



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**CARCINOMA DUCTAL INVASIVO MAMÁRIO ESPORÁDICO: UMA
ABORDAGEM HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA**

MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO
ORIENTADOR: PROF.DR.EDUARDO BELTRÃO

Recife, 2009.

MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO

**CARCINOMA DUCTAL INVASIVO MAMÁRIO ESPORÁDICO: UMA
ABORDAGEM HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Fisiologia
pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Recife, 2009.

Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo

Carcinoma ductal invasivo mamário esporádico: uma abordagem histoquímica e imunohistoquímica/ Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego. – Recife: O Autor, 2009

53 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia

1. Histoquímica com lectinas. 2. Carcinoma ductal invasivo. 3. Neoplasia mamária. 4. Proteína p53 | Título.

577.1

CDU (2.ed.)

UFPE

572

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 68

ÍNDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL	10
1.2 A MAMA E O CÂNCER DE MAMA	12
1.3 LECTINAS E SUA APLICAÇÃO NA HSTOQUÍMICA	16
1.4 p53 E SUA APLICAÇÃO COMO MARCADOR IMUNOHISTOQUÍMICO	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFCOS	22
3 ARTIGO CENTÍFICO	23
4 CONCLUSÕES	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO I	

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem devo tudo na minha vida.

Aos meus pais, Moacir e Fernanda e as minhas irmãs Andressa e Alessandra, que a cada dia despertam e ressaltam o que há de melhor em mim enquanto ser humano, e a todos os demais da minha família, eternos encorajadores.

Ao Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão orientador sempre presente e incentivador. Obrigado por acreditar em mim nesses cinco anos de jornada científica.

A todos do grupo Biomarcadores no Câncer, minha família laboratorial.

Minha gratidão a Carmelita Cavalcanti, Luiz Alves, Carolina Fonseca, Rossil Hassan, Mário Ribeiro, Tereza Cartaxo e Alexandre Alves, pois sem a ajuda de vocês não teria chegado aqui.

A Marina Ferraz Cordeiro, primordial para realização dessa dissertação, IC dedicada e responsável. Obrigado por toda ajuda e também pelas risadas.

A todos os meus amigos de todas as horas e de toda a vida, Cleviton Monteiro, Victor Hugo, Eduardo Lundgren, Marcelle Mota, Gabriela Souto, Paula Hirakawa, Amanda Pessoa, Mirella Soares, Petra Barros, Clefersson Ferreira, Jofre Neto, vocês são essenciais. Bem como a família “dos Fantinis” (Dona Dora, André, Tobias e Michele) pelos momentos inesquecíveis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Capacidade de migração de células neoplásicas malignas como indicação do grau de malignidade tumoral (Fuster e Esko, 2005) 08

Figura 2: Número de artigos científicos e patentes utilizando lectinas em métodos de diagnóstico entre 1986 e 2006 (Mullican *et al*, 2007) 14

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: Lectin histochemistry of invasive ductal carcinoma. a) Con A staining ductal cells in poor-differentiated (white arrow) but not in well-differentiated (black arrow) tumours in the same biopsy (100x), b) PNA staining atypical mitosis (arrows) (200x), c) Heterogeneous staining pattern of UEA-I was observed in cytoplasm and plasmatic membrane (200x). 28-30

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Estimativa para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres (INCA, 2006).	12
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1: Clinical and histopatological characteristics of patents used on this study.	27
Table 2: Lectin histochemistry of neoplastic (IDC) and normal tissues of breast.	31

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente e a maior causa de morte de câncer em mulheres no mundo. Dentre as várias neoplasias que acometem esse órgão o carcinoma ductal invasivo (CDI) representa de 65% a 80% de todos os carcinomas, o qual apresenta grande heterogeneidade fenotípica e genotípica. Por causa dessa heterogeneidade a procura por biomarcadores das neoplasias mamárias vem aumentando nos últimos anos. Nesse sentido lectinas, (glico)proteínas reconhecedoras de carboidratos, vem sendo utilizadas como tradutoras de glicocódigos e biomarcadores de várias neoplasias. Esse trabalho objetivou analisar o perfil de carboidratos do CDI através da histoquímica com lectinas e correlacionar essa expressão com parâmetros clínicos e histopatológicos (idade, tamanho do tumor, variante histológica e expressão de p53). Oitenta e oito biópsias de CDI e 20 biópsias de mastoplastia redutora e bordas livres de tumor, utilizadas como controles normais foram obtidas no Hospital das Clínicas da UFPE. Para a histoquímica com lectinas, cortes de 4µm foram tratados com tripsina 0,1%, metanol-peróxido de hidrogênio 0,3% e incubadas com as lectinas conjugadas a peroxidase (*horseradish peroxidase* – HRP), Concanavalin A, Con A-HRP, *Ulex europeus* I, UEA-I-HRP e Peanut Agglutinin, PNA-HRP, específicas para glicose/manose, L-fucose e D-galactose, respectivamente. A imunohistoquímica para o p53 foi realizada através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ambas as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB)-H₂O₂, contra-coradas com hematoxilina e avaliadas em microscopia óptica. Houve uma associação entre a marcação das lectinas, Con A (p<0,001), PNA (p<0,001) e UEA-I (p<0,001), nos dois grupos de estudo, normal e CDI. A prevalência da positividade foi significativamente maior no grupo com câncer. A proteína p53 mutante foi detectada em 34,1% dos casos. Morfologicamente PNA reconheceu mitoses atípicas e, UEA-I e Con A endotélio vascular e todas as lectinas marcaram as células neoplásicas. Não houve correlação significativa entre a marcação das lectinas e os parâmetros clínicos e histopatológicos (p>0,005). Os resultados indicam que ocorre uma maior disponibilidade de glicose/manose, L-fucose e D-galactose no CDI, sugerindo a utilização das lectinas UEA-I, PNA e ConA como ferramentas histopatológicas na diferenciação dos tecidos normais e portadores dessa malignidade.

