, Evelyn Emyli Barros
 Análise do Secretoma das Células de Carcinoma
 Mamário Silenciadas Para Galectina-3 / Evelyn Emyli
 Barros Rosa. -- Rio de Janeiro, 2025.
 68 f.

 Orientadora: Márcia Cury El-Cheikh.
 Coorientadora: Denise de Abreu Pereira.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
 Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de
 Pós-Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2025.

 1. câncer de mama. 2. Galectina-3. 3. metástase.
 4. secretoma. 5. biologia tumoral. I. El-Cheikh,
 Márcia Cury, orient. II. Pereira, Denise de Abreu,
 coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Márcia El-Cheikh e Denise Pereira pela orientação ao longo da pesquisa. Também expresso minha gratidão ao professor Renato Carvalho, Ana Clara Ribeiro e Ana Luiza Sant'Anna pela colaboração. Registro meu sincero agradecimento aos colegas Fernanda Ribeiro e Matthias Guillo por todo o suporte prestado. Expresso meu reconhecimento à CAPES pela concessão da bolsa e à FAPERJ pelo financiamento essencial ao desenvolvimento deste trabalho. Por fim, um agradecimento especial aos meus pais pelo suporte incondicional, cuja dedicação e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

ANÁLISE DO SECRETOMA DAS CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO SILENCIADAS PARA GALECTINA-3

Autora: Evelyn Emyli Barros Rosa

Orientadoras: Márcia Cury El-Cheikh;
Coorientadora: Denise de Abreu Pereira.

O câncer de mama apresenta alta incidência entre mulheres e permanece como um dos principais desafios da saúde pública em todo o mundo. A Galectina-3, uma lectina multifuncional com afinidade por β -galactosídeos, atua em tumores mamários devido à sua capacidade de promover interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o impacto do silenciamento da Galectina-3 em células de carcinoma mamário 4T1, avaliando seu secretoma em comparação ao controle. Os resultados indicam que o silenciamento promoveu aumento da migração celular e alterações em moléculas de adesão como no versican, sugerindo papel modulador na biologia tumoral. As proteínas com abundância reduzida na linhagem silenciada apresentaram associação ao metabolismo de hexoses e glicose, com forte interação com Eno1, AldoA, AldoC e GAPDH, enzimas-chave da glicólise e gliconeogênese. No entanto, proteínas como MMP3, MMP10, THBS1 e DAG-1 mostraram maior abundância, indicando uma possível implicação na remodelação da matriz extracelular e potencial influência na metástase. Os achados demonstram, pela primeira vez, que o silenciamento de Galectina-3 altera significativamente o secretoma de células 4T1, favorecendo características metastáticas, como evidenciado por ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Palavras-chave: câncer de mama; Galectina-3; metástase; secretoma; biologia tumoral.

ABSTRACT

ANALYSIS OF SECRETOME OF GALECTIN-3 SILENCED BREAST CARCINOMA CELLS

Author: Evelyn Emyli Barros Rosa

Supervisor: Márcia Cury El-Cheikh;
Co-supervisor: Denise de Abreu Pereira.

Breast cancer has a high incidence among women and remains one of the major global public health challenges. Galectin-3, a multifunctional lectin with affinity for β -galactosides, plays a role in breast tumors due to its ability to mediate cell–cell and cell–extracellular matrix interactions. Therefore, this study aimed to investigate the impact of Galectin-3 silencing in 4T1 murine breast carcinoma cells by analyzing their secretome in comparison to control cells. The results indicate that Galectin-3 silencing led to increased cell migration and changes in adhesion molecules such as versican, suggesting a modulatory role in tumor biology. Proteins with reduced expression in the silenced lineage were associated with hexose and glucose metabolism, showing strong interactions with Eno1, AldoA, AldoC, and GAPDH, which are key enzymes in glycolysis and gluconeogenesis. In contrast, proteins such as MMP3, MMP10, THBS1, and DAG-1 were upregulated, indicating potential involvement in extracellular matrix remodeling and metastatic progression. These findings demonstrate, for the first time, that Galectin-3 silencing significantly alters the secretome of 4T1 cells, promoting metastatic features, as evidenced by both *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: breast cancer; Galectin-3; metastasis; secretome; tumor biology.

LISTA DE SIGLAS

4T1 shRNA-Gal-3: 4T1 silenciada para Gal-3

4T1 shRNA-SCRB: 4T1 *scramble* (4T1 controle)

AP-1: *Activator Protein-1* (Proteína Ativadora-1)

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

C-term: Domínio C-terminal

cDNA: *complementary DNA* (DNA complementar)

DRC: Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

EGF: *epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

GAGs: Glicosaminoglicanos

Gal-3: Galectina-3

HER2: receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LPDC: Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular

MEC: matriz extracelular

mRNA: *messenger RNA* (RNA mensageiro)

MMP9: metaloproteinase 9

MMTV: *Mouse Mammary Tumor Virus* (Vírus do Tumor Mamário de Camundongo)

PGs: Proteoglicanos

RT-qPCR: *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

(Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa)

RE: Receptores de estrogênio

RIPA: *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer* (Tampão de Ensaio de Radioimunoprecipitação)

RP: Receptor de progesterona

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

SFB: Soro fetal bovino

shRNA: *short hair pin* (RNA de grampo curto)

SP-1: *Specificity Protein-1* (Proteína de Especificidade-1)

TN: Triplo negativo

WT: *Wild Type* (animal selvagem)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da Gal-3 e ligantes e mecanismos de inibição. Pág.: 15.

Figura 2: Função da Gal-3. Pág.: 16.

Figura 3: Análise por RT-qPCR da expressão de RNA mensageiro para Gal-3. Pág.: 30.

Figura 4: Análise de Immunoblotting e Gel de poliacrilamida com coloração de Coomassie Brilliant Blue G-250. Pág.: 30.

Figura 5: Morfologia das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3. Pág.: 31.

Figura 6: Imunofluorescência das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3. Pág.: 32.

Figura 7: Quantificação da imunofluorescência das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3. Pág.: 32.

Figura 8: Volcano Plot mostrando as proteínas com diferenças de abundância significativa no secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 33.

Figura 9: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String mostrando os 10 processos biológicos mais enriquecidos com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída ou aumentada em 4T1 shRNA- Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 36.

Figura 10: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String mostrando as 10 funções moleculares mais enriquecidas com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída ou aumentada em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 37.

Figura 11: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String mostrando as 10 vias de sinalização do Reactome mais enriquecidas com as proteínas secretadas

que apresentaram abundância diminuída ou aumentada em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 37.

Figura 12: Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente diminuída no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 39.

Figura 13: Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente aumentadas no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Pág.: 39.

Figura 14: Heatmap (programa Morpheus) das principais proteínas com diferença de abundância significativa classificadas nos processos de metabolismo de carboidratos (diminuída) e nos processos de reorganização da MEC (aumentadas). Pág.: 40.

Figura 15: Representação de interações e do papel regulatório da Gal-3 em diversas vias de sinalização. Pág.: 47.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Sequência de primers utilizados - RT-qPCR. Pág.: 24.

Quadro 2: Proteínas que possuem abundância significativamente aumentada em 4T1 shRNA-Gal-3. Pág.: 34.

Quadro 3: Proteínas que apresentaram abundância significativamente diminuída em 4T1 shRNA-Gal-3. Pág.: 35.

Quadro 4: Principais proteínas com diferença de abundância significativa. Pág.: 40.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer de mama	15
1.2 O papel da Gal-3 no microambiente tumoral: implicações na metástase	17
1.3 O câncer de mama e a Gal-3	18
1.4 Gal-3 e seu papel na biologia tumoral	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 Células 4T1 Wild Type (WT)	25
4.2 Células 4T1 shRNA-Gal-3 (Lgals3)	25
4.3 Clonagem por diluição limitante	26
4.4 A expressão do gene Lgals3 nas linhagens transduzidas foi verificada usando a técnica de RT-qPCR	26
4.5 Avaliação dos níveis proteicos de Gal-3 por immunoblotting	27
4.6 Obtenção do sobrenadante das células em cultura	28
4.7 Gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue G-250	29
4.8 Imunofluorescência para Gal-3	29
4.9 Hidrólise de proteínas	30
4.10 Análise proteômica	31
4.11 Análises <i>in silico</i> e estatística	32
5. RESULTADOS	32
5.1 Análise da regulação negativa da Gal-3 nas células 4T1	32
5.2 Microscopia das células 4T1 reguladas negativamente para Gal-3	33
5.3 Análise das proteínas identificadas e quantificadas pelo estudo proteômico do secretoma das linhagens celulares 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3	35
5.4 Análise de Gene Ontology realizada com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativa entre o secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB	39
5.5 Análise da rede de interações proteína-proteína no secretoma da linhagem 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB	41
5.6 Análise de heatmap feita com proteínas que apresentaram diferenças de abundância no secretoma das células 4T1 reguladas negativamente para Gal-3	42
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS	49
9. APÊNDICE	58

APÊNDICE A – Artigo submetido à publicação.....	58
APÊNDICE B – Quadro 2.....	58
APÊNDICE C – Quadro 3.....	60
APÊNDICE D – Figura 9.....	65
APÊNDICE E – Figura 10.....	66
APÊNDICE F – Figura 11.....	67
APÊNDICE G – Figura 12.....	68
APÊNDICE H – Figura 13.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

As neoplasias malignas continuam sendo um grande desafio para a ciência, incluindo o câncer de mama, que apresenta a maior taxa de incidência na população feminina, constituindo assim um problema de saúde pública no Brasil. Para cada ano do triênio de 2023-2025 estima-se cerca de 704 mil novos casos segundo a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022).

Cerca de 80% dos cânceres de mama se originam do epitélio de revestimento ductal, ou seja, são tumores malignos epiteliais que recebem a nomenclatura de adenocarcinoma mamário ductal (Caplan, 2014; Zafra-Ceres e cols., 2013). A sua caracterização ou classificação é baseada nos receptores de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e índice de proliferação celular Ki67 (Russnes e cols., 2017; Vilardell e cols., 2012). A expressão diferencial destes marcadores definem os subtipos dos carcinomas mamários ductais em: Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER2 e triplo negativo (TN) (Voduc e cols., 2010).

O tipo Luminal A tem origem em células epiteliais do ducto-lobular e é caracterizado pela presença de RE, de RP, e ausência de HER2. Apresentam baixo índice de proliferação, isto é, $<14\%$, são altamente sensíveis à hormonioterapia e correspondem de 30 a 40% dos casos. O tipo Luminal B tem a mesma origem celular que o Luminal A, sendo que os RE estão em concentrações mais estáveis que o receptor de RP, que podem estar presentes tanto em alta quanto em baixa concentração. A superexpressão de HER2, porém, pode ser detectada em até 20% dos casos de câncer de mama e, possui um alto índice de proliferação, tendo um $Ki-67 > 14\%$. O fato de alguns pacientes apresentarem o HER2 os torna elegíveis ao uso do anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumab) além de serem sensíveis à hormonioterapia. Este tumor corresponde de 20 a 30% dos casos de carcinoma mamário (Prat e Perou, 2011).

Com a superexpressão de HER2 o prognóstico é ruim, porém o uso combinado

de trastuzumabe e pertuzumabe com a quimioterapia podem apresentar um prognóstico mais favorável. Estes tumores são em geral RE negativos, o que não favorece o prognóstico (Carey, 2010). O câncer de mama definido como TN é caracterizado pela ausência dos RE, RP e de superexpressão de HER2 no câncer de mama e representa um subtipo heterogêneo e de pior prognóstico, com sobrevida geral mais curta e, representa de 15% a 20% de todos os casos (Collignon e cols., 2016; Russnes e cols., 2017).

A diversidade dos fenótipos das células de carcinoma mamário bem como sua evolução nos dá a dimensão de sua complexidade, que envolve controles hormonais bem como expressão de proto-oncogenes, (Russnes e cols., 2017). As células tumorais não são, portanto, entidades autônomas *per se*, sendo controladas local e sistemicamente. Embora o avanço das terapias alvo tenham elevado a sobrevida dos pacientes, o carcinomas mamários TN ainda apresentam alta morbidade e mortalidade devido às metástases ósseas, de pulmão e cerebrais (Deepak e cols., 2020). Portanto, cada vez mais se faz necessário a compreensão do microambiente tumoral e sua relação com as células malignas, buscando destrinchar as assinaturas moleculares entre as duas entidades histológicas.

Desta forma, o nicho ou o microambiente tumoral é uma estrutura indispensável para a iniciação e progressão tumoral, induzindo a proliferação, angiogênese, supressão da apoptose e escape do sistema imunológico (Deepak e cols., 2020). As células presentes neste milieu irão adquirir imortalidade, isto é, alto índice proliferativo, que associada a neovascularização, se tornam propensas à invasão local e à distância. Esta estrutura complexa da matriz extracelular (MEC) formada de vasos, células do sistema imunológico e células, no qual resulta em um ambiente imunossupressor e dificulta as imunoterapias, atuando como barreira para o câncer e apoiando a progressão tumoral, o que leva ao desfecho metastático (Yuan e cols., 2023).

1.2 O papel da Gal-3 no microambiente tumoral: implicações na metástase

O microambiente tumoral, por ser uma estrutura celular e molecular heterogênea e complexa, ao induzir a rápida proliferação das células tumorais promove uma hipóxia. A hipóxia *per se* leva a reprogramação das células tumorais tornando-as mais susceptíveis à metástase através da transição epitélio/mesênquima, geração de células tronco tumorais e predispondo a angiogênese (Yu, T e cols., 2017).

A metástase se inicia quando as células do tumor primário perdem a expressão de moléculas responsáveis por ligações homotípicas e/ou heterotípicas bem como a ligação entre elas e a MEC que formam parte do estroma tumoral. O escape das células do tumor primário e sua migração para sítios distantes envolve principalmente a sua capacidade em modular negativamente algumas moléculas adesivas e, uma vez dentro dos vasos, elas passam a modular positivamente moléculas pró-adesivas para garantirem sua retenção dentro da microcirculação, extravasamento e estabelecimento em órgãos e tecidos distantes, estabelecendo novos nichos ou microambientes tumorais (Nangia-Makker e cols., 2008; Oliveira e cols., 2010; Cardoso e cols., 2016).

É bem documentado que a interação do tumor com o seu microambiente é crucial para a sua progressão. Os glicosaminoglicanos (Gags) e os proteoglicanos (PG), bem como o colágeno e lamininas podem agir como uma barreira física ao crescimento tumoral (Tamimi e Ahmed, 1987). Os Gags e os PGs são moléculas cruciais na progressão do tumor, regulando a adesão e a migração das mesmas (Viola e cols., 2017). Dentre estas moléculas ressaltamos o sindecan e o versican como moléculas que aumentam a adesão e a invasão dos tumores primários, sendo considerados marcadores de valor prognóstico (Hassan e cols., 2013). É importante ressaltar que as ligações célula-célula e célula-MEC são mediadas em grande parte por proteínas com capacidade de se ligar a carboidratos, e dentre elas destacamos a Galectina-3 (Gal-3). A sua interação com componentes glicosilados como os Gags no microambiente tumoral, pode formar *scaffolds* tanto físicos como funcionais com papel relevante para a biologia tumoral (Newlaczył e Yu,

2011). A interação da Gal-3 é mais efetiva quando os Gags são menos sulfatados.

1.3 O câncer de mama e a Gal-3

A Gal-3 é uma proteína que pertence à família das lectinas com afinidade a açúcares (Nangia-Makker e cols., 2018), que são caracterizadas pela capacidade de se ligarem a carboidratos. Os monômeros de Gal-3 são formados por dois domínios distintos funcionalmente: um domínio N-terminal (resíduos 1-137) e um domínio C-terminal (C-term) (resíduos 118-264). O domínio N-terminal não se liga a carboidratos e, é essencial para sua atividade anti apoptótica bem como sua interação proteína-proteína. Devido ao seu longo domínio, os monômeros de Gal-3 se auto agregam formando estruturas em treliças ou *lattices*, fundamentais para sua atividade biológica (Sasaki e cols., 1998). O domínio C-term forma uma estrutura globular e acomoda o sítio de reconhecimento a carboidratos (Barondes e cols., 1994; Fukumori e cols., 2007) (Figura 1).

Esta proteína é codificada por um único gene (*Lgals3*), formado por 5 introns e 6 exons, localizados no cromossomo 14, locus q21–q22, tendo a proteína peso molecular de aproximadamente 31 kDa (Raimond e cols., 1997; Dong e cols., 2018; Niang e cols., 2022).

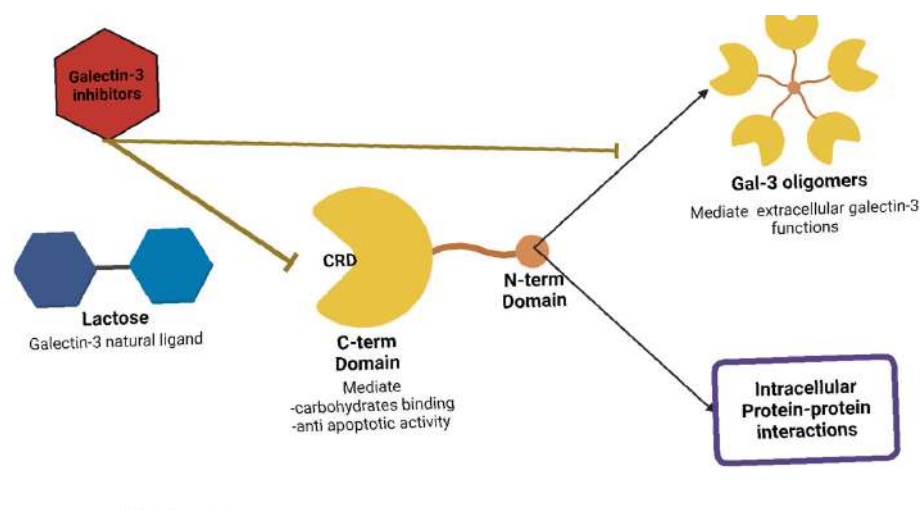


Figura 1: Estrutura da Gal-3 e ligantes e mecanismos de inibição. A lactose é o ligante padrão da

Gal-3 e se liga através do seu domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) do C-term e induz a sua oligomerização. O domínio N-terminal faz o *cross-link* dos monômeros de Gal-3 formando oligômeros responsáveis por parte da função da Gal-3 extracelular (Adaptado de Niang e cols., 2022).

Sua localização é predominantemente citoplasmática, mas pode ser translocada ao núcleo, à superfície celular ou ser secretada para o meio extracelular, corroborando com a ideia de uma ação pleiotrópica desta molécula (Figura 2). O papel da Gal-3 no meio intracelular está relacionado a interação com sequências anti-apoptóticas, presente nos linfomas de células B proteínas inibindo a apoptose celular, sendo portanto considerada uma molécula genuinamente anti-apoptótica, podendo desta forma controlar o ciclo celular (Akahani e cols., 1997; Yu e cols., 2002). Ainda a Gal-3 intracelular é identificada como fator envolvido no *splicing* de RNA mensageiro (Dagher e cols., 1995; Dong e cols., 2018) podendo também interagir com fatores transcricionais como *Activator Protein-1* (Proteína Ativadora-1) (AP-1) e *Specificity Protein-1* (Proteína de Especificidade-1) (SP-1) em sítios promotores de versican aumentando a sua expressão (Bhattacharyya e Tobacman, 2012).

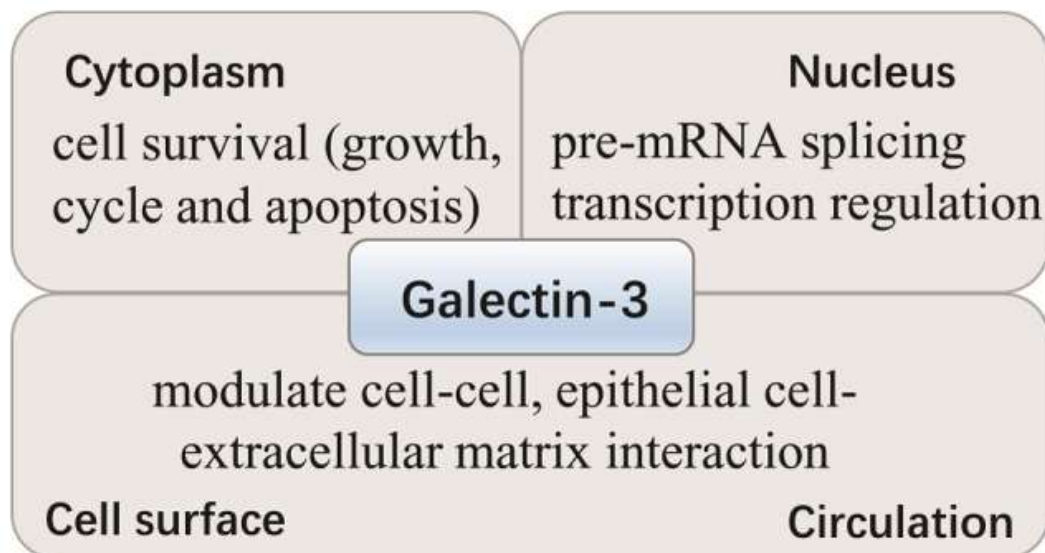


Figura 2: Função da Gal-3. Função em diferentes locais, incluindo citoplasma, núcleo, superfície celular e circulação (Adaptado de Dong e cols., 2018).

No meio extracelular é bem documentado que ela se liga aos açúcares presentes em componentes da MEC, laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV (membrana basal), como demonstrado em tumores de mama (Ochieng e cols., 1998). Tanto a Gal-3 ligada à proteínas da MEC bem como sua forma clivada pelas metaloproteinases estão envolvidas na progressão do tumor (Nangia-Makker, 2008). A perda de sítios de ligação da Gal-3 com MEC em paralelo com o aumento de sua expressão no tumor primário, são eventos cruciais para o estabelecimento de metástases (Zhao e cols., 2010; Oliveira e cols., 2010). Na célula tumoral 4T1 silenciada para Gal-3 (4T1 shRNA-Gal-3), a ausência dessa proteína no meio extracelular influenciou a progressão e a metástase, segundo Pereira e cols., 2016. Este trabalho mostrou a importância da Gal-3 como molécula de ligação entre a membrana celular e o meio extracelular, organizando a estrutura tecidual. A Gal-3 é expressa em uma variedade de tumores e sua intensidade bem como sua localização vão ditar a progressão, invasibilidade e potencial metastático do tumor, tornando esta lectina um marcador importante na biologia dos tumores (Niang e cols., 2022).

1.4 Gal-3 e seu papel na biologia tumoral

O papel da Gal-3 nas células tumorais é bastante controverso estando aumentada em hepatocarcinomas (Hsu e cols., 1999), no câncer da tireoide (Xu e cols., 1995). Por outro lado, a Gal-3 possui sua expressão diminuída em alguns tumores de mama e pele (Califice e cols., 2004; Takenaka e cols., 2004). Tal fato reforça o caráter controverso da Gal-3 frente aos diversos tipos de tumores. A Gal-3 é também produzida por células inflamatórias peri-tumorais bem como por células do estroma, indicando que o comportamento do tumor pode ser influenciado também pelo hospedeiro (Nangia-Makker e cols., 2008). Assim, a Gal-3 vem sendo descrita como um importante marcador de prognóstico em vários tumores, podendo ter um papel relevante na tumorigênese, capacidade invasiva e metastática. Além de interagir com os seus ligantes, os β -galactosídeos, se associa a mucinas expressas em células tumorais aumentando a adesão e

evitando o “anoikis”, que é a morte por ausência de substratos (Radosavljevic e cols., 2012).

A Gal-3 regula a migração e invasão tumoral facilitando o *clustering* das integrinas na superfície celular, mediando assim a endocitose das mesmas ou ativando-as diretamente (Liu e Rabinovich, 2005), tendo desta forma papel como moduladora da progressão tumoral. Nas células de carcinoma mamário humano MDA-MB-231 a Gal-3 e Beta-1 integrina são endocitadas via *caveolae*, modulando assim a disponibilidade desta integrina para adesão tumoral (Ilmer e cols., 2016).

A Gal-3 também está envolvida na transição epitélio mesênquima, que confere um fenótipo invasivo aos carcinomas (Ilmer e cols., 2016). É sabido que a E-caderina, que promove a adesão entre as células epiteliais, se conecta com a MEC e, intracelularmente com a actina do citoesqueleto, tendo como parceira a β -catenina, formando assim o complexo E-caderina/ β -catenina. Faz parte deste complexo a Gal-3 que se liga à β -catenina, estabilizando desta forma a E-caderina e o fenótipo epitelial. A translocação do complexo para o núcleo se liga a família de fatores de transcrição TCF/LEF que tem como genes alvo o C-myc, ciclina D1/D2, metaloproteinases 7, levando assim a progressão do tumor regulando positivamente a N-caderina negativamente a E-caderina (Shimura e cols., 2004; Li e cols., 2011). É postulado que a Gal-3 inibe a ação da glicogênio sintase quinase-3b (GSK-3b) inibindo a fosforilação da β -catenina e permitindo a sua translocação nuclear. Por tanto, a distribuição do complexo Gal-3/ β -catenina nas células tumorais pode indicar o seu potencial metastático (Ilmer e cols., 2016).

É importante ressaltar ainda, que a Gal-3 é capaz de interagir com as mucinas, que são definidas como glicoproteínas com alto conteúdo de oligossacarídeos, reforçando o seu papel no comportamento biológico das células tumorais. A expressão das mucinas aumenta expressivamente nos carcinomas epiteliais, estando associada aos tumores de pior prognóstico (Zhao e cols., 2009). É preconizado que a Gal-3 circulante pode induzir polarização da mucina, expondo as moléculas de adesão e facilitando a agregação das células no sítio primário do

tumor. A baixa expressão da Gal-3 pode favorecer a endocitose das mucinas e perda de moléculas de adesão levando a desagregação celular. Por outro lado, o aumento da Gal-3 coexpressa nas células tumorais com as mucinas, facilita o *cluster* das mesmas e a aderência das células tumorais ao endotélio vascular facilitando o processo metastático (Boscher e cols., 2012; Ilmer e cols., 2016). Os dados descritos acima reforçam o papel da Gal-3 aderida a superfície celular modulando a expressão de moléculas de adesão e oligossacarídeos e sua reação com o microambiente tumoral.

Entretanto, o papel intracelular da Gal-3 como molécula envolvida na migração de células tumorais foi demonstrado por Park e col., 2015 usando a estratégia de silenciamento da Gal-3 nas células de osteossarcoma. Este evento diminuiu a capacidade migratória e invasiva destas células, reduzindo a expressão de β -catenina e alterando as vias de FAK, Src e Lyn. O silenciamento da Gal-3 nas linhagens celulares de carcinoma hepatocelular, pancreático e sarcoma também reduziu a capacidade migratória e de invasibilidade destas linhagens, envolvendo β -catenina, phospho-Akt, GSK-3 β , e metaloproteases (Kobayashi e cols., 2011; Melo e cols., 2011). O silenciamento da Gal-3 nas células tumorais de cólon diminui a atividade transcricional de AP-1 e Sp-1 (Bhattacharyya e cols., 2014). Estes dados validaram a ação canônica da Gal-3 nos diversos tumores, reforçando o seu papel em várias funções celulares (Bhattacharyya e cols., 2014).

Em estudos *in vitro* e *in vivo* onde foram utilizadas células da linhagem de carcinoma mamário murino 4T1 shRNA-Gal-3, nós observamos que a expressão da Gal-3 foi reduzida, resultando na formação de tumores menores na injeção ortotópica, com aumento da capacidade metastática para a medula óssea, evidenciando seu papel na progressão tumoral. Nas células silenciadas o conteúdo de sindecan na superfície celular diminuiu, e os níveis de condroitim sulfato aumentaram, indicando claramente que a Gal-3 na célula tumoral regula sua progressão e interação com os GAGs do microambiente tumoral (Pereira e cols., 2019).

Diante do complexo papel da Gal-3 sobre o comportamento biológico dos

tumores, em especial nas células do carcinoma mamário 4T1, buscamos avaliar o padrão de secreção das proteínas e sua correlação com os eventos biológicos. A análise do secretoma de clones de células 4T1 com diferentes potenciais metastáticos foi realizada pelo grupo de Erin e cols., 2018. Os resultados mostraram que a metástase para diferentes órgãos como pulmão, fígado e coração possuem padrão diferencial de proteínas secretadas, sendo o TGF- β 1 a proteína master em todos os clones metastáticos. Entretanto, não temos dados na literatura demonstrando o perfil de proteínas secretadas pelas células 4T1 shRNA-Gal-3 com potencial metastático para a medula óssea.

2. JUSTIFICATIVA

Em nosso trabalho anterior, nós demonstramos que o silenciamento da Gal-3 nas células 4T1 modificou o comportamento das mesmas tornando-as mais metastáticas para a medula óssea. O aumento do seu potencial metastático foi associado a diminuição dos GAGs nas células e da sindecan-1 membranar e, um aumento do sulfato de condroitin (A e C) versican, e metaloproteinase 9 (MMP9). Estes dados demonstram que a metástase está intrinsecamente associada ao remodelamento da MEC modulada pela Gal-3 intracelular facilitando assim a migração celular. A diminuição da expressão da Gal-3 na célula tumoral envolve modulação positiva e negativa de moléculas facilitadoras da migração celular. Devido à complexidade das vias envolvidas e sua putativa interação com outras proteínas, nós buscamos investigar o perfil das moléculas secretadas pelas células silenciadas para Gal-3 *in vitro*. Esta metodologia nos permitirá avaliar não só o padrão de proteínas secretas mas também a interatividade entre elas e seu possível papel na biologia da célula tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito do silenciamento da Gal-3 sobre as proteínas do secretoma

das células 4T1.

3.2. Objetivos específicos

1. Efetuar e validar o silenciamento da Gal-3 na linhagem 4T1 gerando células 4T1 controle (*scramble*) (4T1 shRNA-SCRB) e 4T1 shRNA-Gal-3;
2. Obtenção dos clones a partir das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 através da diluição limitante;
3. Expandir os clones gerados, 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3, para validação do silenciamento pelas técnicas de *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa) (RT-qPCR), *immunoblotting* e Imunofluorescência;
4. Expandir os clones para obtenção dos secretomas;
5. Concentrar os secretomas obtidos, quantificar as proteínas totais e hidrolisar as proteínas para análise proteômica;
6. Identificar e quantificar as proteínas presentes nos secretomas das linhagens celulares;
7. Analisar as proteínas identificadas e quantificadas utilizando ferramentas de bioinformática;
8. Identificar as proteínas com diferenças de abundância significativas entre as duas linhagens, analisar as diferenças encontradas nos processos biológicos, funções moleculares e vias de sinalização causadas pelo silenciamento da Gal-3 na linhagem celular 4T1.

4. METODOLOGIA

4.1 Células 4T1 Wild Type (WT)

A linhagem celular 4T1, isolada de carcinoma ductal mamário de camundongas fêmeas Balb/c, foi obtida e certificadas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (Xerém - RJ) e mantidas no Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular (LPDC) no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), em meio RPMI 1640 em 10 % de Soro fetal bovino (SFB) (lote: 6494-500, Cultilab, Brasil) incubadas a 37 °C e 5 % CO₂. Esta linhagem celular foi originalmente derivada de um tumor mamário induzido espontaneamente em fêmeas Balb/c positivas para o vírus *Mouse Mammary Tumor Virus* (Vírus do Tumor Mamário de Camundongo) (MMTV) (Aslakson e Miller, 1992). Estas células são facilmente transplantadas na glândula mamária de camundongas fêmeas, uma vez que possuem baixa imunogenicidade. São células altamente tumorigênicas, invasivas e com grande capacidade metastática para pulmão, fígado e medula óssea (Pulaski B e cols., 2001; Pereira e cols., 2016). Além destas características, elas não expressam receptores para: RE, PR e fator de crescimento epidérmico (EGF), o que lhes confere o fenótipo TN e o protagonismo de melhor modelo experimental para o estudo do câncer de mama (Kaur e cols., 2012).

4.2 Células 4T1 shRNA-Gal-3 (Lgals3)

Foram desenvolvidas linhagens celulares 4T1 shRNA-Gal-3, as células 4T1 com supressão de expressão de *Lgals3* e as linhagens celulares 4T1 shRNA-SCRB, respectivo controle do silenciamento. Para isso, partículas lentivirais foram geradas em células HEK293T utilizando o kit Virapower (Invitrogen, USA). Os vírus produzidos foram transferidos para as células 4T1 após atingirem a confluência de área entre 70-80 %, mantidas em cultura por 24 horas. As construções plasmidiais utilizadas foram: a-pLKO1 shGAL3 (Open Biosystems, USA), que contém a sequência codificante para RNA do tipo *short hairpin* (shRNA) contra os transcritos de *Lgals3* foram geradas e nomeadas

“shRNA-Gal-3”; b-pLKO1 shSCRB (Open Biosystems, USA), contendo a sequência codificante para shRNA contra sequência não relacionada como controle negativo e nomeadas “shRNA-SCRB”. Em seguida, o meio foi trocado por meio fresco contendo 5 e 10 µg/ml de puromicina (Invitrogen, USA). As culturas foram mantidas sob pressão seletiva, com reposição periódica do meio de cultura RPMI-1640, até que toda a população de células controle não-transduzidas fosse eliminada. Após este procedimento as células foram avaliadas quanto a presença de mycoplasma pela marcação do DAPI, garantido a sua qualidade para os próximos experimentos.

4.3 Clonagem por diluição limitante

As linhagens transfectadas ou transduzidas foram expandidas, tripsinizadas (Sigma-Aldrich, USA) e ajustadas para 300 células em volume final de 120 mL de meio. Dessa suspensão, 50 µL foram distribuídos em 1 placa de 96 poços e incubadas a 37 °C e 5 % CO₂ foram selecionados os poços contendo 1 célula por poço, obtendo assim possíveis clones. Os poços contendo uma células foram acompanhados até a expansão dos mesmos. Foram obtidos 4 clones de células silenciadas para Gal-3 (shRNA-Gal-3) e 1 clone (shRNA-SCRB). Estes clones foram expandidos até a confluência de 50 % e avaliados quanto ao silenciamento da Gal-3 por RT-qPCR e *immunoblotting*.

4.4 A expressão do gene Lgals3 nas linhagens transduzidas foi verificada usando a técnica de RT-qPCR

O *messenger RNA* (RNA mensageiro) (mRNA) foi isolado das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 e utilizando o GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). O *complementary DNA* (DNA complementar) (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg do RNA total utilizando o RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (K1622, Thermo Fisher Scientific, Lithuania). As análises da RT-qPCR foram realizadas em triplicata (o experimento foi realizado duas vezes) utilizando o SYBR Green PCR Master Mix (Thermo

Fisher Scientific, Lithuania). A quantificação relativa foi feita utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak, 2001) normalizando para a expressão do gene GAPDH utilizado. O *primers* utilizados estão localizados no quadro abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Forward 5' - 3'</i>	<i>Reverse 5' - 3'</i>
Mm <i>Lgals3</i> RT	CAACAGGAGAGTCATTGTGTGTAA	TTCAACCAGGACTTGTATTTTGAAT
Mm GAPDH RT	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

Quadro 1: Sequência de *primers* utilizados - RT-qPCR

4.5 Avaliação dos níveis proteicos de Gal-3 por immunoblotting

A partir da confluência das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 em frascos de cultivo de 25 cm², foi realizada a extração de proteínas em solução *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer* (Tampão de Ensaio de Radioimunoprecipitação) (RIPA) (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x-100 1 %, Desoxicolato de sódio 1 %, SDS 0,1 %, Tris HCL 25 mM, H₂O destilada) e coquetel bloqueador de protease Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100 X) (Thermo Fisher Scientific, USA). As amostras foram incubadas por 30 minutos em banho de gelo e foram agitadas três vezes com incubação em banho de gelo por 5 minutos entre elas. Por último, as amostras foram recolhidas por centrifugação a 12,000 RPM por 20 minutos a 4 °C. As amostras foram armazenadas a -20 °C. A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio colorimétrico pelo kit Padrão de Albumina-Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B, (Thermo Fisher Scientific, USA), sendo lido em espectrofotômetro (Loccus, Brasil) em comprimento de onda de 560 nm.