Palavras-chave: histoquímica com lectinas, carcinoma ductal invasivo, p53.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasia and the main cause of cancer death in women worldwide. Among the several types of mammary gland neoplasia Invasive Ductal Carcinoma (IDC) represents 65% to 80% of all carcinomas. The major problem concerning this neoplasia is the great genotypic and phenotypic heterogeneity. This feature explains the increasing search for biomarkers of breast cancer in recent years. Among these probes lectins, (glycol)protein that recognizes carbohydrates, have been used as decipherers of cell glycocodes and biomarkers in cancer. This study aimed to evaluate the carbohydrate profile in IDC by lectin histochemistry and to correlate it to clinical and histopathological parameters such as age, tumor size, histological variant and p53 expression. Eighty-eight biopsies of IDC, and 20 biopsies of reductional mastoplasty were obtained at the Clinic Hospital of the Federal University of the State of Pernambuco. Sixty-eight IDC free borders were used as normal controls besides the reductional mastoplasty. For lectin histochemistry tissue sections (4µm) were treated with trypsin (0.1%), methanol-hydrogen peroxide (0.3%) and then incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated lectins (Concanavalin A, Con A-HRP, *Ulex Europeans* I, UEA-I-HRP, Peanut Agglutinin, PNA-HRP; specific for glucose/mannose, D-galactose and L-fucose respectively. p53 immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase technique. Both reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂, counter-stained with haematoxylin and evaluated on optical microscopy. There is a significant association between lectins Con A ($p<0.001$), PNA ($p<0.001$) and UEA-I ($p<0.001$) in the two study groups, normal and IDC. The prevalence of positivity was significantly higher in the group of cancer. Mutant protein of p53 was detected in 34,1% of IDC biopsies. Morphologically PNA recognized atypical mitosis and Con A and UEA-I vascular endothelium. All lectins of this study recognize neoplastic cells. There is no association with lectins and clinical parameters ($p>0.005$). Results indicated that there is a higher disponibility of glucose/mannose, L-fucose and D-galactose residues in IDC when compared to normal tissue indicating these lectins as biomarkers for this malignancy.

Key-words: Lectin histochemistry, Invasive Ductal Carcinoma, p53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL

O câncer, segundo a Sociedade Americana do Câncer (2008), é definido por um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais. É uma das principais causas de morte mundial, geralmente excedido apenas por doenças cardiovasculares, sendo uma doença genética que afeta uma em cada três pessoas no planeta (De Meija *et al.*, 2003). O grau de malignidade do câncer está relacionado à sua habilidade em desorganizar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras de tecidos adjacentes e metastizar para órgãos distantes (Figura 1).

Na carcinogênese ocorrem mudanças na expressão de proteínas celulares que levam à alterações nas vias de sinalização induzindo, frequentemente, mudanças no microambiente tumoral, causando inflamação e resultando em mudança no perfil das proteínas teciduais que podem ser secretadas (Kopf e Zharhary, 2007). A carcinogênese inicia-se a partir de uma alteração no DNA celular ou da ativação anormal de genes presentes em células saudáveis. Tais genes coordenam a proliferação, a diferenciação, a morte por apoptose e outras funções celulares primordiais. A expressão amplificada de proteínas reguladas por tais genes pode determinar a progressão de alterações celulares levando aos estados neoplásicos malignos (Conde *et al.*, 2005).

No que se refere às funções bioquímicas, as moléculas de adesão e vias de transdução dos sinais para o crescimento tumoral são alterados durante a progressão tumoral. As proteínas normais codificadas pelos proto-oncogenes (genes que regulam a proliferação celular) desempenham funções iniciais nas células durante o desenvolvimento das neoplasias. Dentre estas moléculas, destacam-se os fatores de crescimento, proteínas envolvidas na recepção e transdução de sinais localizados na superfície celular (Guo *et al.*, 2006).