Após a quantificação dos extratos proteicos, a Eletroforese em gel *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) (SDS-PAGE) foi realizada. Foram preparados 30 µg de proteína total com 10 µL de tampão de amostra (2x Laemmli Sample Buffer #1610737, Bio-Rad) com β-mercaptoetanol, e aquecidas a 95 °C

por 5 minutos antes da aplicação no gel para a eletroforese. As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de SDS-PAGE 10 % com 1,5 mm de espessura, na cuba de eletroforese (MINI protean tetra cell [Biorad, USA]) com tampão de corrida (Biorad ®) 1:10 em água Milli-Q. Após as aplicações das amostras, as mesmas foram submetidas à corrente elétrica de 80 V durante o gel de empilhamento e 120 V durante o gel de separação. Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose.

A transferência das proteínas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose foi realizada com o tampão de transferência (10 % Biorad ®, 20 % Metanol e 70 % de água Milli-Q) submetidos à corrente elétrica de 90 V por 1 hora e 30 minutos em câmara úmida. Após a transferência a membrana foi corada com *Ponceau*, lavada com água destilada e incubada com a solução de bloqueio (BSA 5 %, TBS-T 0,1 %) por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com solução de TBS-T 0,1 % contendo os anticorpo primário para Gal-3 produzido em *mouse* (Galectin-3; monoclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:500 e Alfa Tubulina (Sigma, USA) 1:1000 e mantida sob agitação *overnight* em câmara fria. No dia seguinte, o anticorpo primário foi retirado por meio de quatro lavagens sucessivas com T-TBS 0,1 %, por 5 minutos para cada lavagem e, em seguida, a membrana foi incubada com solução de TBS-T 0,1 % contendo os anticorpos secundários: Anti-Mouse IgG (H+L), HRP Conjugate (Promega, USA) 1:20,000. Depois de quatro lavagens com T-TBS 0,1 %, a membrana foi revelada com o kit ECL (Biorad ®, USA) e as imagens adquiridas pelo equipamento ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, USA), em conjunto com o *software* Imagelab 5.1 (Bio-Rad, USA).

4.6 Obtenção do sobrenadante das células em cultura

As linhagens shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3, foram cultivadas em meio RPMI 1640 a 10 % de SFB até atingirem a confluência, em garrafas de 25 cm², 75 cm² e 150 cm². Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1 X e NaCl 2 M e cultivadas em meio de RPMI-1640 sem vermelho de fenol e sem SFB, incubadas

a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 horas. Em seguida, o meio condicionado foi concentrado em tubos AMICON 3 KDa (UFC900324, Millipore) e realizada a centrifugação a 3,000 g durante 60 minutos, e foi realizada a adição do inibidor de protease (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail - Thermo Fisher Scientific, USA). Em seguida, as proteínas secretadas foram quantificadas com o Padrão de Albumina - Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B - (Thermo Fisher Scientific, USA) e congeladas a -20 °C.

4.7 Gel de poliacrilamida corado com Coomassie Brilliant Blue G-250

Foi realizado um gel de poliacrilamida 10 % com a coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250 para verificar a qualidade das proteínas obtidas a partir dos concentrados do meio condicionado e também dos extratos em RIPA para o *immunoblotting*. Após a corrida, o gel foi incubado em um recipiente com a Solução de Revelação Fixadora (30 % etanol e 2 %), Ácido Fosfórico 2 % e Solução de Revelação (Ácido Fosfórico 2 %, Etanol 18 %, Sulfato de Amônio 15 %), cada solução por 1 hora. Após a incubação das soluções, foi adicionado Coomassie Brilliant Blue G-250, e incubado por 72 horas e o gel foi descorado com água destilada para a revelação.

4.8 Imunofluorescência para Gal-3

As linhagens 4T1 shRNA-Gal-3 e shRNA-SCRB foram cultivadas em lâminas de vidro (Lab-Tek® II Chamber Slide™ System) até atingirem a confluência. Em seguida foram lavadas 2 vezes em PBS e fixadas em uma solução de PBS contendo 4 % de formaldeído (Sigma-Aldrich, USA) e 3 % de sacarose (Proquímios, Brasil) por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas por 1 vez em PBS 1 X e desidratadas em etanol 100 % (Proquímios, Brasil) por 5 minutos a 4 graus. Após lavagem com PBS as células foram tratadas com uma solução de PBS contendo 0,25 % de Triton X-100 por 10 minutos a temperatura ambiente (TA), para permeabilização da membrana. O bloqueio das ligações não específicas foi realizado com uma solução de PBS

contendo 5 % da albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) em agitação por 30 minutos. Após a lavagem, o anticorpo primário anti-Gal3, uma IgG monoclonal, (Santa Cruz, USA) na diluição 1/200 em uma solução de PBS a 1 % de BSA, foi adicionado às células por 1 hora, sob agitação. Após lavagem com PBS, o anticorpo secundário (anti-rabbit CFL 555) na diluição 1:250 em PBS a 1 % de BSA, foi adicionado às células por 1 hora sob agitação à TA e protegido da luz. Em seguida foi adicionado o dapi na concentração de 300 mM por 5 minutos. As lâminas foram montadas usando o Prolong Gold e visualizadas por microscopia confocal. A quantificação foi realizada pelo programa IMAGE J (FIJI), pelo número de células (93 para células 4T1 shRNA-SCRB e 72 para células 4T1 shRNA-Gal-3) dividido pela quantificação dos pixels, que representam a intensidade da fluorescência dividida.

4.9 Hidrólise de proteínas

A partir do secretoma concentrado das linhagens celulares 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3, 200 µg de proteínas totais foram obtidas e foram ressuspensas em bicarbonato de amônio 50 mM contendo Rapigest SF (Waters, n° cat. 186001861) na concentração de 0,1 %. As amostras foram incubadas a 80 °C em termobloco durante 15 minutos. Após centrifugação para baixar as gotículas da tampa, foi adicionado 10 µL de ditioneitol a 100 mM, as amostras foram agitadas em vortex e incubadas em termobloco a 60 °C durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para baixar as gotículas da tampa, e foram adicionados 10 µL de iodoacetamida a 300 mM. As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 20 µL da solução de tripsina (Promega, V5111) na concentração de 0,1 µg/µL em NH₄HCO₃ (Essa é uma relação 1:100 wt:wt enzima:proteína). As reações foram incubadas em termobloco a 37 °C com agitação durante 20 horas. No dia seguinte, após a digestão enzimática, a reação foi paralisada pela adição de 10 µL de TFA a 20 % e incubada a 37 °C durante 90 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm a 6 °C durante 30 minutos. O sobrenadante, foi coletado e seco em centrífuga a vácuo. E encaminhado para a análise proteômica.

4.10 Análise proteômica

As análises dos peptídeos tripticos foram feitas por label free LC-MS em um espectrômetro de massas do tipo SYNAPT XS™ (Waters, USA). Cada uma das condições foi analisada em triplicata experimental, os volumes de injeção foram normalizados para garantir equivalência de intensidade, e os peptídeos separados por cromatografia líquida com configuração 1D utilizando a coluna HSS T3, (75 µm x 150 mm x 1.8 µm) (Waters, Milford, MA) em eluição a 0,3 µl/min, com gradiente linear de acetonitrila (3–40 %) contendo 0,1 % de ácido fórmico. Os espectros de massa foram obtidos utilizando o espectrômetro Synapt XS (Waters, Milford, MA) com interface para o sistema de cromatografia capilar M-class. A ionização por eletrospray (ESI) foi realizada utilizando 3000 V, com temperatura da fonte de 80 °C e voltagem de cone 40 V. A aquisição dos dados e controle do instrumento foi conduzida no programa MassLynx (Versão 4.1, Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 50-2000 razão massa/carga (m/z), usando intervalos de 1 segundo aplicados durante todo o processo cromatográfico. Espectros de massa de alta e baixa energia foram adquiridos de forma alternada, gerando dados independentes de aquisição (DIA) do tipo MS^E. A energia de colisão nas aquisições de baixa energia foram feitas em 6 V, e a aquisição em alta energia foi feita em uma rampa de 15 – 55 V. Todos os dados foram processados usando o servidor Progenesis QI for proteomics (Nonlinear Dynamics, Waters, Manchester, UK) onde o valor da massa/carga de cada precursor e fragmento foi determinada a partir dos espectros de massas oriundos desses cromatogramas, utilizando para calibração o sistema GFP LockSpray™ (Waters, Milford, MA). Os espectros foram submetidos a uma busca no banco de dados *Mus musculus* do Uniprot KB (2025_02) incluindo tripsina de porco como contaminante. Foi adotada uma tolerância de 10 ppm e 20 ppm para os precursores e fragmentos, respectivamente. A quantificação das proteínas foi realizada a partir da abundância normalizada dos peptídeos não conflitantes das proteínas, sendo consideradas confiáveis aquelas cujas expressão apresentou p-valor de ANOVA menor que 0.05.

4.11 Análises *in silico* e estatística

As análises de Gene Ontology e da rede de interação entre as proteínas, foram feitas na plataforma STRING (<https://string-db.org/>). As análises de *heatmap* foram feitas com o programa Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). As análises estatísticas para identificar as proteínas com diferenças de abundância significativas foram realizadas com o programa Perseus versão 1.6.2.2 (<https://maxquant.net/perseus/>).

5. RESULTADOS

5.1 Análise da regulação negativa da Gal-3 nas células 4T1

Após a clonagem por diluição limitante nós obtivemos quatro clones da célula 4T1 shRNA-Gal-3 (shGal3 c1; shGal3 c2; shGal3 c3; shGal3 c4) e um clone da célula 4T1 shRNA-SCRB (shSCRB). Ao avaliar a expressão do RNA mensageiro para a Gal-3, somente os clones 1 e 3 apresentaram eficácia no silenciamento da ordem de 80 % e 90 % respectivamente (Figura 3A). Entretanto, nos clones 2 e 4 não ocorreu a diminuição da expressão do RNA mensageiro para Gal-3 (Figura 3B), indicando que após a clonagem é necessário checar se o silenciamento foi eficaz. Em seguida, avaliamos nos clones shGal3 c1 e shGal3 c3 se a diminuição da expressão do RNA mensageiro estava compatível com a síntese da proteína.

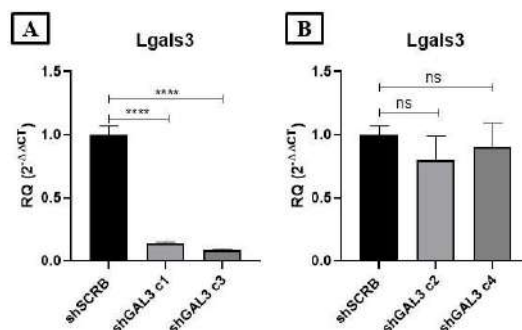


Figura 3: Análise por RT-qPCR da expressão de RNA mensageiro para Gal-3. **(A)** Células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 (clone 1 e clone 3) e células **(B)** 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 (clone 2 e clone 4).

Em seguida, fizemos por *immunoblotting* a detecção da Gal-3 nas células 4T1 shRNA-SCRB (SC) e 4T1 shRNA-Gal-3 (Sh1; Sh3). É possível observar a intensidade da banda de proteína quantificada na Figura 4A e 4B, sendo que o clone 1 apresentou mais de 70 % de diminuição da proteína em relação ao controle, sendo o clone com maior nível de silenciamento. A partir destes dados, o clone 1 foi o clone utilizado nos próximos experimentos. Após a obtenção do secretoma, foi realizado o gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10 % com a coloração por Coomassie Brilliant Blue G-250, para verificar a qualidade das proteínas obtidas a partir do secretoma e do extrato das células feito em Tampão RIPA das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-GAL-3 (Figura 4C).

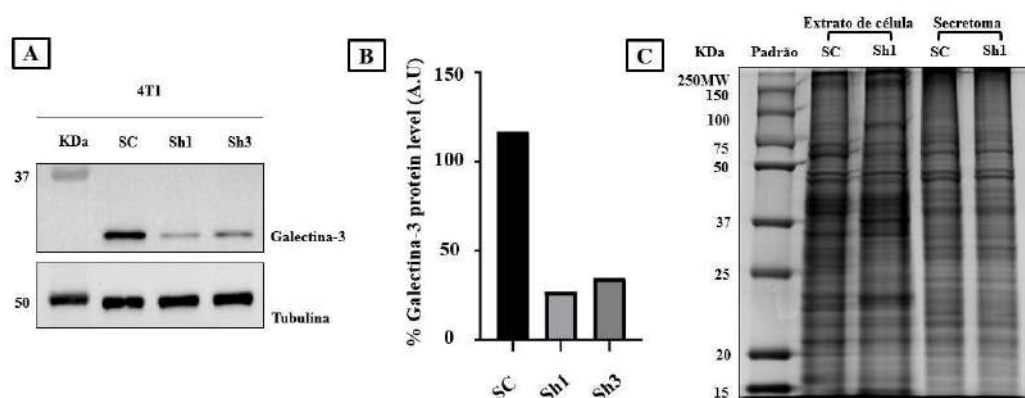


Figura 4: Análise de *Immunoblotting* e Gel de poliacrilamida com coloração de Coomassie Brilliant Blue G-250. Análise de *immunoblotting* das células 4T1 shRNA-SCRB (SC) e 4T1 shRNA-Gal-3 (Sh1 - clone 1 e Sh3 - clone 3) **(A,B)**. Gel de poliacrilamida com coloração de Coomassie Brilliant Blue G-250, do secretoma e do extrato de células para o *immunoblotting* (N=2), das células 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-GAL-3 **(C)**.

5.2 Microscopia das células 4T1 reguladas negativamente para Gal-3

Após a transfecção, a morfologia das células em cultura apresentaram diferenças ao microscópio de fase. As células 4T1 shRNA-Gal-3 se apresentaram mais coesas formando nichos de células aderidas umas às outras (Figura 5B, cabeça de seta), o que não foi observado nas células 4T1 shRNA-SCRB (Figura

5A, cabeça de seta), que cresceram mais espraçadas, indicando que o silenciamento alterou o fenótipo das células.

Em relação a imunofluorescência, é possível observar a marcação (Figura 6A; 6B; 6C) e a quantificação ($p=0.0021$) (Figura 7A) para Gal-3 presente nas células, validando o silenciamento.

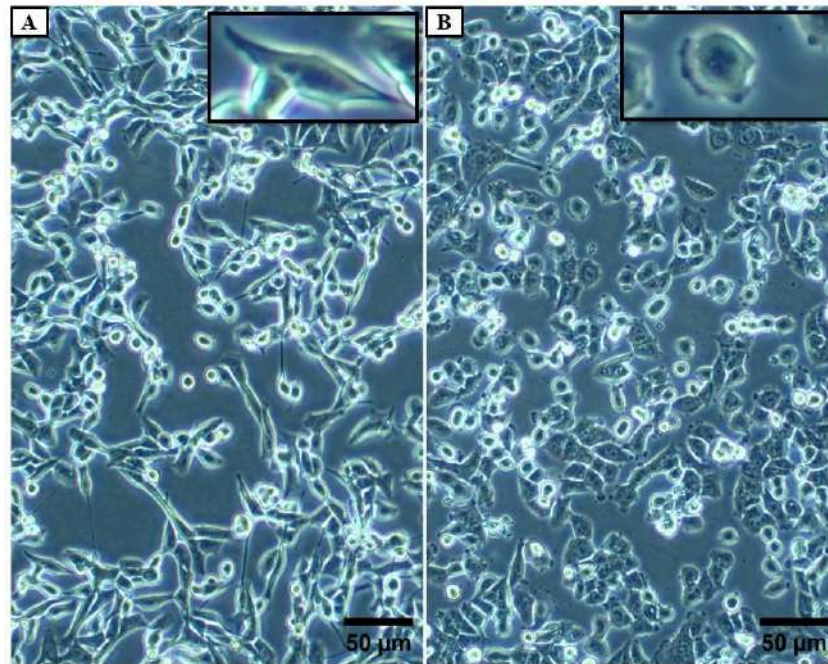


Figura 5: Morfologia das células 4T1 shRNA-SCRB (A) e 4T1 shRNA-Gal-3 (B) observadas ao microscópio invertido, após a confluência.