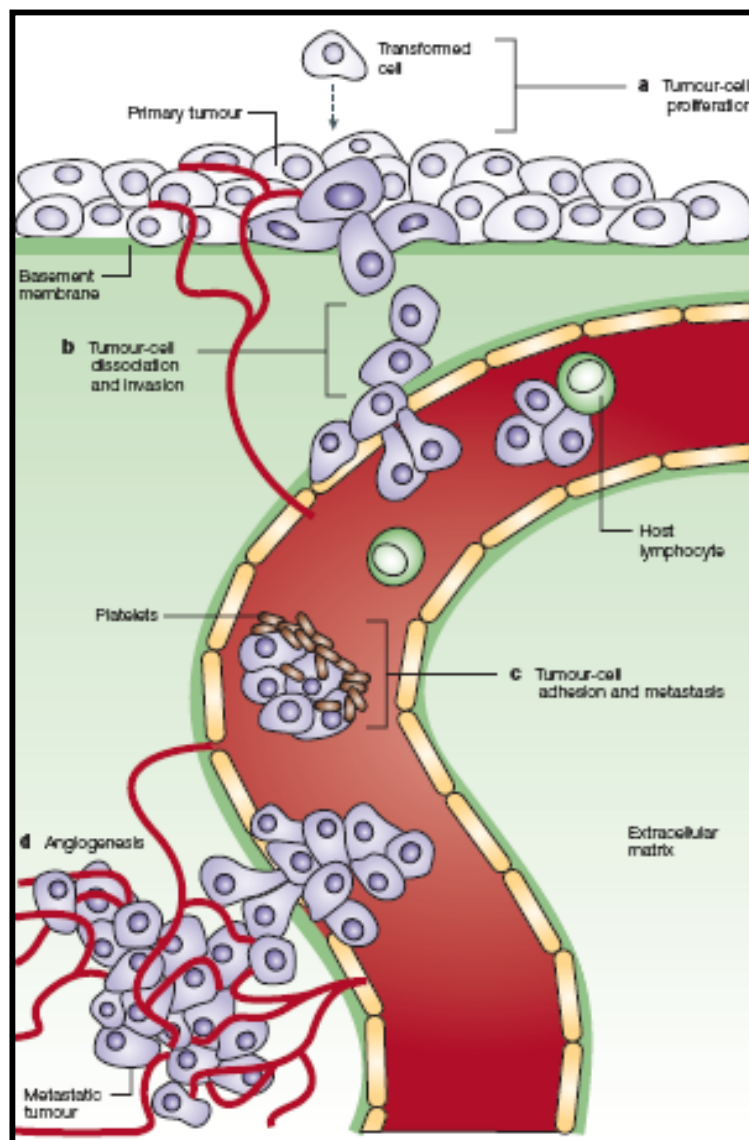


Figura 1: Capacidade de migração de células neoplásicas malignas como indicação do grau de malignidade tumoral. (Fusker e Esko, 2005)

Os diferentes tipos de carboidratos na superfície celular apresentam uma importante função no controle de vários processos fisiológicos e patobioquímicos no organismo (Phipps *et al.*, 2005). Mudanças quantitativas e/ou qualitativas nos componentes lipídicos e protéicos da célula e organelas celulares também são evidentes durante o desenvolvimento dos processos patológicos (Astoul *et al.*, 2000).

O mecanismo de reconhecimento molecular na superfície da célula, o que a torna capaz de reconhecer células semelhantes e assim interagir com as mesmas mantendo a homeostase, é afetado quando células normais sofrem desdiferenciação. O resultado é um crescimento e divisão descontrolados (Shekhar *et al.*, 2004). Estudos utilizando tumores realizados por Hirschfeld & Thonsen na década de 30 foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas nas células tumorais, o que foi posteriormente confirmado como padrões de glicosilação aberrantes associados ao tumor (Dabelsteen *et al.*, 1992).

Com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais e o avanço das pesquisas com a histoquímica com lectinas, descobriram-se vários epítomos "tumor-específicos" dentre os quais carboidratos. Correlações significativas entre certos tipos de glicosilação alterada e o prognóstico de tumores experimentais em animais e tumores humanos aumentam o interesse sobre essas mudanças bioquímicas específicas (Beltrão *et al.*, 2001; Melo-Junior *et al.*, 2006).

1.2 A MAMA E O CÂNCER DE MAMA

A mama é um apêndice cutâneo modificado que descansa bilateralmente sobre o músculo peitoral na parte superior anterior da parede torácica. A mama feminina tem entre 6 e 10 sistemas ductais entrelaçados e sustentados por um estroma fibroso denso e adiposo. Cada sistema ductal se origina do mamilo e se ramifica sucessivamente até originar a unidade terminal ducto-lobular. Essa unidade terminal é formada por pequenos ácinos que se originam de um único terminal ductal, cada grupamento de ácinos compreende um único lóbulo que é sustentado por um tecido conjuntivo especializado, hormonalmente responsivo, denominado estroma intralobular (Yoder *et al.*, 2007).

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres do mundo inteiro apresentando-se como uma das doenças com a maior heterogeneidade genotípica, fenotípica e clínica (Rakha *et al.*, 2008). Essa heterogeneidade torna-se explícita quando indivíduos com o mesmo estágio da doença e diagnósticos patológicos semelhantes podem ter cursos clínicos muito diferentes (Lajos, 2008). Sabe-se que o tecido mamário normal é formado por vários grupos celulares, o grupo de células tronco multipotente indiferenciadas, caracterizadas pela capacidade de diferenciação em inúmeras linhagens

celulares e as células progenitoras mamárias, um grupo de células derivadas de células tronco com capacidade limitada de diferenciação. No final do desenvolvimento essa linhagem celular se diferencia nas células mioepitelial, ductal e alveolar (Wicha *et al.*, 2006).

A partir desses dados surgem duas hipóteses para carcinogênese mamária. O modelo histoclástico propõe que inicialmente ocorre uma transformação maligna ocasionada por mutações múltiplas em uma célula seguida de uma posterior expansão clonal. Já o modelo hierárquico ou hipótese do câncer das células tronco defende que a transformação maligna ocorre em um subconjunto normal de células tronco e progenitoras que tiveram desregulação da auto-renovação na formação de novas células (Melchor e Benitz, 2008).

O estágio final da carcinogênese, a transição do carcinoma limitado pela membrana basal dos ductos e lóbulos (carcinoma *in situ*) ao carcinoma invasivo, é o estágio menos compreendido. As funções gênicas específicas necessárias à invasão são de difícil identificação (Porter *et al.*, 2004). O desequilíbrio cromossomal ocorre com os ganhos ou perdas em múltiplos *locus*, como em lesões hiperplásicas que progridem para carcinoma ductal *in situ* até carcinoma ductal invasivo. Não obstante, as mudanças cromossômicas compartilhadas com ambos os carcinomas ductal *in situ* e adjacente ao carcinoma ductal invasivo demonstram sua relação clonal e evolucionária (Menezes *et al.*, 2006).

Ligados aos fatores genéticos, estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações determinaram que fatores de risco como idade, localização geográfica, situação socioeconômica e eventos reprodutivos (idade da menarca e da menopausa, infertilidade, gravidez e amamentação) estão associados a uma maior incidência de carcinomas de mama (Dumitresco & Cotarla, 2005).