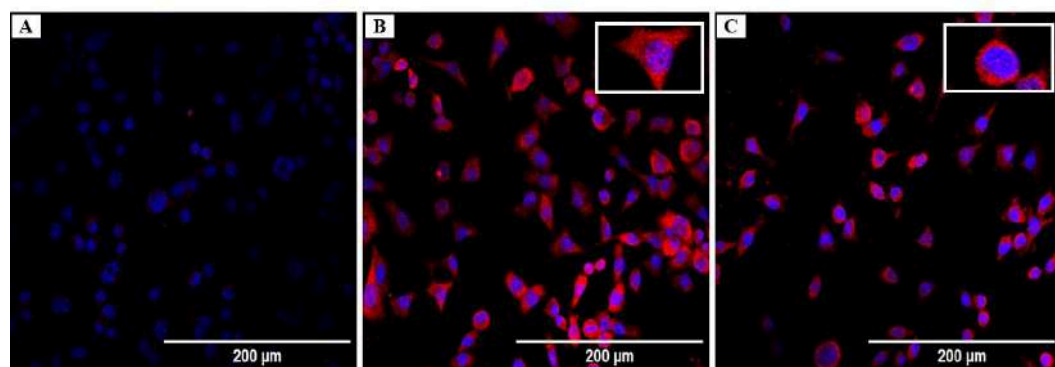


Figura 6: Detecção por imunofluorescência de Gal-3 nas células 4T1 shRNA-SCRB (B), nas células 4T1 shRNA-Gal-3 (C) em (A) controle negativo da reação.

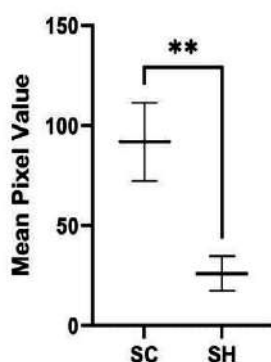


Figura 7: Quantificação da expressão de Gal-3 por imunofluorescência nas células 4T1 shRNA-SCRB e nas células 4T1 shRNA-Gal-3.

5.3 Análise das proteínas identificadas e quantificadas pelo estudo proteômico do secretoma das linhagens celulares 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3

Um total de 342 proteínas comuns aos dois grupos estudados 4T1 shRNA-SCRB e 4T1 shRNA-Gal-3 foram identificadas e quantificadas pela análise proteômica. Com o intuito de identificar dentre essas proteínas quais apresentavam diferença de abundância significativa entre a linhagem 4T1 shRNA-Gal-3 e a linhagem 4T1 shRNA-SCRB, foi feita uma análise estatística no programa Perseus para a construção do volcano plot. A figura 8, mostra o resultado obtido no qual cada círculo representa uma proteína. Os círculos em vermelho representam as proteínas que possuem abundância significativamente aumentada com ($p\text{-valor} < 0.05$ e $\text{Fold Change} > 1,4$) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB (Quadro 2 em anexo) e os círculos em azul representam as proteínas que apresentaram abundância significativamente diminuída em 4T1 shRNA-Gal-3 ($p\text{-valor} < 0.05$ e $\text{Fold Change} < 0,71$) em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB (Quadro 3 em anexo).

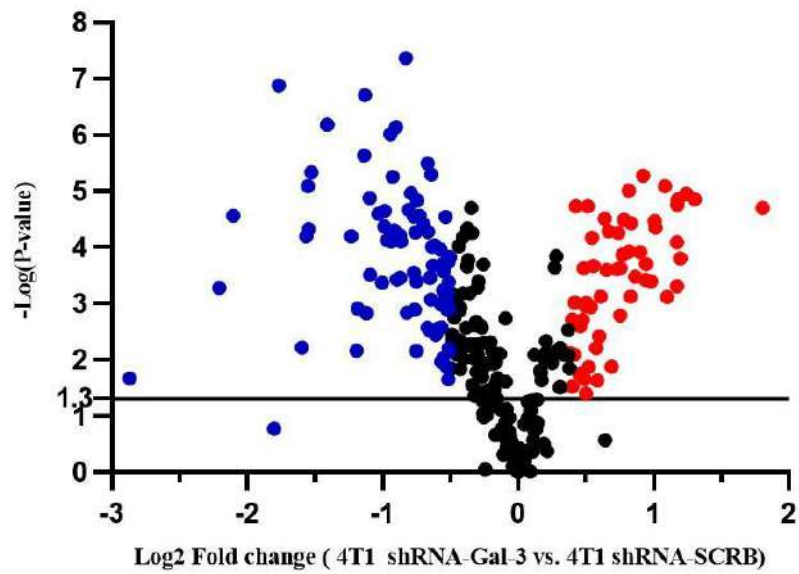


Figura 8: Volcano Plot mostrando as proteínas com diferenças de abundância significativa no secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB. Os círculos vermelhos representam as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente aumentada e os círculos azuis representam as proteínas que apresentaram a abundância significativamente diminuída em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

Accession	Gene Name	Description	Fold Change	p-value
Q9ER10	Prss22	Brain-specific serine protease 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prss22 PE=2 SV=2	3.501	1.99E-05
Q06890	Clu	Clusterin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clu PE=1 SV=1	2.470	1.40E-05
P11268	env	Envelope glycoprotein OS=Radiation murine leukemia virus OX=11787 GN=env PE=3 SV=2	2.368	1.12E-05
P31794	env	Envelope glycoprotein OS=Radiation murine leukemia virus (strain Kaplan) OX=31689 GN=env PE=1 SV=1	2.368	1.12E-05
P35441	Thbs1	Thrombospondin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thbs1 PE=1 SV=1	2.295	1.57E-04
Q9EPL2	Clstn1	Calysntenin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clstn1 PE=1 SV=1	2.262	1.42E-05
Q61581	Igfbp7	Insulin-like growth factor-binding protein 7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Igfbp7 PE=1 SV=3	2.260	1.75E-05
P06797	Ctsl	Procathepsin L OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsl PE=1 SV=2	2.258	8.19E-05
P01887	B2m	Beta-2-microglobulin OS=Mus musculus OX=10090 GN=B2m PE=1 SV=2	2.255	4.88E-04
P49935	Ctsh	Pro-cathepsin H OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsh PE=1 SV=2	2.146	7.62E-04
P03386	env	Envelope glycoprotein OS=AKV murine leukemia virus OX=11791 GN=env PE=1 SV=1	2.122	8.16E-06
Q61207	Psap	Prosaposin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psap PE=1 SV=2	2.019	4.45E-05
Q00493	Cpe	Carboxypeptidase E OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cpe PE=1 SV=2	2.013	3.41E-05
Q62165	Dag1	Dystroglycan 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dag1 PE=1 SV=4	1.974	3.99E-04
P24369	Ppiib	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppiib PE=1 SV=2	1.926	1.97E-04
O55123	Mmp10	Stromelysin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp10 PE=2 SV=1	1.918	3.75E-04
P98063	Bmp1	Bone morphogenetic protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bmp1 PE=1 SV=2	1.899	5.30E-06
P25785	Timp2	Metalloproteinase inhibitor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Timp2 PE=1 SV=2	1.866	1.22E-04
Q9R118	Htra1	Serine protease HTRA1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Htra1 PE=1 SV=2	1.822	3.34E-04
P08553	Nefm	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nefm PE=1 SV=4	1.783	3.73E-05
Q9WVJ3	Cpq	Carboxypeptidase Q OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cpq PE=1 SV=1	1.780	7.57E-04
Q60668	Hnrnpd	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnpd PE=1 SV=2	1.766	1.17E-04
Q06335	Aplp2	Amyloid beta precursor like protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aplp2 PE=1 SV=4	1.763	9.78E-06
Q61398	Pcolce	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pcolce PE=1 SV=2	1.720	3.26E-05
P28862	Mmp3	Stromelysin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp3 PE=2 SV=2	1.706	1.35E-04
Q61147	Cp	Ceruloplasmin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cp PE=1 SV=2	1.692	2.33E-04
P29168	gag	Gag polyprotein OS=Murine leukemia virus (strain DEF27) OX=31688 GN=gag PE=3 SV=3	1.686	1.62E-03
P21460	Cst3	Cystatin-C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cst3 PE=1 SV=2	1.669	5.54E-05
P52793	Efnal	Ephrin-A1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Efnal PE=1 SV=1	1.660	2.47E-04
P62137	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1- α catalytic subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppp1ca PE=1 SV=1	1.612	1.32E-02
Q9CR22	Tmem42	Transmembrane protein 42 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tmem42 PE=2 SV=1	1.590	5.10E-05
P01027	C3	Complement C3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=C3 PE=1 SV=3	1.573	2.53E-04
Q91VU0	Fam3c	Protein FAM3C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fam3c PE=1 SV=1	1.557	3.09E-05
Q07797	Lgals3bp	Galectin-3-binding protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lgals3bp PE=1 SV=1	1.526	7.49E-04
P12023	App	Amyloid-beta precursor protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=App PE=1 SV=3	1.513	3.85E-03
P99029	Prdx5	Peroxisomal oxidoreductase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx5 PE=1 SV=2	1.500	2.33E-02
Q6PE55	Pdgfrl	Platelet-derived growth factor receptor-like protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdgfrl PE=2 SV=1	1.490	6.13E-03
Q61468	Msln	Mesothelin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Msln PE=1 SV=1	1.471	2.15E-04
P14211	Calr	Calreticulin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Calr PE=1 SV=1	1.460	6.73E-05
Q8QZR4	Oaf	Out of first protein homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oaf PE=2 SV=1	1.451	1.16E-03
P03991	H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen K-W28 α chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=H2-K1 PE=1 SV=2	1.435	1.34E-02
Q9DAU7	Wfdc2	WAP four-disulfide core domain protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Wfdc2 PE=1 SV=1	1.430	1.85E-05
P50543	S100a11	Protein S100-A11 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a11 PE=1 SV=1	1.418	9.83E-04
P50228	Cxcl5	C-X-C motif chemokine 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cxcl5 PE=1 SV=2	1.415	4.01E-02

Quadro 2: Proteínas que possuem abundância significativamente aumentada (p-valor <0.05) e Fold Change > 1,4 em 4T1 shRNA-Gal-3 (círculos vermelhos do volcano plot).

Accession	Gene Name	Description	old Chang	p-value
P09041	Pgk2	Phosphoglycerate kinase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgk2 PE=1 SV=4	0.705	1.48E-04
Q64727	Vcl	Vinculin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vcl PE=1 SV=4	0.704	1.24E-03
P30681	Hmgb2	High mobility group protein B2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hmgb2 PE=1 SV=3	0.702	7.05E-03
P20152	Vim	Vimentin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vim PE=1 SV=3	0.701	4.13E-04
P63158	Hmgb1	High mobility group protein B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hmgb1 PE=1 SV=2	0.701	6.27E-03
P14152	Mdh1	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mdh1 PE=1 SV=3	0.700	2.24E-02
Q9CPU0	Glo1	Lactoylglutathione lyase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glo1 PE=1 SV=3	0.700	1.83E-04
P35979	Rpl12	Large ribosomal subunit protein uL1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rpl12 PE=1 SV=2	0.696	1.31E-03
Q7TMM9	Tubb2a	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb2a PE=1 SV=1	0.696	6.50E-04
Q9CWF2	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb2b PE=1 SV=1	0.696	6.50E-04
Q8R0E2	Plod1	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Plod1 PE=1 SV=1	0.695	1.37E-02
P62631	Eef1a2	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef1a2 PE=1 SV=1	0.695	9.23E-04
P80318	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct3 PE=1 SV=1	0.694	7.14E-04
P10126	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef1a1 PE=1 SV=3	0.691	2.86E-05
P99024	Tubb5	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb5 PE=1 SV=1	0.687	6.73E-04
P68372	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb4b PE=1 SV=1	0.682	2.64E-04
P62806	H4c1	Histone H4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H4c1 PE=1 SV=2	0.682	1.95E-04
P68368	Tuba4a	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba4a PE=1 SV=1	0.681	5.80E-04
Q64667	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_ testis-specific OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gapdh PE=1 SV=1	0.679	9.58E-03
Q92105	Clic1	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clic1 PE=1 SV=3	0.676	2.66E-03
P58321	Uch4a	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Uch4a PE=2 SV=1	0.675	1.09E-02
P05213	Tubul1	Tubulin alpha-1B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tub1b PE=1 SV=2	0.675	1.04E-03
O08553	Dpyy2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dpyy2 PE=1 SV=2	0.672	1.10E-04
Q61206	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pafah1b2 PE=1 SV=2	0.663	2.78E-03
Q91E66	Talp	Thymic stromal lymphopoietin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Talp PE=1 SV=1	0.656	3.60E-03
P80314	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct2 PE=1 SV=4	0.652	9.21E-05
P63323	Rps12	Small ribosomal subunit protein eS12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps12 PE=1 SV=3	0.647	2.12E-04
P31001	Des	Desmin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Des PE=1 SV=3	0.644	9.72E-05
P21550	Eno3	Beta-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno3 PE=1 SV=3	0.641	5.09E-06
P17182	Eno1	Alpha-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno1 PE=1 SV=3	0.640	8.49E-04
Q92X21	Hnrrpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrrpf PE=1 SV=3	0.638	3.45E-04
Q91V17	Rnh1	Ribonuclease inhibitor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rnh1 PE=1 SV=1	0.637	3.08E-03
Q88HN3	Ganab	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ganab PE=1 SV=1	0.636	3.50E-04
Q92F44	Tubb6	Tubulin beta-6 chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb6 PE=1 SV=1	0.630	5.32E-05
P40124	Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cap1 PE=1 SV=4	0.630	3.17E-06
P16588	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gapdh PE=1 SV=2	0.630	2.68E-03
P40142	Tkt	Transketolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tkt PE=1 SV=1	0.616	3.89E-05
P07091	S100a4	Protein S100-A4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a4 PE=1 SV=1	0.605	2.74E-05
O55183	Stc1	Stanniocalcin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Stc1 PE=2 SV=1	0.596	1.45E-05
P10605	Ctsh	Cathepsin B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsh PE=1 SV=2	0.594	4.04E-04
P16675	Ctsa	Lysosomal protective protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsa PE=1 SV=1	0.594	6.98E-03
O35737	Hnrrph1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrrph1 PE=1 SV=3	0.591	5.41E-05
P34884	Mif	Macrophage migration inhibitory factor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mif PE=1 SV=2	0.590	1.29E-03
P06745	Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpi PE=1 SV=4	0.586	2.81E-05
P05064	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldoa PE=1 SV=2	0.586	2.83E-04
P52480	Pkm	Pyruvate kinase PKM OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pkm PE=1 SV=4	0.578	1.08E-05
Q88K05	Ipo5	Importin-5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ipo5 PE=1 SV=3	0.572	2.13E-05
Q92C04	Cops7a	COP9 signalosome complex subunit 7a OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cops7a PE=1 SV=2	0.566	1.45E-03
P54071	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh2 PE=1 SV=3	0.563	4.26E-08
P06151	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ldha PE=1 SV=3	0.549	7.90E-05
Q88SL7	Arf2	ADP-ribosylation factor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf2 PE=1 SV=2	0.547	3.52E-04
P41245	Mmp9	Matrix metalloproteinase-9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp9 PE=1 SV=2	0.546	6.08E-05
P17751	Tpi1	Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tpi1 PE=1 SV=5	0.538	3.71E-04
P17183	Eno2	Gamma-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno2 PE=1 SV=2	0.536	7.19E-07
P63242	Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eif5a PE=1 SV=2	0.530	4.95E-05
O88783	F5	Coagulation factor V OS=Mus musculus OX=10090 GN=F5 PE=1 SV=1	0.526	5.50E-06
P62774	Mtpn	Myotrophin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtpn PE=1 SV=2	0.522	7.83E-05
Q900P9	Pgm1	Phosphoglucomutase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgm1 PE=1 SV=4	0.520	9.60E-07
Q61166	Mapre1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mapre1 PE=1 SV=3	0.512	7.37E-05
P05063	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldoc PE=1 SV=4	0.505	2.25E-05
Q9CQ65	Mtap	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtap PE=1 SV=1	0.504	4.27E-05
P61205	Arf3	ADP-ribosylation factor 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf3 PE=2 SV=2	0.499	4.29E-04
P09411	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgk1 PE=1 SV=4	0.489	2.51E-05
P84078	Arf1	ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf1 PE=1 SV=2	0.468	3.09E-04
P28656	Nap1l1	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nap1l1 PE=1 SV=2	0.468	1.33E-05
P61750	Arf4	ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf4 PE=1 SV=2	0.459	1.48E-03
P84084	Arf5	ADP-ribosylation factor 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf5 PE=1 SV=2	0.459	1.48E-03
Q9R0P5	Dstn	Destrin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dstn PE=1 SV=3	0.456	1.95E-07
P50247	Ahcy	Adenosylhomocysteinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ahcy PE=1 SV=3	0.454	2.29E-06
P70677	Casp3	Caspase-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Casp3 PE=1 SV=1	0.439	1.23E-03
P84228	H3c2	Histone H3.2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3c2 PE=1 SV=2	0.438	6.92E-03
P16130	Lgals3	Galectin-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lgals3 PE=1 SV=3	0.426	6.38E-05
P02301	H3-5	Histone H3.3C OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3-5 PE=3 SV=3	0.376	6.53E-07
P84244	H3-3a	Histone H3.3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3-3a PE=1 SV=2	0.376	6.53E-07
Q9D3D0	Ttpal	Alpha-tocopherol transfer protein-like OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ttpal PE=1 SV=3	0.376	6.53E-07
O88844	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh1 PE=1 SV=2	0.347	4.62E-06
Q62433	Ndrp1	Protein NDRG1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndrp1 PE=1 SV=1	0.343	4.79E-05
P45376	Akr1b1	Aldo-keto reductase family 1 member B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Akr1b1 PE=1 SV=3	0.341	8.19E-06
Q9R0P3	Esd	S-formylglutathione hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Esd PE=1 SV=1	0.338	6.36E-05
P08551	Nefl	Neurofilament light polypeptide OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nefl PE=1 SV=5	0.331	6.10E-03
O08529	Capn2	Calpain-2 catalytic subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Capn2 PE=1 SV=4	0.294	1.30E-07
Q3U41	Scimp	SLP adaptor and CSK-interacting membrane protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Scimp PE=1 SV=1	0.287	1.70E-01
Q9C942	Prps2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prps2 PE=1 SV=4	0.233	2.74E-05
Q99J88	Smardc2	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=smardc2 PE=1 SV=2	0.217	5.28E-04
P47757	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Capzb PE=1 SV=3	0.137	2.13E-02
P14069	S100a6	Protein S100-A6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a6 PE=1 SV=3	0.031	2.42E-02

Quadro 3: Proteínas que apresentaram abundância significativamente diminuída (p-valor <0.05) e Fold Change < 0,71 em 4T1 shRNA-Gal-3.