Dentre os tumores malignos da mama, o carcinoma ductal invasivo (CDI) representa o maior grupo, constituindo cerca de 65 a 80% dos carcinomas mamários, são caracterizados pela formação tubular que invade o parênquima adjacente. Vinte por cento dos CDIs são categorizados em um subtipo específico, como tubular, medular, mucinoso, papilar e micropapilar apresentando características citológicas e histológicas únicas, porém, 80% dos CDIs não possuem subclassificação. A grande quantidade de semelhanças histológicas dos carcinomas, bem como da doença mamária proliferativa atípica, traduz-se

nas manifestações externas de dúzias ou centenas de alterações biológicas. Atualmente, nenhuma alteração genética ou funcional comum pode ser encontrada em cada tipo de câncer de mama. A maioria das alterações reportadas ocorre em somente um subconjunto de carcinomas e, em geral, em combinações altamente variáveis com outras alterações (Mirtrunen e Hirvonen, 2003) o que impulsiona os estudos em biomarcadores para esses tipos de câncer (Yoder *et al.*, 2007).

Os CDIs são graduados baseados em três características histológicas: atipia nuclear, nível de atividade mitótica, e extensão da formação tubular, cada uma dessas características recebem valores numéricos de 1 a 3 para o cálculo do grau (“score”) de Bloom-Richardson. O CDI bem-diferenciado ou grau I, possui 3 a 5 pontos, o CDI intermediário ou grau II com 6 a 7 pontos e o CDI pouco diferenciado ou grau III possui de 8 a 9 nove pontos (Bloom e Richardson, 1957).

O carcinoma ductal *In situ* (CDIS) tem uma taxa de progressão para CDI de 43%, estimada por oito estudos independentes (Leonard e Swain, 2004). Além disso um risco aumentado de recorrência de CDI foi associado ao grau de atividade nuclear moderado ou alto podendo levar a metástase (Kerlikowske *et al.*, 2003). O grau nuclear é utilizado como um determinante importante para a decisão do diagnóstico e posterior tratamento (Chapman *et al.*, 2007). A maioria dos cânceres invasivos de mama provavelmente desenvolve-se durante longos períodos de tempo e podem culminar em formas metastáticas (Dantas *et al.*, 2003). Entretanto o padrão e ritmo de metástase para o CDI é bastante imprevisível, em geral eles metastatizam para os linfonodos axilares primariamente. Subsequentemente podem surgir tumores secundários nos ossos, pulmão, e fígado; o cérebro é um local incomum correspondendo a menos de 5% dos pacientes (Meisner *et al.*, 2008).

O câncer de mama ainda pode ser classificado como esporádico ou familiar. O esporádico está geralmente associado com mutações somáticas que geram diferentes tipos moleculares com diferentes padrões clínicos. No câncer de mama familiar o portador possui uma mutação hereditária em um dos genes de susceptibilidade de câncer de mama (BRCA1 e BRCA2). Em contraste com a homogeneidade da mutação BRCA1/2 no câncer de mama familiar é observada uma heterogeneidade tanto em carcinomas familiares como esporádicos baseados nas técnicas de imunohistoquímica (Melchor *et al.*, 2008).

A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres (WHO, 2006). Tem-se observado, em alguns países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Holanda, Dinamarca e Noruega, um aumento da incidência do câncer de mama acompanhado de uma redução da mortalidade por esse câncer, o que está associado à detecção precoce por meio da introdução da mamografia para rastreamento e à oferta de tratamento adequado. Em outros países, como no caso do Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um diagnóstico e instituição de terapêutica adequada tardias (INCA, 2006).

As estimativas para o ano de 2008 indicavam uma ocorrência de 472.050 casos novos de câncer no Brasil segundo o INCA (2006). O tipo mais incidente no sexo feminino, com exceção do câncer de pele (não melanoma), seria o de mama (49.000 casos). Estes valores correspondem a um risco estimado de 52 novos casos a cada 100 mil mulheres acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Dados demonstraram que no Brasil, em 2006, foram informadas 36.744 internações e 2.344 mortes de mulheres por neoplasia maligna da mama (Datasus, 2007). A cada ano, cerca de 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. Dados sobre a incidência de câncer de mama por regiões e capitais apresentam-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Estimativa para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres.

Estados	Taxa bruta	Capital	Taxa bruta
Rio grande do sul	80,50	Porto Alegre	119,72
São Paulo	72,52	São Paulo	95,30
Rio de Janeiro	92,77	Rio de Janeiro	120,3
Distrito Federal	51,11	-	-
Minas Gerais	42,46	Belo Horizonte	64,97
Paraná	56,16	Curitiba	76,02
Santa Catarina	52,03	Florianópolis	62,45
Bahia	24,92	Salvador	50,87
Ceará	35,65	Fortaleza	49,64
<i>Pernambuco</i>	<i>44,82</i>	<i>Recife</i>	<i>87,90</i>

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA)/Ministério da Saúde-2006.

1.3 LECTINAS E SUA APLICAÇÃO NA HISTOQUÍMICA

A variação na expressão de carboidratos nos vários processos metabólicos, de desenvolvimento e de reconhecimento celular, possibilita o uso das lectinas como marcadores estruturais revelando a organização das superfícies celulares e mudanças durante envelhecimento e patologias (Beltrão *et al.*, 1998, 2001, 2003; Campos *et al.*, 2006; Melo-Junior *et al.*, 2006). O interesse no uso de lectinas como reagentes para diagnóstico biomédico tem aumentado significativamente no novo milênio. No entanto, os dados exatos sobre e como lectinas são aplicadas na rotina de diagnóstico tem sido ainda muito limitados. Este fato é corroborado pela presença de poucas opiniões elaboradas sobre este tema, que é atualmente restrito a um numero pequeno de artigos e publicações (Gemeiner *et al.*, 2008). Entretanto o numero de artigos sobre a utilização de lectinas em diagnóstico bem como a solicitação de patente sobre essas proteínas vem aumento consideravelmente no últimos anos como pode ser observado na Figura 1 (Mullican *et al.*, 2007).