5.4 Análise de Gene Ontology realizada com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativa entre o secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB

A análise de Gene Ontology foi realizada na plataforma String com as 130 proteínas que apresentaram diferenças de abundância significativas em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB. Destas, 86 proteínas apresentaram abundância diminuída e 44 proteínas apresentaram abundância aumentada e foram analisadas separadas. A figura 9, mostra os gráficos de Enriquecimento em Processos Biológicos obtidos nesta análise. Podemos observar que, as proteínas diminuídas no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 (Figura 9A) foram classificadas em processos como metabolismo de hexose e glicose além do catabolismo de carboidratos. Já as proteínas aumentadas no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 (Figura 9B) foram classificadas em processos envolvendo regulação da atividade hidrolítica, da proteólise e da atividade de peptidases.

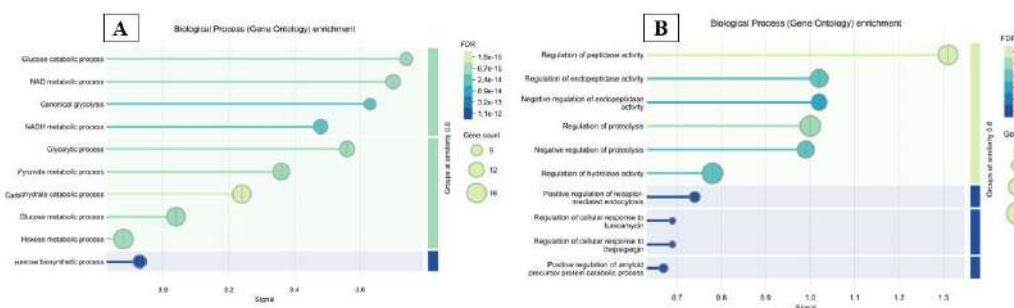


Figura 9: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String mostrando os 10 processos biológicos mais enriquecidos com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA- Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

Os gráficos de Enriquecimento em Função Molecular obtidos com as proteínas com abundância diminuída (Figura 10A) ou aumentada (Figura 10B) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB são apresentados na figura 10. Podemos observar em A que a maioria das proteínas secretadas com abundância diminuída foram classificadas em funções moleculares como ligação de pequenas moléculas e atividade de moléculas estruturais. Já em B, a maioria das proteínas

secretadas com abundância aumentada foram classificadas em funções moleculares como ligação do receptor de sinalização e atividade reguladora de peptidase.

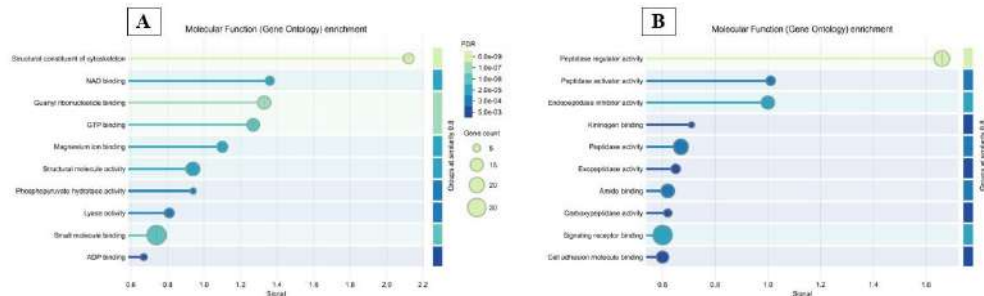


Figura 10: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String (<https://string-db.org/>) mostrando as 10 funções moleculares mais enriquecidas com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

A figura 11, mostra os gráficos obtidos na análise das Vias de Sinalização do Reactome. Podemos observar que as proteínas presentes no secretoma que apresentaram abundância diminuída em função do silenciamento da Gal-3 (Figura 11A) foram classificadas em vias de sinalização relacionadas ao metabolismo de glicose, glicólise e gliconeogênese, já as proteínas que apresentaram abundância aumentada no secretoma da linhagem 4T1 shRNA-Gal-3 (Figura 11B) foram classificadas em vias de sinalização relacionadas à organização da MEC.

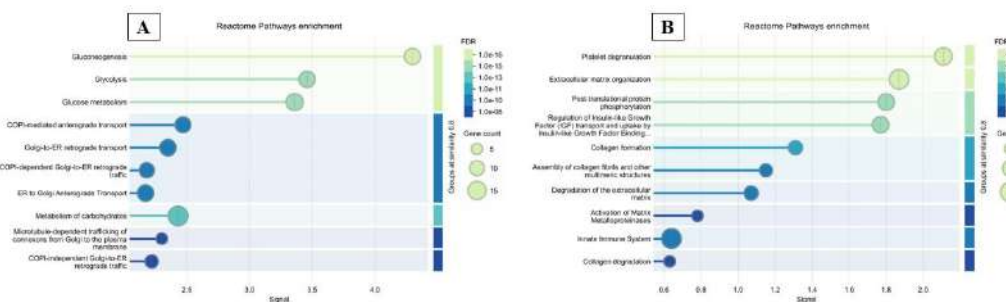


Figura 11: Análise de Gene Ontology feita na plataforma String (<https://string-db.org/>) mostrando as 10 vias de sinalização do Reactome mais enriquecidas com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

5.5 Análise da rede de interações proteína-proteína no secretoma da linhagem 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a linhagem 4T1 shRNA-SCRB

Com o objetivo de analisar como as proteínas com diferenças de abundância significativamente diminuídas, que foram classificadas em processos biológicos e vias de sinalização relacionadas ao metabolismo de carboidratos e glicose no secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3, interagem entre si, nós construímos a rede de interação proteína-proteína (PPI Network) na plataforma String. A figura 12 mostra o resultado obtido, podemos observar a formação de uma rede bastante significativa com um p-valor inferior a 1.0×10^{-16} ($p < 1.0e-16$) para o seu enriquecimento. Nesta figura, podemos observar também, as proteínas coloridas marcadas com as cores dos processos biológicos e vias de sinalização mostrados na tabela ao lado da rede de PPI formando um nicho no interior desta.

Na figura 13, temos o resultado da rede de PPI obtido com as proteínas com diferenças de abundância significativamente aumentadas, que foram classificadas em processos biológicos e vias de sinalização relacionadas à regulação da atividade proteolítica, atividade de peptidase e organização da MEC no secretoma da linhagem celular 4T1 shRNA-Gal-3. A rede de interações proteína-proteína apresentou um enriquecimento com um p-valor inferior a 1.0×10^{-16} ($p < 1.0e-16$) apresentando um número de interações maior do que o esperado para o número de proteínas analisadas. Podemos observar as proteínas coloridas classificadas nos processos biológicos e vias de sinalização de acordo com as cores mostradas na tabela ao lado da rede de PPI.

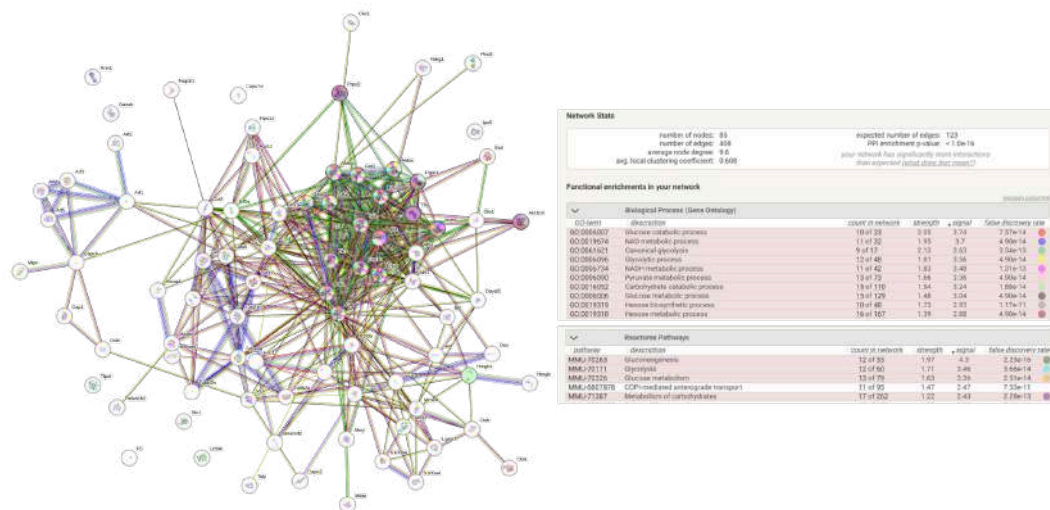


Figura 12: Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente diminuída no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

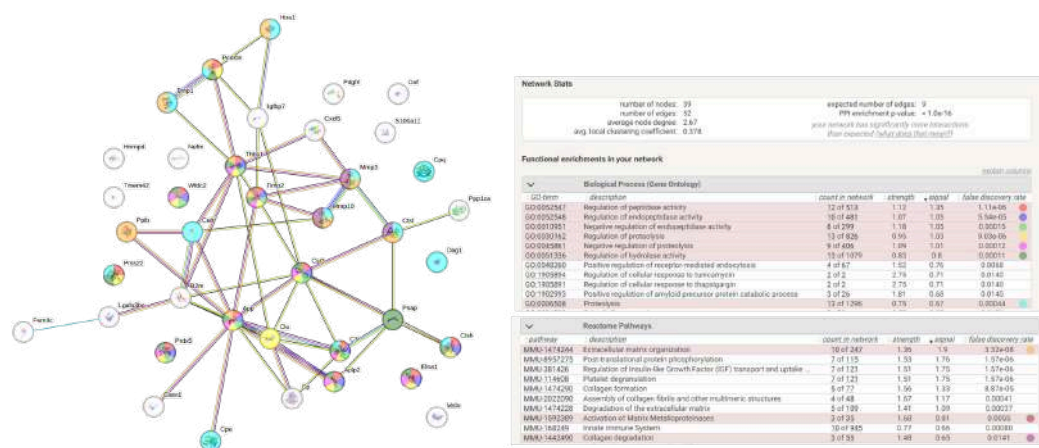


Figura 13: Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente aumentadas no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.

5.6 Análise de heatmap feita com proteínas que apresentaram diferenças de abundância no secretoma das células 4T1 reguladas negativamente para Gal-3

Podemos observar a reprodutibilidade entre as 3 replicatas experimentais analisadas para cada secretoma estudado. Nas replicatas em que a proteína aparece marcada de vermelho sua abundância está aumentada e de azul sua

abundância está diminuída (Figura 14). E podemos observar as principais proteínas e suas funções (Quadro 4).

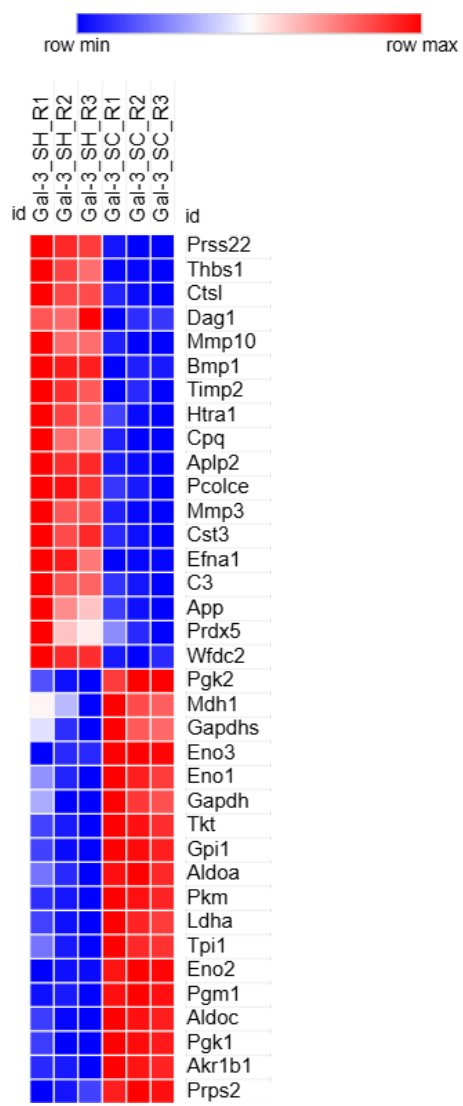


Figura 14: *Heatmap* (programa Morpheus) das principais proteínas com diferença de abundância significativa classificadas nos processos de metabolismo de carboidratos (diminuída) e nos processos de reorganização da MEC (aumentadas).

Proteínas	Função	Referência
Prss22	Regulação do desenvolvimento das vias aéreas	(GENECARDS, 2025)
Thbs1	Regulação da angiogênese e a adesão celular	(GENECARDS, 2025)
Ctsl	Degradação de proteínas e	(PROTEIN ATLAS, 2025)

	remodelação celular	
Dag1	Ligação da matriz extracelular ao citoesqueleto	(GENECARDS, 2025)
Mmp10	Degradação de componentes da matriz extracelular e está associada à progressão tumoral	(GENECARDS, 2025)
Bmp1	Processamento de proteínas da matriz extracelular e está envolvida na formação óssea	(Santos e cols., 2005)
Timp2	Regulação da remodelação da matriz extracelular e a progressão do câncer	(Escalona e cols., 2020)
Htra1	Regulação da sinalização do TGF-beta e na homeostase celular	(Chen e cols., 2021)
Cpq	Degradação de peptídeos	(GENECARDS, 2025)
Aplp2	Adesão celular e na sinalização neuronal	(GENECARDS, 2025)
Pcolce	Atuação na atividade da endopeptidase do colágeno	(GENECARDS, 2025)
Mmp3	Degradação dos componentes da matriz extracelular e está envolvida na inflamação e progressão tumoral	(GENECARDS, 2025)
Cst3	Regulação da resposta inflamatória e na função renal	(Fernando e cols., 2020)
Efna1	Regulação da migração celular e da angiogênese	(Zhang e cols., 2021)
C3	proteína do sistema complemento, essencial para a imunidade inata	(GENECARDS, 2025)
App	Proteína precursora do amilóide, envolvida na função sináptica e na doença de Alzheimer	(GENECARDS, 2025)
Prdx5	Proteção contra o estresse oxidativo	(UNIPROT, 2025)
Wfdc2	Atuação na imunidade inata e na progressão do câncer	(Bingle e cols., 2006)
Pgk2	Metabolismo energético e sobrevivência de células tumorais	(Wu e cols., 2020)
Mdh1	Enzima do ciclo do ácido cítrico	(GENECARDS, 2025)

Gaqpdhs	Atuação em metabolismo de carboidratos	(GENECARDS, 2025)
Eno3	Atuação no músculo esquelético (glicólise e no metabolismo energético)	(GENECARDS, 2025)
Eno1	Atuação na glicólise, resposta celular ao estresse	(Li e cols., 2024)
Gapdh	Atuação na glicólise e apoptose	(GENECARDS, 2025)
Tkt	Atuação na síntese de nucleotídeos	(Deshpande e cols., 2019)
GpI1	Atuação como enzima glicolítica (citoplasma) na sobrevivência de neurônios motores	(NCBI, 2025)
Aldoa	Atuação na glicólise e progressão do câncer	(GENECARDS, 2025)
Pkm	Glicólise e proliferação celular	(UNIPROT, 2025)
Ldha	Conversão de piruvato em lactato	(UNIPROT, 2025)
Tpi1	Atuação na glicólise e na gliconeogênese	(Jin e cols., 2022)
Eno2	Atuação na glicólise e desenvolvimento neuronal	(GENECARDS, 2025)
Pgm1	Metabolismo de carboidratos	(NCBI, 2025)
Aldoc	Atuação na glicólise e na função neuronal	(PROTEIN ATLAS, 2025)
Pgk1	Atuação na glicólise e na regulação do metabolismo celular	(Zhang e cols., 2023)
Akr1b1	Atuação na glicólise	(GENECARDS, 2025)
Prps2	Atuação na síntese de nucleotídeos	(Lu e cols., 2023)

Quadro 4: Principais proteínas com diferença de abundância significativa classificadas nos processos de metabolismo de carboidratos (diminuída) e nos processos de reorganização da MEC (aumentadas), e suas funções.

6. DISCUSSÃO

A Gal-3 é uma lectina com papel relevante em vários fenômenos biológicos, incluindo os eventos de interação célula-célula e célula-matriz, bem como uma lectina com função anti-apoptótica. Nas neoplasias o seu aumento está

relacionado com o desenvolvimento, progressão e contribuição para os processos metastáticos (Nangia-Makker e cols., 2008). A Gal-3 derivada de tumores têm um papel relevante nas células do sistema imunológico tanto promovendo inflamação quanto levando a diminuição da resposta inflamatória (Zhao e cols., 2009; Cardoso e cols., 2016). A Gal-3 produzida pelo tumor tem um papel na biologia do próprio tumor, como nas células do microambiente tumoral. Nas células de carcinoma mamário humano MDA-MB-231, a Gal-3 e a integrina Beta-1 são endocitadas via *caveolae*, modulando assim a disponibilidade desta integrina para adesão tumoral (Ilmer e cols., 2016). Este dado corrobora o seu papel na célula tumoral facilitando a adesão às proteínas da matriz o que poderia levar a sua retenção no nicho primário do tumor ou dependendo de outros fatores como a produção de metaloproteinases, poderia facilitar sua migração e portanto a metástase.

Em nosso trabalho, primeiramente optamos por trabalhar com clones das linhagens shRNA-Gal-3 e shRNA-SCRB na tentativa de minimizar a heterogeneidade entre as células tumorais. Surpreendentemente obtivemos clones que apresentaram silenciamento da ordem de 40 a 50%. E em dois clones tivemos um silenciamento da ordem de 90%. Esses nossos dados reforçam a importância da clonalidade para obtenção de dados mais próximos à condição do tumor primário. Nos artigos que usaram o silenciamento em linhagens de câncer de cólon, os autores não trabalharam com clones (Bhattacharyya e cols., 2014), de forma que o nosso trabalho neste aspecto propõe a importância da clonalidade. Após o silenciamento, a Gal-3 residual foi detectada majoritariamente no citoplasma, em uma distribuição semelhante às células não silenciadas, porém com muito menos intensidade, dado que foi corroborado na detecção da proteína por *immunoblotting*. Em células do sistema imunológico como as células NK, a Gal-3 é expressa principalmente no núcleo e citoplasma, o que corrobora com sua função de citotoxicidade e independência do meio extracelular (Brittoli e cols., 2018).

Outro ponto importante a ser discutido é a capacidade da Gal-3 de interagir

com os Gags quando estes se encontram menos sulfatados (Bhattacharyya e cols., 2017). Em trabalho anterior do grupo (Pereira e cols., 2019), foi demonstrado um aumento de Arilsulfatase B (ARSB) nas células silenciadas para Gal-3, o que indicaria uma maior remoção dos grupos sulfatos do condroitin 4 proteoglicano (CSPG4). Este dado poderia explicar em parte a presença ainda da Gal-3 no citoplasma devido a uma maior interação entre eles, o que poderia levar a uma menor disponibilidade do CSPG4 na superfície celular. O papel da Gal-3 na interação entre os grupos sulfatos deve ser melhor investigada em trabalhos futuros, uma vez que a maior ou menor disponibilidade dos PGs na superfície celular poderia alterar a relação da célula tumoral com os elementos da MEC.

No modelo experimental usando células de carcinoma mamário 4T1, o silenciamento da Gal-3 levou a uma mudança de fenótipo nestas células (Pereira e cols., 2019), com a diminuição de moléculas de adesão na membrana celular. Em paralelo, as células aumentaram os níveis de condroitin sulfato, versican responsável pela migração celular, além de aumentarem a expressão de metaloproteases. A diminuição da Gal-3 na célula tumoral culminou com uma maior capacidade migratória tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O conjunto dos dados descritos neste trabalho sugere que a Gal-3 controla eventos complexos, o que neste modelo experimental indica que a sua presença nas células favorece um atraso na migração e metástase para a medula óssea, portanto um marcador de bom prognóstico.

Considerando que as modificações descritas nas células 4T1 silenciadas para a Gal-3 envolvem regulação positiva e negativa de síntese de proteínas e PGs, nós partimos para uma análise ampla do padrão de secreção de proteínas por estas células. Na literatura, encontramos esta abordagem para subclones de células 4T1 com capacidades metastáticas diferenciadas (Erin e cols., 2018). Neste trabalho, os autores demonstram que a preferência de metástase para órgãos como fígado, cérebro e coração está associada a diferenças nas proteínas secretadas. Dentre as 500 proteínas secretadas, oitenta e cinco foram significativamente alteradas nas células metastáticas incluindo fibulina-4, BMP-1 (bone morphogenic protein-1),

TGF- β 1, MMP-3, MMP-9, and Thymic Stromal Lymphopoietin.

Neste trabalho, dentre as 342 proteínas identificadas e quantificadas nas linhagens celulares estudadas, identificamos 130 proteínas com diferenças de abundância significativas. Dentre estas, 44 proteínas apresentam abundâncias significativamente aumentadas e 86 apresentam abundâncias significativamente diminuídas na linhagem 4T1 silenciada para Gal-3. A análise de Gene Ontology mostrou que, essas proteínas com maior abundância foram classificadas em processos biológicos, funções moleculares e vias de sinalização relacionadas à regulação da atividade hidrolítica, da proteólise e da atividade de peptidases. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Erin e cols., 2018, que mostraram aumento da secreção de proteínas como metaloproteases nas linhagens metastáticas. Já na análise de Gene Ontology as 86 proteínas secretadas que apresentaram abundância significativamente diminuídas na linhagem silenciada para Gal-3 foram classificadas em processos biológicos, funções moleculares e vias de sinalização relacionadas ao metabolismo de hexose e glicose além do catabolismo de carboidratos. Mostrando que na célula tumoral shRNA-SCRB o metabolismo celular está totalmente ativo, caracterizando um dos “hallmarks” do câncer (Schwartz L e cols., 2017), o efeito Warburg. Neste, a célula tumoral aumenta a glicólise anaeróbica com produção de lactato em detrimento da respiração mitocondrial, promovendo a carcinogênese (Jiang e Ye, 2025). De fato, a rede de interações proteína-proteína gerada mostrou uma forte interação de proteínas como: Eno1, AldoA, AldoC, GAPDH, proteínas com papel fundamental na glicólise e na gliconeogênese. A célula tumoral mesmo na presença de oxigênio prioriza o metabolismo anaeróbico para acelerar a geração de energia e promover a proliferação, sobrevivência, crescimento e invasão celular (Pavlova e cols., 2022).

Comparativamente, na linhagem celular que foi silenciada para Gal-3, esse metabolismo é diminuído, e a célula tumoral silenciada para Gal-3 aumenta a secreção de proteínas como MMP3, MMP10, THBS1, DAG-1 no intuito de corrigir a deficiência da Gal-3 e promover a migração, invasão e angiogênese

fundamentais para o processo de sobrevivência celular e a formação de metástase.

7. CONCLUSÃO

A presença da Gal-3 nas células 4T1 *scramble* está relacionada ao metabolismo glicolítico. A diminuição da Gal-3 nas células 4T1 está relacionada ao remodelamento da matriz extracelular, gerando maior potencial migratório. Logo, o modelo *in vivo* gerado em resultados preliminares, citados anteriormente na introdução foi validado.

8. REFERÊNCIAS

AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; *et al.* Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Research**, v. 57, n. 23, p. 5272–5276, 1997.

ASLAKSON, Cheryl J; MILLER, Fred R. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor.

BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.; GITT, M.A.; *et al.* Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807–20810, 1994.

BHATTACHARYYA, Sumit; FEFERMAN, Leo; TERAU, Kaoru; *et al.* Decline in arylsulfatase B leads to increased invasiveness of melanoma cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 4169–4180, 2017.

BHATTACHARYYA, Sumit; FEFERMAN, Leo; TOBACMAN, Joanne K. Increased Expression of Colonic Wnt9A through Sp1-mediated Transcriptional Effects involving Arylsulfatase B, Chondroitin 4-Sulfate, and Galectin-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17564–17575, 2014.

BHATTACHARYYA, Sumit; TOBACMAN, Joanne K. Hypoxia Reduces Arylsulfatase B Activity and Silencing Arylsulfatase B Replicates and Mediates the Effects of Hypoxia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33250, 2012.

BINGLE, Lynne; CROSS, Simon S; HIGH, Alec S; *et al.* WFDC2 (HE4): A potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. **Respiratory Research**, v. 7, n. 1, p. 61, 2006.

BOSCHER, Cécile; ZHENG, Yu Zi; LAKSHMINARAYAN, Ramya; *et al.* Galectin-3 Protein Regulates Mobility of N-cadherin and GM1 Ganglioside at Cell-Cell Junctions of Mammary Carcinoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32940–32952, 2012.

BRITTOLI, Alvaro; FALLARINI, Silvia; ZHANG, Hao; *et al.* “In vitro” studies on galectin-3 in human natural killer cells. **Immunology Letters**, v. 194, p. 4–12, 2018.

CALIFICE, Stéphane; CASTRONOVO, Vincent; VAN DEN BRÛLE, Frédéric. Galectin-3 and cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 4, p. 983–1075, 2004.

CAPLAN, Lee. Delay in breast cancer: implications for stage at diagnosis and survival. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 87, 2014.

CAPONE, Emily; IACOBELLI, Stefano; SALA, Gianluca. Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, p. 405, 2021.

CARDOSO, Ana Carolina Ferreira; ANDRADE, Luciana Nogueira de Sousa; BUSTOS, Silvina Odete; *et al.* Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology**, v. 6, p. 127, 2016.

CAREY, Lisa A. HER2—a good addiction. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 9, n. 4, p. 196–197, 2012.

CHEN, Mingming; YANG, Shilei; WU, Yu; *et al.* High temperature requirement A1 in cancer: biomarker and therapeutic target. **Cancer Cell International**, v. 21, p. 513, 2021.

COLLIGNON, Joëlle; LOUSBERG, Laurence; SCHROEDER, Hélène; *et al.* Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. **Breast Cancer (Dove Medical Press)**, v. 8, p. 93–107, 2016.

CTSL protein expression summary - The Human Protein Atlas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135047-CTSL>>. Acesso em: 27 maio 2025.

DAGHER, S F; WANG, J L; PATTERSON, R J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–1217, 1995.

OLIVEIRA, J. T.; DE MATOS, A. J.; GOMES, J.; *et al.* Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: implications for tumor metastasis. **Glycobiology**, v. 20, n. 11, p. 1341–1352, 2010.

DEEPAK, K.G.K.; VEMPATI, Rahul; NAGARAJU, Ganji Purnachandra; *et al.* Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 153, p. 104683, 2020.

DESHPANDE, Gaurang P.; PATTERTON, Hugh-George; FAADIEL ESSOP, M. The human transketolase-like proteins TKTL1 and TKTL2 are bona fide transketolases. **BMC Structural Biology**, v. 19, p. 2, 2019.

DONG, Rui; ZHANG, Min; HU, Qunying; *et al.* Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 2018.

INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acesso em: 30 ago. 2024.

ERIN, Nuray; OGAN, Nur; YERLIKAYA, Azmi. Secretomes reveal several novel proteins as well as TGF- β 1 as the top upstream regulator of metastatic process in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 170, n. 2, p. 235–250, 2018.

ESCALONA, Ruth M.; BILANDZIC, Maree; WESTERN, Patrick; *et al.* TIMP-2 regulates proliferation, invasion and STAT3-mediated cancer stem cell-dependent chemoresistance in ovarian cancer cells. **BMC Cancer**, v. 20, p. 960, 2020.

FERNANDO, Sanduni; POLKINGHORNE, Kevan R. Cystatin C: not just a marker of kidney function. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 42, n. 1, p. 6–7, 2020.

FUKUMORI, Tomoharu; KANAYAMA, Hiro-omi; RAZ, Avraham. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 10, n. 3, p. 101–108, 2007.

GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. Disponível em: <<https://www.genecards.org/>>. Acesso em: 27 maio 2025.

ILMER, Matthias; MAZUREK, Nachman; GILCREASE, Michael Z.; *et al.* 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, p. 97, 2016.

JIANG, Haowen; YE, Jiangbin. The Warburg effect: The hacked mitochondrial-nuclear communication in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 112, p. 93–111, 2025.

JIN, Xiaoying; WANG, Dandan; LEI, Mengxia; *et al.* TPI1 activates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to induce breast cancer progression by stabilizing CDCA5. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, p. 191, 2022.

KAUR, Punit; NAGARAJA, Ganachari M; ZHENG, Hongying; *et al.* A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. **BMC Cancer**, v. 12, p. 120, 2012.

KOBAYASHI, Tsutomu; SHIMURA, Tatsuo; YAJIMA, Toshiki; *et al.* Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of β -catenin. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 12, p. 2775–2786, 2011.

LI, Dong-Mei; FENG, Yu-Mei. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 1, p. 7–21, 2011.

LI, Yafei; LIU, Lu; LI, Bo. Role of ENO1 and its targeted therapy in tumors. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, p. 1025, 2024.

LIU, Fu-Tong; RABINOVICH, Gabriel A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LU, Guang-Ming; HU, Huan-Huan; CHANG, Chia-Chun; *et al.* Structural basis of human PRPS2 filaments. **Cell & Bioscience**, v. 13, p. 100, 2023.

MELO, Fabiana H. M.; BUTERA, Diego; JUNQUEIRA, Mara De Souza; *et al.* The Promigratory Activity of the Matricellular Protein Galectin-3 Depends on the Activation of PI-3 Kinase. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29313, 2011.

NANGIA-MAKKER, Pratima; BALAN, Vitaly; RAZ, Avraham. Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. **Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 1, n. 1, p. 43–51, 2008.

NANGIA-MAKKER, Pratima; HOGAN, Victor; RAZ, Avraham. Galectin-3 and cancer stemness. **Glycobiology**, v. 28, n. 4, p. 172–181, 2018.

NEWLACZYL, Anna U.; YU, Lu-Gang. Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer. **Cancer Letters**, v. 313, n. 2, p. 123–128, 2011.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27 maio 2025.

The Human Protein Atlas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/>>. Acesso em: 27 maio 2025.

NIANG, Doudou Georges Massar; GABA, Folly Mawulolo; DIOUF, Adame; *et al.* Galectin-3 as a biomarker in breast neoplasms: Mechanisms and applications in patient care. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 112, n. 5, p. 1041–1052, 2022.

PARK, Ga Bin; KIM, Dae-Jin; KIM, Yeong-Seok; *et al.* Silencing of galectin-3 represses osteosarcoma cell migration and invasion through inhibition of FAK/Src/Lyn activation and β -catenin expression and increases susceptibility to chemotherapeutic agents. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 1, p. 185–194, 2015.

PAVLOVA, Natalya N.; ZHU, Jiajun; THOMPSON, Craig B. THE HALLMARKS OF CANCER METABOLISM: STILL EMERGING. **Cell metabolism**, v. 34, n. 3, p. 355–377, 2022.

PEREIRA, Jonathas Xavier; AZEREDO, Maria Carolina Braga; MARTINS, Felipe Sá; *et al.* The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. **BMC Cancer**, v. 16, p. 636, 2016.

PEREIRA, Jonathas Xavier; DOS SANTOS, Sofia Nascimento; PEREIRA, Thaís Canuto; *et al.* Galectin-3 Regulates the Expression of Tumor Glycosaminoglycans and Increases the Metastatic Potential of Breast Cancer. **Journal of Oncology**, v. 2019, p. 9827147, 2019.

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5–23, 2011.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols in Immunology**, v. Chapter 20, p. Unit 20.2, 2001.

RADOSAVLJEVIC, Gordana; VOLAREVIC, Vladislav; JOVANOVIC, Ivan; *et al.* The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1–2, p. 100–110, 2012.

RAIMOND, J.; ZIMONJIC, D. B.; MIGNON, C.; *et al.* Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human Chromosome 14 at region 14q21-22. **Mammalian Genome**, v. 8, n. 9, p. 706–707, 1997.

RUSSNES, Hege G.; LINGJÆRDE, Ole Christian; BØRRESEN-DALE, Anne-Lise; *et al.* Breast Cancer Molecular Stratification. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017.

SANTOS, Antônio Aparecido dos; MIRANDA, César Dário Oliveira; ALVES, Maria Teresa de Seixas; *et al.* O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, p. 194–195, 2005.

SASAKI, T; BRAKEBUSCH, C; ENGEL, J; *et al.* Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 6, p. 1606–1613, 1998.

SCHWARTZ, Laurent; SUPURAN, Claudiu T.; ALFAROUK, Khalid O. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 164–170, 2017.

SHIMURA, Tatsuo; TAKENAKA, Yukinori; TSUTSUMI, Souichi; *et al.* Galectin-3, a Novel Binding Partner of β -Catenin. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6363–6367, 2004.

TAKENAKA, Yukinori; FUKUMORI, Tomoharu; YOSHII, Tadashi; *et al.* Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 10, p. 4395–4406, 2004.

TAMIMI, Salah O.; AHMED, Ali. Stromal changes in invasive breast carcinoma: An ultrastructural study. **The Journal of Pathology**, v. 153, n. 2, p. 163–170, 1987.

UniProt. UniProt. Disponível em: <<https://www.uniprot.org>>. Acesso em: 27 maio 2025.

VILARDELL, Felip; NOVELL, Anna; MARTIN, Javier; *et al.* Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 460, n. 6, p. 569–575, 2012.

VIOLA, Manuela; BRÜGGEMANN, Kathrin; KAROUSOU, Evgenia; *et al.* MDA-MB-231 breast cancer cell viability, motility and matrix adhesion are regulated by a complex interplay of heparan sulfate, chondroitin-/dermatan sulfate and hyaluronan biosynthesis. **Glycoconjugate Journal**, v. 34, n. 3, p. 411–420, 2017.

VODUC, K. David; CHEANG, Maggie C. U.; TYLDESLEY, Scott; *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical**

Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 28, n. 10, p. 1684–1691, 2010.

WU, Song-Tao; LIU, Bo; AI, Zhong-Zhu; *et al.* Esculetin Inhibits Cancer Cell Glycolysis by Binding Tumor PGK2, GPD2, and GPI. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 379, 2020.

XU, X. C.; EL-NAGGAR, A. K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **The American Journal of Pathology**, v. 147, n. 3, p. 815–822, 1995.

YU, Fei; FINLEY, Russell L.; RAZ, Avraham; *et al.* Galectin-3 Translocates to the Perinuclear Membranes and Inhibits Cytochrome c Release from the Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15819–15827, 2002.

YU, Tianjian; DI, Genhong. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 237–252, 2017.

YUAN, Zhennan; LI, Yingpu; ZHANG, Sifan; *et al.* Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. **Molecular Cancer**, v. 22, n. 1, p. 48, 2023.

ZAFRA-CERES, Mercedes; DE HARO, Tomas; FAREZ-VIDAL, Esther; *et al.* Influence of CYP2D6 polymorphisms on serum levels of tamoxifen metabolites in Spanish women with breast cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 7, p. 932–937, 2013.