Lectinas são uma classe de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza e que reconhecem carboidratos, livres ou ligados às superfícies celulares através de sítios de ligações a carboidratos, nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Thom *et al.*, 2007). Elas despertam as atenções a mais de 140 anos (Mitchell, 1860; Stillmark, 1888). Conforme descrito na literatura especializada (Ambrosi *et al.*, 2005; Gabius *et al.*, 2004; Sharon e Lis, 2003, 2004) essas biomoléculas percorreram um longo caminho desde a sua primeira detecção em plantas ao seu atual estágio, como moléculas de reconhecimento com excitantes funções e aplicações (Gemeiner *et al.*, 2008) como o uso da ricina (*Ricinus communis*) e a abrina (*Abriacus precatorium*) por Paul Ehrlich como modelo antigênico em estudos imunológicos já em 1890 (Sharon e Lis, 2003, 2004).

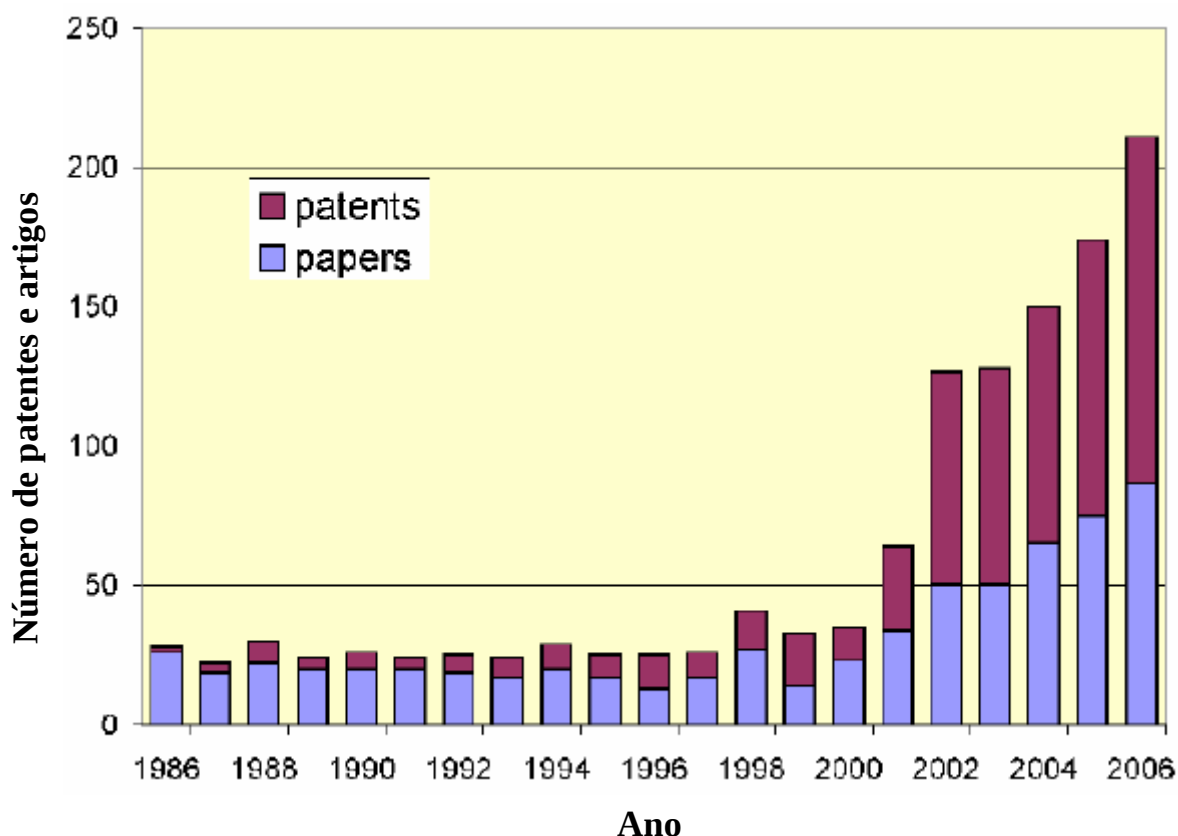


Figura 2: Número de artigos científicos e patentes utilizando lectinas em métodos de diagnóstico entre 1986 e 2006 (Mullican *et al.*, 2007).

Atualmente, o número de lectinas identificadas e caracterizadas é estimado em aproximadamente 1000. Sharon (2007) em seu panorama de evolução conclui que o reconhecimento por lectinas em tecidos animais é sem dúvida, um dos principais métodos desenvolvidos pela glicobiologia durante a última metade do século XX. É previsto que o tempo de vasta aplicação de lectinas como ferramentas de diagnóstico e terapêutica ainda esta por vir (Ambrosi *et al.*, 2005; Gabius *et al.*, 2004).

Diferenças quantitativas e qualitativas entre a lectina e seu carboidrato específico foram observadas em numerosas glicoproteínas. Assim, lectinas são marcadores celulares para carboidratos e, em um modelo simplificado conhecido como mecanismo de Fischer de "chave-e-fechadura" (Fischer, 1894), elas representam uma chave, ou "o molho de chaves" (Hardy, 1997) para o glicocódigo (Ambrosi *et al.*, 2005; Gabius *et al.*, 2002, 2004). Em outras palavras, enquanto os açúcares estejam aptos a manter as informações e funções

biológicas, as lectinas são capazes de decifrar seu código, sendo, portanto, "decifradoras" do glicocódigo (Kuno *et al.*, 2005).