ZHANG, Kexin; SUN, Lixue; KANG, Yuanyuan. Regulation of phosphoglycerate kinase 1 and its critical role in cancer. **Cell Communication and Signaling: CCS**, v. 21, p. 240, 2023.

ZHANG, Yongqiang; ZHANG, Jinning; PAN, Guanlong; *et al.* Effects of EFNA1 on cell phenotype and prognosis of esophageal carcinoma. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 19, p. 242, 2021.

ZHAO, Qicheng; BARCLAY, Monica; HILKENS, John; *et al.* Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 154, 2010.

ZHAO, Qicheng; GUO, Xiuli; NASH, Gerard B.; *et al.* Circulating galectin-3 promotes metastasis by modifying MUC1 localization on cancer cell surface. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 6799–6806, 2009.

9. APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo submetido à publicação

Analysis of the secretome of triple negative breast carcinoma cells silenced for galectin-3; Breast Cancer Research and Treatment; Ref: Submission ID 724375c4-2adf-400e-9a06-63b5f72c9829.

APÊNDICE B – Quadro 2

Proteínas que possuem abundância significativamente aumentada (p-valor <0.05) e Fold Change > 1,4 em 4T1 shRNA-Gal-3 (círculos vermelhos do volcano plot).

Accession	Gene name	Description	Fold Change	p-value
Q9ER10	Prss22	Brain-specific serine protease 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prss22 PE=2 SV=2	3,50	1,99E-05
Q06890	Clu	Clusterin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clu PE=1 SV=1	2,47	1,4E-05
P11268	env	Envelope glycoprotein OS=Radiation murine leukemia virus OX=11787 GN=env PE=3 SV=2	2,37	1,12E-05
P31794	env	Envelope glycoprotein OS=Radiation murine leukemia virus (strain Kaplan) OX=31689 GN=env PE=1 SV=1	2,37	1,12E-05
P35441	Thbs1	Thrombospondin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Thbs1 PE=1 SV=1	2,30	0,000157

Q9EPL2	Clstn1	Calsyntenin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clstn1 PE=1 SV=1	2,26	1,42E-05
Q61581	Igfbp7	Insulin-like growth factor-binding protein 7 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Igfbp7 PE=1 SV=3	2,26	1,75E-05
P06797	Ctsl	Procathepsin L OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsl PE=1 SV=2	2,26	8,19E-05
P01887	B2m	Beta-2-microglobulin OS=Mus musculus OX=10090 GN=B2m PE=1 SV=2	2,25	0,000488
P49935	Ctsh	Pro-cathepsin H OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsh PE=1 SV=2	2,15	0,000762
P03386	env	Envelope glycoprotein OS=AKV murine leukemia virus OX=11791 GN=env PE=1 SV=1	2,12	8,16E-06
Q61207	Psap	Prosaposin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Psap PE=1 SV=2	2,02	4,45E-05
Q00493	Cpe	Carboxypeptidase E OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cpe PE=1 SV=2	2,01	3,41E-05
Q62165	Dag1	Dystroglycan 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dag1 PE=1 SV=4	1,97	0,000399
P24369	Ppib	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppib PE=1 SV=2	1,93	0,000197
O55123	Mmp10	Stromelysin-2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp10 PE=2 SV=1	1,92	0,000375
P98063	Bmp1	Bone morphogenetic protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Bmp1 PE=1 SV=2	1,90	5,3E-06
P25785	Timp2	Metalloproteinase inhibitor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Timp2 PE=1 SV=2	1,87	0,000122
Q9R118	Htra1	Serine protease HTRA1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Htra1 PE=1 SV=2	1,82	0,000334
P08553	Nefm	Neurofilament medium polypeptide OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nefm PE=1 SV=4	1,78	3,73E-05
Q9WVJ3	Cpq	Carboxypeptidase Q OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cpq PE=1 SV=1	1,78	0,000757
Q60668	Hnrnpd	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnpd PE=1 SV=2	1,77	0,000117
Q06335	Aplp2	Amyloid beta precursor like protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aplp2 PE=1 SV=4	1,76	9,78E-06
Q61398	Pcolce	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pcolce PE=1 SV=2	1,72	3,26E-05
P28862	Mmp3	Stromelysin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp3 PE=2 SV=2	1,71	0,000135
Q61147	Cp	Ceruloplasmin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cp PE=1 SV=2	1,69	0,000233
P29168	gag	Gag polyprotein OS=Murine leukemia virus (strain DEF27) OX=31688 GN=gag PE=3 SV=3	1,69	0,001621
P21460	Cst3	Cystatin-C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cst3 PE=1 SV=2	1,67	5,54E-05
P52793	Efna1	Ephrin-A1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Efna1 PE=1 SV=1	1,66	0,000247
P62137	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ppp1ca PE=1 SV=1	1,61	0,013186
Q9CR22	Tmem42	Transmembrane protein 42 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tmem42 PE=2 SV=1	1,59	5,1E-05

P01027	C3	Complement C3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=C3 PE=1 SV=3	1,57	0,000253
Q91VU0	Fam3c	Protein FAM3C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Fam3c PE=1 SV=1	1,56	3,09E-05
Q07797	Lgals3bp	Galectin-3-binding protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lgals3bp PE=1 SV=1	1,53	0,000749
P12023	App	Amyloid-beta precursor protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=App PE=1 SV=3	1,51	0,003853
P99029	Prdx5	Peroxiredoxin-5_mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prdx5 PE=1 SV=2	1,50	0,023293
Q6PE55	Pdgfrl	Platelet-derived growth factor receptor-like protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pdgfrl PE=2 SV=1	1,49	0,006134
Q61468	Msln	Mesothelin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Msln PE=1 SV=1	1,47	0,000215
P14211	Calr	Calreticulin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Calr PE=1 SV=1	1,46	6,73E-05
Q8QZR4	Oaf	Out at first protein homolog OS=Mus musculus OX=10090 GN=Oaf PE=2 SV=1	1,45	0,001162
P03991	H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen_K-W28 alpha chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=H2-K1 PE=1 SV=2	1,44	0,013446
Q9DAU7	Wfdc2	WAP four-disulfide core domain protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Wfdc2 PE=1 SV=1	1,43	1,85E-05
P50543	S100a11	Protein S100-A11 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a11 PE=1 SV=1	1,42	0,000983
P50228	Cxcl5	C-X-C motif chemokine 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cxcl5 PE=1 SV=2	1,42	0,040113

APÊNDICE C – Quadro 3

Proteínas que apresentaram abundância significativamente diminuída (p-valor <0.05) e Fold Change < 0,71 em 4T1 shRNA-Gal-3.

Accession	Gene name	Description	Fold Change	p-value
P09041	Pgk2	Phosphoglycerate kinase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgk2 PE=1 SV=4	0,71	1,48E-04
Q64727	Vcl	Vinculin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vcl PE=1 SV=4	0,70	1,24E-03
P30681	Hmgb2	High mobility group protein B2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hmgb2 PE=1 SV=3	0,70	7,05E-03
P20152	Vim	Vimentin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Vim PE=1 SV=3	0,70	4,13E-04
P63158	Hmgb1	High mobility group protein B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hmgb1 PE=1 SV=2	0,70	6,27E-03

P14152	Mdh1	Malate dehydrogenase_cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mdh1 PE=1 SV=3	0,70	2,24E-02
Q9CPU0	Glo1	Lactoylglycyl-L-glutathione lyase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Glo1 PE=1 SV=3	0,70	1,83E-04
P35979	Rpl12	Large ribosomal subunit protein uL11 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rpl12 PE=1 SV=2	0,70	1,31E-03
Q7TMM9	Tubb2a	Tubulin beta-2A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb2a PE=1 SV=1	0,70	6,50E-04
Q9CWF2	Tubb2b	Tubulin beta-2B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb2b PE=1 SV=1	0,70	6,50E-04
Q9R0E2	Plod1	Procollagen-lysine_2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Plod1 PE=1 SV=1	0,70	1,37E-02
P62631	Eef1a2	Elongation factor 1-alpha 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef1a2 PE=1 SV=1	0,69	9,23E-04
P80318	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct3 PE=1 SV=1	0,69	7,14E-04
P10126	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eef1a1 PE=1 SV=3	0,69	2,86E-05
P99024	Tubb5	Tubulin beta-5 chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb5 PE=1 SV=1	0,69	6,73E-04
P68372	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb4b PE=1 SV=1	0,68	2,64E-04
P62806	H4c1	Histone H4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H4c1 PE=1 SV=2	0,68	1,95E-04
P68368	Tuba4a	Tubulin alpha-4A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba4a PE=1 SV=1	0,68	5,80E-04
Q64467	Gapdhs	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase_testis-specific OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gapdhs PE=1 SV=1	0,68	9,58E-03
Q9Z1Q5	Clic1	Chloride intracellular channel protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Clic1 PE=1 SV=3	0,68	2,66E-03
P58321	Uchl4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Uchl4 PE=2 SV=1	0,67	1,09E-02
P05213	Tuba1b	Tubulin alpha-1B chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tuba1b PE=1 SV=2	0,67	1,04E-03
O08553	Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dpysl2 PE=1 SV=2	0,67	1,10E-04
Q61206	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit alpha2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pafah1b2 PE=1 SV=2	0,66	2,78E-03
Q9JIE6	Tslp	Thymic stromal lymphopoietin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tslp PE=1 SV=1	0,66	3,60E-03
P80314	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cct2 PE=1 SV=4	0,65	9,21E-05
P63323	Rps12	Small ribosomal subunit protein eS12 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rps12 PE=1 SV=3	0,65	2,12E-04
P31001	Des	Desmin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Des PE=1 SV=3	0,64	9,72E-05
P21550	Eno3	Beta-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno3 PE=1 SV=3	0,64	5,09E-06
P17182	Eno1	Alpha-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno1 PE=1 SV=3	0,64	8,49E-04

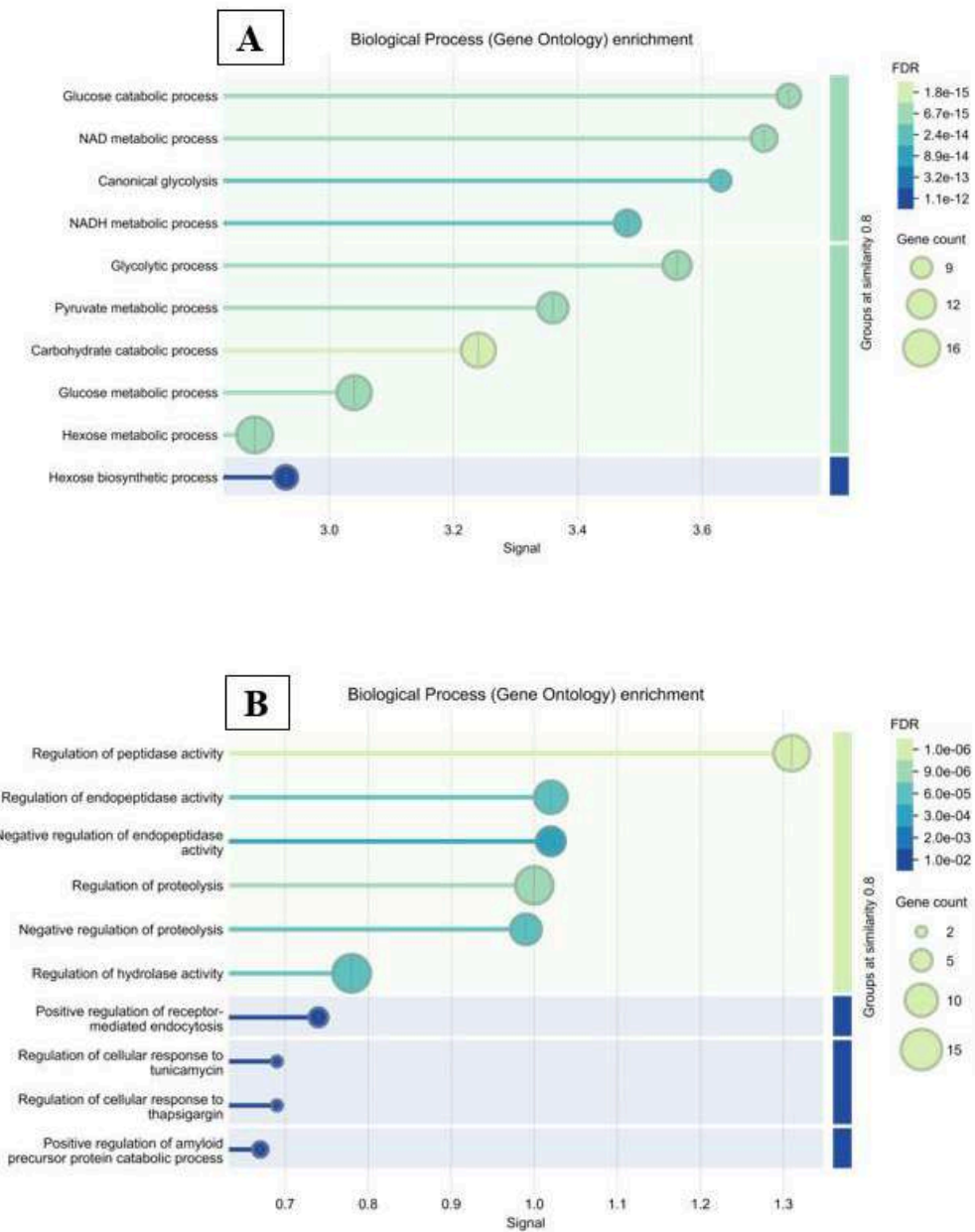
Q9Z2X1	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnpf PE=1 SV=3	0,64	3,45E-04
Q91VI7	Rnh1	Ribonuclease inhibitor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Rnh1 PE=1 SV=1	0,64	3,08E-03
Q8BHN3	Ganab	Neutral alpha-glucosidase AB OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ganab PE=1 SV=1	0,64	3,50E-04
Q922F4	Tubb6	Tubulin beta-6 chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tubb6 PE=1 SV=1	0,63	5,32E-05
P40124	Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cap1 PE=1 SV=4	0,63	3,17E-06
P16858	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gapdh PE=1 SV=2	0,63	2,68E-03
P40142	Tkt	Transketolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tkt PE=1 SV=1	0,62	3,89E-05
P07091	S100a4	Protein S100-A4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a4 PE=1 SV=1	0,60	2,74E-05
O55183	Stc1	Stanniocalcin-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Stc1 PE=2 SV=1	0,60	1,45E-05
P10605	Ctsb	Cathepsin B OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsb PE=1 SV=2	0,59	4,04E-04
P16675	Ctsa	Lysosomal protective protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ctsa PE=1 SV=1	0,59	6,98E-03
O35737	Hnrnp1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Mus musculus OX=10090 GN=Hnrnp1 PE=1 SV=3	0,59	5,41E-05
P34884	Mif	Macrophage migration inhibitory factor OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mif PE=1 SV=2	0,59	1,29E-03
P06745	Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Gpi PE=1 SV=4	0,59	2,81E-05
P05064	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldoa PE=1 SV=2	0,59	2,83E-04
P52480	Pkm	Pyruvate kinase PKM OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pkm PE=1 SV=4	0,58	1,08E-05
Q8BKC5	Ipo5	Importin-5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ipo5 PE=1 SV=3	0,57	2,13E-05
Q9CZ04	Cops7a	COP9 signalosome complex subunit 7a OS=Mus musculus OX=10090 GN=Cops7a PE=1 SV=2	0,57	1,45E-03
P54071	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh2 PE=1 SV=3	0,56	4,26E-08
P06151	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ldha PE=1 SV=3	0,55	7,90E-05
Q8BSL7	Arf2	ADP-ribosylation factor 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf2 PE=1 SV=2	0,55	3,52E-04
P41245	Mmp9	Matrix metalloproteinase-9 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mmp9 PE=1 SV=2	0,55	6,08E-05
P17751	Tpi1	Triosephosphate isomerase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Tpi1 PE=1 SV=5	0,54	3,71E-04
P17183	Eno2	Gamma-enolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eno2 PE=1 SV=2	0,54	7,19E-07
P63242	Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Eif5a PE=1 SV=2	0,53	4,95E-05
O88783	F5	Coagulation factor V OS=Mus musculus OX=10090 GN=F5 PE=1 SV=1	0,53	5,50E-06
P62774	Mtpn	Myotrophin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtpn PE=1 SV=2	0,52	7,83E-05