Lectinas já foram identificadas em células animais, sendo algumas solúveis no citosol, nucleoplasma ou líquidos de corpo, e muitas outras presentes na membrana plasmática. As lectinas da membrana estão envolvidas tanto no transporte celular como também no reconhecimento célula-célula (Duverge, 2003). A interação lectina-carboidrato ocorre através de uma porção limitada da molécula protéica. Este segmento estrutural denominado domínio de reconhecimento ao carboidrato (do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*) consiste em um domínio globular com uma alta conservação de resíduos de aminoácidos (Loris *et al.*, 1998; Santos, 2001).

Em histoquímica as lectinas, conjugadas à peroxidase, isotiocianato de fluoresceína, éster de acridina e criptato, têm sido intensamente utilizadas para caracterização de superfícies celulares como sondas na detecção de mudanças na glicosilação e na expressão de carboidratos, que ocorrem durante a embriogênese, crescimento e doença (Campos *et al.*, 2006). Nesta última as lectinas têm sido empregadas no auxílio de diagnósticos histopatológicos, para o mapeamento dos estágios de diferenciação e desdiferenciação, nível de malignidade e capacidade de metástases em tecidos da cavidade oral (Rego *et al.*, 2005); cérebro humano (Beltrão *et al.*, 2003); mama (Beltrão *et al.*, 1998, 2001; Korourian *et al.*, 2008); pele (Melo-Junior *et al.*, 2006), pulmão (Thoma *et al.*, 2007) entre outros.

1.4 p53 E SUA APLICAÇÃO COMO MARCADOR IMUNOHISTOQUÍMICO

Os avanços nas investigações das alterações moleculares que ocorrem nas células submetidas à transformação maligna ajudam a desvendar os mecanismos da ocorrência e progressão dos tumores. Neste sentido, a identificação da expressão de moléculas específicas associadas ao processo carcinogênico tem conduzido ao conhecimento de um crescente número de marcadores moleculares que demonstram relação com as características das neoplasias malignas. Estes marcadores complementam os parâmetros clínicos e histológicos tradicionalmente utilizados para identificar o grupo dos pacientes de alto risco que possuem um curso clínico mais agressivo da doença. A caracterização de neoplasias através de marcadores moleculares específicos pode esclarecer as variações

clínicas individuais de cada paciente, ajudando em estimativas mais confiáveis sobre o prognóstico da doença e orientando as condutas terapêuticas (Schliephake, 2003).

O gene *p53* foi inicialmente concebido como um possível oncogene devido a sua capacidade de transformar fibroblastos (Lane e Crawford, 1979). As anormalidades ou a inativação do gene *p53* têm sido apontadas como os defeitos genéticos mais comuns no câncer humano (Moll *et al.*, 2001). O *p53* é um gene supressor tumoral em mamíferos, localizado em 17p13.1, que controla respostas cruciais ao estresse celular desenvolvidas pelos muitos tipos de danos ao DNA (por exemplo a radiação UV e a hipóxia) e estimulações oncogênicas, que conduzem à sua ativação (Moll *et al.*, 2001). Este gene recebe esse nome porque codifica uma proteína nuclear de 53 kd (Sirvent *et al.*, 2001), tendo sido primeiramente identificado através da associação nuclear de sua proteína com o vírus tumoral SV40 (Lane e Crawford, 1979).

A sequência gênica do gene *p53* apresenta-se altamente conservada entre as diferentes espécies, possuindo aproximadamente 20 kb, 11 exons e 393 códons. A região com propriedade de ativação da transcrição está localizada na extremidade N-terminal de seu produto gênico, proteína *p53* (Soussi e May, 1996).

A complexidade gênica deste gene aumentou recentemente, quando Bourdon e colaboradores (2005) estabeleceram que o gene humano *p53* pode codificar pelo menos nove diferentes isoformas de proteínas (*p53*, *p53β*, *p53γ*, $\Delta 133p53$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53\beta$ e $\Delta 133p53\gamma$), que podem ser originadas a partir de dois sítios distintos de transcrição, além de também serem influenciadas por promotores e trocas (“*splicins*”) alternativos. Além disso, as isoformas da proteína *p53* possuem diferentes localizações intra-celulares, sugerindo possíveis atividades biológicas específicas (Bourdon, 2007). Algumas investigações já confirmaram a detecção e a expressão anormal de algumas isoformas da proteína *p53* na leucemia mielóide aguda (Anensen *et al.*, 2006), em neuroblastomas (Goldschneider *et al.*, 2006) e nos tumores de cabeça e pescoço (Boldrup *et al.*, 2007).

O gene *p53* controla o ciclo celular de células normais, regulando pelo menos dois estágios na resposta às injúrias ao DNA: as transições G1/S e G2/M (Kastan *et al.*, 1992). Quando ocorrem danos ao DNA, a ativação do *p53* pode estimular a parada do ciclo celular nestes estágios, a apoptose, ou, em algumas circunstâncias, a senescência, prevenindo por

meio disso a formação de tumores (Hibi *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2001). O retardo na progressão do ciclo celular permite que o DNA lesado seja reparado antes da célula entrar na fase S ou na fase M. No entanto, se o dano ao DNA for muito extenso, dificultando o reparo, a célula entra no processo de apoptose (Fisher, 2001). Por outro lado, nos casos de inativação do *p53*, as células podem progredir para a fase S sem reparo do DNA danificado, resultando em instabilidade genômica e permitindo o acúmulo de novas mutações (Moll *et al.*, 2001).

A função do *p53* no controle do ciclo celular na fase G2 foi demonstrada por Shen e colaboradores (1996), investigando células em diferentes fases de seu ciclo, antes da ativação de *p53*. A análise por citometria de fluxo revelou, nesses casos, que a indução deste gene em células sincronizadas na fase G1/S fazia com que estas parassem na fase G2. Portanto, a forma selvagem de *p53* pode bloquear a progressão do ciclo celular tanto na fase G1 quanto em G2, dependendo do momento em que ocorre sua superexpressão.

De acordo com Borresen-Dale (2003), a perda das funções do *p53* tem como consequência a replicação de um molde de DNA anormal, o surgimento de células tumorais com mutações em *p53* que tenham também uma alta frequência de mutações em outros genes, além da expressão alterada de genes alvos do *p53*. A inibição da síntese de DNA durante a indução de genes responsáveis pelo reparo do DNA pode ser explicada pelo conceito de que o *p53* é o guardião molecular do genoma (Kannan *et al.*, 2000).

A proteína *p53* selvagem tem uma meia-vida curta, de aproximadamente seis a 20 minutos, enquanto sua forma alterada tem meia vida de até seis horas. A eventual detecção de uma pequena quantidade da forma selvagem de *p53* é o resultado de um processo dinâmico entre expressão, estabilização e degradação desta proteína. Mediadores positivos e negativos regulam precisamente a estabilidade e a atividade da *p53*. A estabilização da proteína *p53*, com aumento da sua expressão, pode ocorrer em resposta a vários agentes que causam dano ao DNA, acarretando mudanças conformacionais, ativação e acúmulo nuclear dessa proteína (Hupp *et al.*, 2000). A alta concentração desta proteína nas células tumorais ocorre devido à formação de um complexo com outros tipos de proteínas, como o produto do *MDM2* e proteínas de choque térmico, essa interação aumenta a meia-vida da *p53* em muitas horas, permitindo a detecção de seu acúmulo nuclear (Finlay *et al.*, 1988).

Em condições normais, a detecção da p53 selvagem por Imunohistoquímica (IHQ) pode ocorrer em algumas células em resposta ao dano no DNA (Borresen-Dale, 2003). Segundo Geisler e colaboradores (2001), a correlação entre o acúmulo nuclear de p53 medido IHQ e mutações no gene *p53* detectadas por sequenciamento é menor que 75%. A razão para isso é que nem todas as mutações produzem uma proteína estável e outras podem resultar em proteínas defeituosas (truncadas) que podem não ser detectadas por IHQ. Outras vezes, no entanto, proteínas não mutadas, porém ligadas a outra proteína celular (formando compostos inativos), podem dar um resultado positivo somente na IHQ. Muitos estudos relatam atualmente a correlação entre a expressão da proteína p53 com o câncer de mama, em modelos experimentais (Debies *et al*, 2008), como possível alvo para terapias do câncer (Vazquez *et al*, 2008), como valor prognóstico (Von Minckwitz, 2008) e como marcador imunohistoquímico da evolução de carcinoma *in situ* para o carcinoma invasivo (Menezes *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar o perfil imunohistoquímico para p53 e de glicoconjugados de biópsias mamárias de pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo (CDI).

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de p53 de pacientes portadoras de CDI através da imunohistoquímica;
- Analisar o perfil de L-fucose, D-galactose e glicose/manose das biópsias utilizando a histoquímica com lectinas;
- Correlacionar os achados histoquímicos, imunohistoquímicos com dados clínicos (idade e tamanho do tumor) e histopatológicos (invasão linfonodal e variante histológica).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

EXPLORING THE GLYCOCODE OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA WITH LECTIN HISTOCHEMISTRY

LECTIN HISTOCHEMISTRY OF INVASIVE DUCTAL CARCINOMA

Original paper

Moacyr J. B. M. Rêgo¹; Marina F. Cordeiro¹; Rebeca M.V.A. Lima¹; Carmelita L.B. Cavalacanti¹; Eduardo I. C. Beltrão^{1,2*}.

1 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Brazil;

2 Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

* Correspondence to Dr. Eduardo Beltrão. Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami – LIKA/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, Recife, Pernambuco, Brasil. 50670-490.

E-mail: ebeltrao@hotmail.com

(a ser submetido à Pathology & Oncology Research)

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasia as well as the main cause of death from cancer among women and invasive ductal carcinoma represents the largest group, of breast carcinomas. The major problems of these lesions is the great genotypic and phenotypic heterogeneity. Carbohydrates mediate cell-cell adhesion and differentiation/desdifferentiation of many tumours. This work aimed to evaluate lectins as biomarkers and decipherers of glyocode providing useful information for diagnoses providing useful information for pathologists. Eighty-eight biopsies of patients diagnosed as invasive ductal carcinoma were evaluated with lectin histochemistry using PNA, UEA-I and Con A, specific to D-galactose $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetylgalactosamine, L-fucose and glucose/mannose, respectively, and expression of p53 using immunohistochemistry. Lectins staining was compared to clinical and histopathologic parameters (tumour size, histological grade, lymph node invasion and age at biopsy). Results indicated a significant association between Con A ($p<0,001$), PNA ($p<0,001$) and UEA-I ($p<0,001$) and the two groups studied (normal and IDC tissues) where their staining was higher in cancer group. However only 34,1% of biopsies were positive for p53. Morphologically PNA also recognized atypical mitosis and Con A recognized also vascular endothelium besides neoplastic cells. Results suggest that the expression of carbohydrates were up-regulated in IDC tissues and lectin histochemistry is indicated as auxiliary tool for diagnoses of IDC.