Q9D0F9	Pgm1	Phosphoglucomutase-1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgm1 PE=1 SV=4	0,52	9,60E-07
Q61166	Mapre1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mapre1 PE=1 SV=3	0,51	7,37E-05
P05063	Aldoc	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Mus musculus OX=10090 GN=Aldoc PE=1 SV=4	0,51	2,25E-05
Q9CQ65	Mtap	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Mtap PE=1 SV=1	0,50	4,27E-05
P61205	Arf3	ADP-ribosylation factor 3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf3 PE=2 SV=2	0,50	4,29E-04
P09411	Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Pgk1 PE=1 SV=4	0,49	2,51E-05
P84078	Arf1	ADP-ribosylation factor 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf1 PE=1 SV=2	0,47	3,09E-04
P28656	Nap111	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nap111 PE=1 SV=2	0,47	1,33E-05
P61750	Arf4	ADP-ribosylation factor 4 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf4 PE=1 SV=2	0,46	1,48E-03
P84084	Arf5	ADP-ribosylation factor 5 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Arf5 PE=1 SV=2	0,46	1,48E-03
Q9R0P5	Dstn	Destrin OS=Mus musculus OX=10090 GN=Dstn PE=1 SV=3	0,46	1,95E-07
P50247	Ahcy	Adenosylhomocysteinase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ahcy PE=1 SV=3	0,45	2,29E-06
P70677	Casp3	Caspase-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Casp3 PE=1 SV=1	0,44	1,23E-03
P84228	H3c2	Histone H3.2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3c2 PE=1 SV=2	0,44	6,92E-03
P16110	Lgals3	Galectin-3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Lgals3 PE=1 SV=3	0,43	6,38E-05
P02301	H3-5	Histone H3.3C OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3-5 PE=3 SV=3	0,38	6,53E-07
P84244	H3-3a	Histone H3.3 OS=Mus musculus OX=10090 GN=H3-3a PE=1 SV=2	0,38	6,53E-07
Q9D3D0	Ttpal	Alpha-tocopherol transfer protein-like OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ttpal PE=1 SV=3	0,38	6,53E-07
O88844	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic OS=Mus musculus OX=10090 GN=Idh1 PE=1 SV=2	0,35	4,62E-06
Q62433	Ndr1	Protein NDRG1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Ndr1 PE=1 SV=1	0,34	4,79E-05
P45376	Akr1b1	Aldo-keto reductase family 1 member B1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Akr1b1 PE=1 SV=3	0,34	8,19E-06
Q9R0P3	Esd	S-formylglutathione hydrolase OS=Mus musculus OX=10090 GN=Esd PE=1 SV=1	0,34	6,36E-05
P08551	Nefl	Neurofilament light polypeptide OS=Mus musculus OX=10090 GN=Nefl PE=1 SV=5	0,33	6,10E-03
O08529	Capn2	Calpain-2 catalytic subunit OS=Mus musculus OX=10090 GN=Capn2 PE=1 SV=4	0,29	1,30E-07
Q3UU41	Scimp	SLP adapter and CSK-interacting membrane protein OS=Mus musculus OX=10090 GN=Scimp PE=1 SV=1	0,29	1,70E-01
Q9CS42	Prps2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Prps2 PE=1 SV=4	0,23	2,74E-05

Q99JR8	Smardc2	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Smardc2 PE=1 SV=2	0,22	5,28E-04
P47757	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta OS=Mus musculus OX=10090 GN=Capzb PE=1 SV=3	0,14	2,13E-02
P14069	S100a6	Protein S100-A6 OS=Mus musculus OX=10090 GN=S100a6 PE=1 SV=3	0,03	2,42E-02

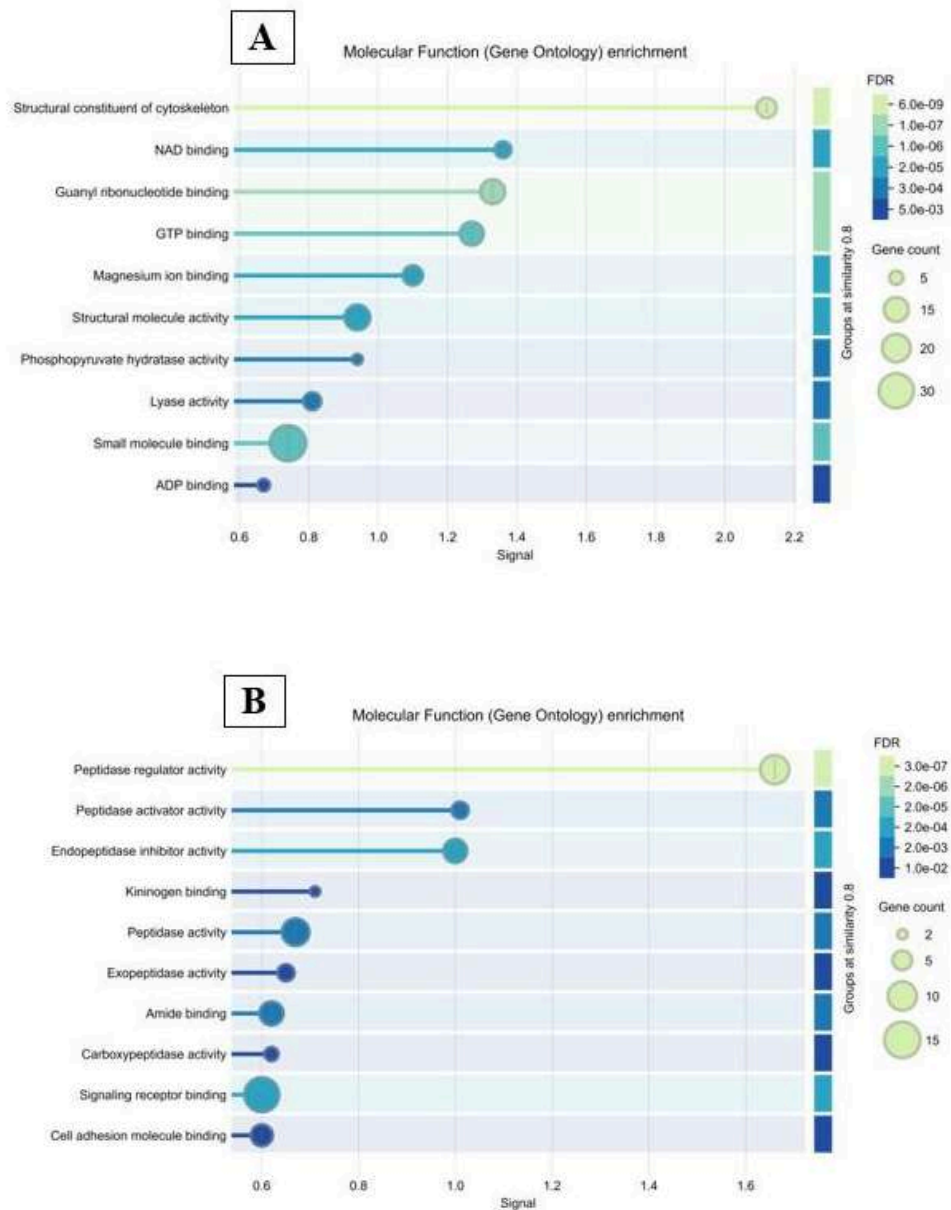
APÊNDICE D – Figura 9

Análise de Gene Ontology feita na plataforma String mostrando os 10 processos biológicos mais enriquecidos com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA- Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.



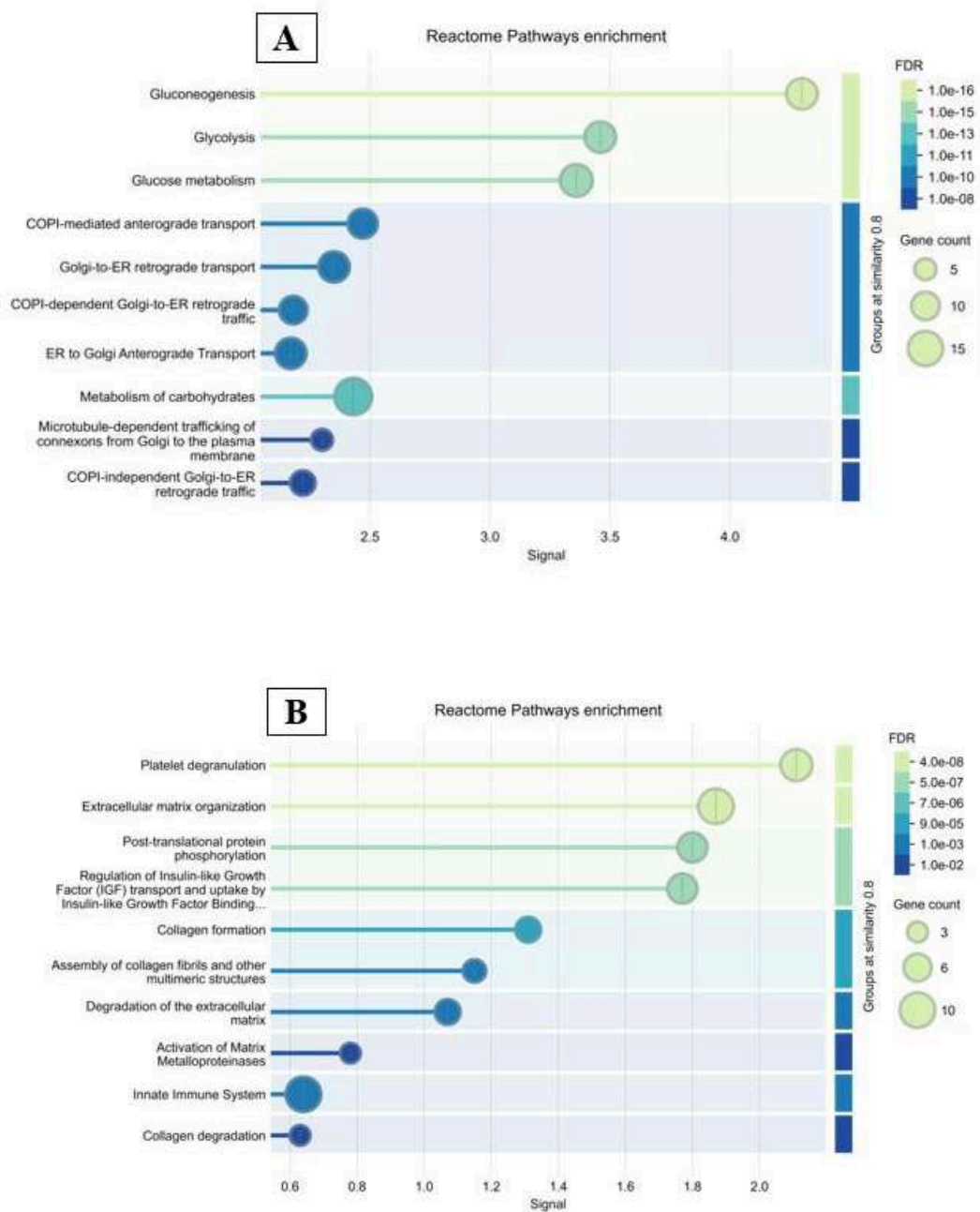
APÊNDICE E – Figura 10

Análise de Gene Ontology feita na plataforma String (<https://string-db.org/>) mostrando as 10 funções moleculares mais enriquecidas com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.



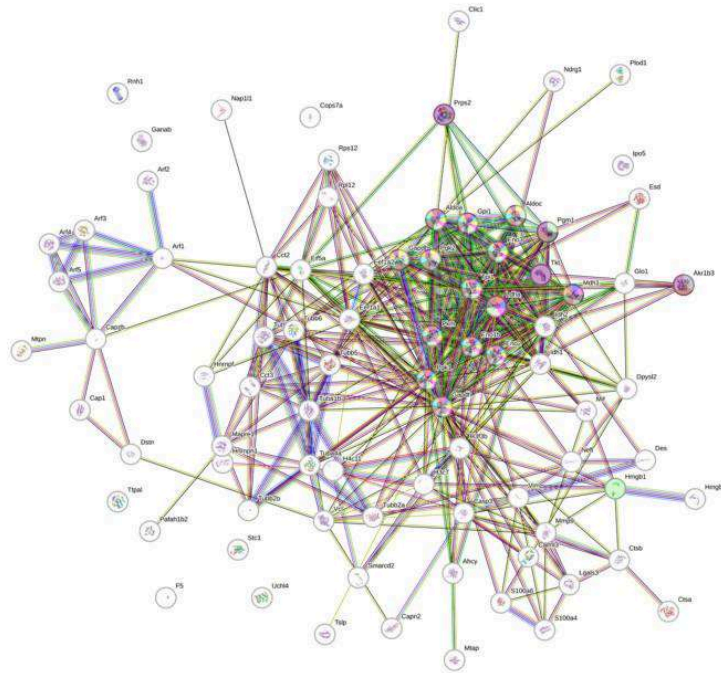
APÊNDICE F – Figura 11

Análise de Gene Ontology feita na plataforma String (<https://string-db.org/>) mostrando as 10 vias de sinalização do Reactome mais enriquecidas com as proteínas secretadas que apresentaram abundância diminuída (A) ou aumentada (B) em 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.



APÊNDICE G – Figura 12

Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente diminuída no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.



Network Stats

number of nodes: 85
number of edges: 408
average node degree: 9.6
avg. local clustering coefficient: 0.608

expected number of edges: 123
PPI enrichment p-value: < 1.0e-16

your network has significantly more interactions than expected (what does that mean?)

Functional enrichments in your network

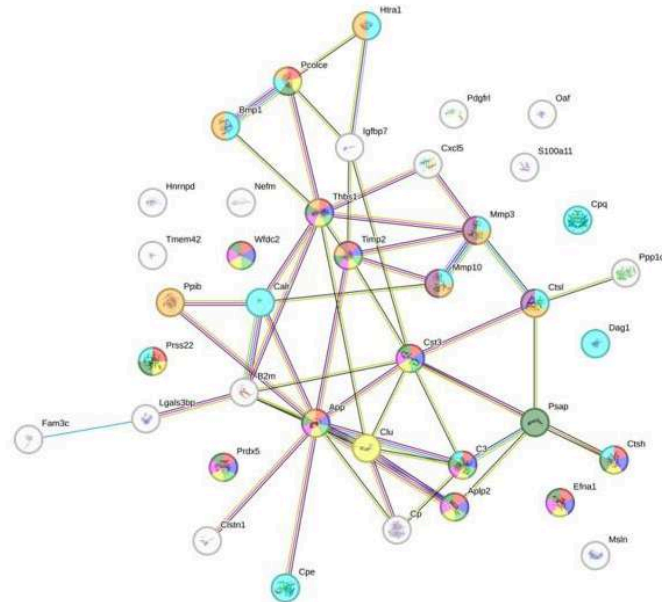
[explain columns](#)

Biological Process (Gene Ontology)					
GO-term	description	count in network	strength	signal	false discovery rate
GO:0006007	Glucose catabolic process	10 of 23	2.05	3.74	7.57e-14
GO:0019674	NAD metabolic process	11 of 32	1.95	3.7	4.90e-14
GO:0061621	Canonical glycolysis	9 of 17	2.13	3.63	3.34e-13
GO:0006096	Glycolytic process	12 of 48	1.81	3.56	4.90e-14
GO:0006734	NADH metabolic process	11 of 42	1.83	3.48	1.31e-13
GO:0006090	Pyruvate metabolic process	13 of 73	1.66	3.36	4.90e-14
GO:0016052	Carbohydrate catabolic process	15 of 110	1.54	3.24	1.88e-14
GO:0006006	Glucose metabolic process	15 of 129	1.48	3.04	4.90e-14
GO:0019319	Hexose biosynthetic process	10 of 48	1.73	2.93	1.17e-11
GO:0019318	Hexose metabolic process	16 of 167	1.39	2.88	4.90e-14

Reactome Pathways					
pathway	description	count in network	strength	signal	false discovery rate
MMU-70263	Gluconeogenesis	12 of 33	1.97	4.3	2.23e-16
MMU-70171	Glycolysis	12 of 60	1.71	3.46	3.66e-14
MMU-70326	Glucose metabolism	13 of 79	1.63	3.36	2.51e-14
MMU-6807878	COPI-mediated anterograde transport	11 of 95	1.47	2.47	7.53e-11
MMU-71387	Metabolism of carbohydrates	17 of 262	1.22	2.43	2.28e-13

APÊNDICE H – Figura 13

Rede de interações proteína-proteína com as proteínas que apresentaram diferença de abundância significativamente aumentadas no secretoma da 4T1 shRNA-Gal-3 em relação a 4T1 shRNA-SCRB.



Network Stats

number of nodes: 39

number of edges: 52

average node degree: 2.67

avg. local clustering coefficient: 0.378

expected number of edges: 9

PPI enrichment p-value: < 1.0e-16

your network has significantly more interactions than expected (what does that mean?)

Functional enrichments in your network

explain column

Biological Process (Gene Ontology)

GO-term	description	count in network	strength	signal	false discovery rate
GO:0052547	Regulation of peptidase activity	12 of 513	1.12	1.35	1.11e-06
GO:0052548	Regulation of endopeptidase activity	10 of 481	1.07	1.05	5.54e-05
GO:0010951	Negative regulation of endopeptidase activity	8 of 299	1.18	1.05	0.00015
GO:0030162	Regulation of proteolysis	13 of 826	0.95	1.03	9.03e-06
GO:0045861	Negative regulation of proteolysis	9 of 406	1.09	1.01	0.00012
GO:0051336	Regulation of hydrolase activity	13 of 1079	0.83	0.8	0.00011
GO:0048260	Positive regulation of receptor-mediated endocytosis	4 of 67	1.52	0.76	0.0068
GO:1905894	Regulation of cellular response to tunicamycin	2 of 2	2.75	0.71	0.0140
GO:1905891	Regulation of cellular response to thapsigargin	2 of 2	2.75	0.71	0.0140
GO:1902993	Positive regulation of amyloid precursor protein catabolic process	3 of 26	1.81	0.68	0.0140
GO:0006508	Proteolysis	13 of 1296	0.75	0.67	0.00044

Reactome Pathways

pathway	description	count in network	strength	signal	false discovery rate
MMU-1474244	Extracellular matrix organization	10 of 247	1.36	1.9	3.32e-08
MMU-8957275	Post-translational protein phosphorylation	7 of 115	1.53	1.76	1.57e-06
MMU-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake	7 of 121	1.51	1.75	1.57e-06
MMU-114608	Platelet degranulation	7 of 121	1.51	1.75	1.57e-06
MMU-1474290	Collagen formation	5 of 77	1.56	1.33	8.87e-05
MMU-2022090	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	4 of 48	1.67	1.17	0.00041
MMU-1474228	Degradation of the extracellular matrix	5 of 109	1.41	1.09	0.00037
MMU-1592389	Activation of Matrix Metalloproteinases	3 of 35	1.68	0.81	0.0055
MMU-168249	Innate Immune System	10 of 945	0.77	0.66	0.00080
MMU-1442490	Collagen degradation	3 of 55	1.48	0.65	0.0141