Key words: invasive ductal carcinoma, glyocode, lectin histochemistry, p53

ABBREVIATIONS LIST

Con A	<i>Canavalia ensiformes</i> agglutinin
DAB	Diaminobenzidina
IDC	Invasive Ductal Carcinoma
PNA	Peanout agglutinin
UEA-I	<i>Ulex europeus</i> agglutinin
BSR	Bloom-Scarff-Richardison

INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequent neoplasia as well as the main cause of death from cancer among women. Since the 1990 there has been an increasing incidence of 0.5% per year. This growth rate allows estimating around 1.4 million new cases by 2010 (1). Among the malignant tumors of breast, invasive ductal carcinoma (IDC) represents the largest group, contributing to about 65 to 80% of breast carcinomas (2). Breast cancers are neoplasias, which present a great clinical, phenotypic and genotypic heterogeneity (3). This heterogeneity becomes explicit when patients with the same stage of disease and similar pathological diagnoses may have very different clinical courses (4).

Advances in investigations of the molecular changes occurring in cells under malignant transformation help us to understand the mechanisms of the occurrence and progression of tumors (3). The search for specific molecules associated with carcinogenic process has led to a growing number of neoplastic biomarkers which in association with clinical and traditional histological parameters have been used to identify high risk patients groups, which have a more aggressive clinical course of disease (4, 5).

Carbohydrates have an enormous potential for encoding biological information. The combination of these molecules, in glycoproteins and glycolipids, dots the outer surface of all cells and serve as cellular identification tags to the surrounding world (6). The variation in the expression of carbohydrates in many metabolic processes, such as development and cell recognition, allows the use of lectins as structural biomarkers revealing the organization of cell surfaces and changes during aging and diseases (7). Lectins are structurally diverse carbohydrate-binding (glycol)proteins of non-immune origin (8) that agglutinate cells and recognize carbohydrates in oligosaccharides and glycoconjugates (9).

Thus, lectins are natural cell-recognition probes for carbohydrates and such ability has been explored by their use as biomedical diagnostic tools in the new millennium (10) of a broad spectrum of diseases. All based on their ability to decipher the glycode on cell surface. Lectins are the key or "the bunch of keys" to the sugar code (11, 12). In other words, whilst sugars are able to carry the biological information, lectins are capable of deciphering their code, the glycode (13).

Tumour lectinology has so far shown cytochemical and histochemical differences between normal and transformed tissues such as mammary (7, 14), brain (15), lung (16) and within a single class of tumour (17). This work aimed to evaluate the use of Concanavalin A (Con A), *Ulex europeus* I (UEA-I) and Peanut agglutinin (PNA) lectins in histochemistry for the characterization of the glucose/mannose, L-fucose and D-galactose profile in the cells of tumours of breast invasive ductal carcinoma and their correlation with clinical parameters and immunohistochemistry for p53.

p53 is a tumour suppressor gene in mammals which controls key responses to cell stress caused by DNA damage and oncogene stimulation (18). This gene gets its name because it encodes a nuclear protein of 53kd that can be identified by immunohistochemistry (19).

MATERIALS E METHODS

Eighty-eight biopsies diagnosed as sporadic invasive ductal carcinoma of the breast were obtained from the Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of the State of Pernambuco – UFPE, Northeast Brazil. Patients' age and tumour characteristics were obtained from the Pathology data base at UFPE and were summarized in table 1. Twenty biopsies of reductional mastectomy and sixty-six tumour negative margins were used as normal tissue (control).

Lectin histochemistry: sections (4µm) of specimens were deparaffinized in xylene and hydrated in graded alcohol (100 - 70%). Slices were treated with a 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37°C and with a 0.3% (v/v) methanol-H₂O₂ solution for 30 min at 25°C and then incubated with lectins conjugated to horseradish peroxidase, HRP (Con A-HRP, UEA-I-HRP and PNA-HRP at 50µg/mL). All solutions were prepared with 10mM phosphate buffer solution, pH 7.2 containing NaCl 150mM (PBS). Washings between each protocol step were carried out with this buffer. Peroxidase was visualized with a solution of diaminobenzidine-H₂O₂, for 5-8 min. Tissues were counter-stained with haematoxylin and evaluated by light microscopy. Lectin binding inhibition assays were developed incubating the lectin with its corresponding specific sugars, methyl- α -D-mannoside for Con A, L-fucose for UEA-I and D-galactose for PNA (100 to 500mM) prior to tissue incubation. Following steps were as described above.

Immunohistochemistry: Sections (3µm) of specimens were deparaffinized in xylene and hydrated in graded alcohol (100 - 70%). Antigenic sites were thermally recovered in steamer with citrate buffer at pH 6.0 than incubated in methanol-hydrogen peroxide solution (1:1) for 30min and immune-assayed for p53 (1:100) with the streptavidin-biotin peroxidase (DAKO). Negative controls were carried out omitting the primary antibody (anti-p53). Any nuclear positivity was reported as positive.

Statistical analysis: SPSS 11.0 software for Windows statistical package was used and included a description of the measured variables with mean (SD) for quantitative variables and percentages for qualitative ones. The bivariate analysis of association between qualitative variables was made with chi-squared test. The comparison of the mean values of quantitative variables between groups was made with ANOVA. The significance level was set at a p value < 0.05.

RESULTS

Patient population and tumor characteristics

Table1 summarizes tumor sizes, histologic grade, p53 expretion, metastasis and age of diagnosis in breast cancer patients whose tumours were analyzed in this study. The size, measured or estimated, was further catecorizaed as 1(≤1), 2(>1 and ≤2), 3(>2 and ≤3), 4(>3 and ≤4) and 5(>4) the age of patients diagnosed with IDC ranged to 35 to 83 years with 54,3 years of age as the median

Table 1: Clinical and histopathological characteristics of patients used in this study

Factor	Category	Number	Percentage
Tumour size (cm)	1	10	11,36
	2	33	37,5
	3	14	15,9
	4	18	20,45
	5	13	14,77
Histological grade	SBR I	38	40,9
	SBR II	14	43,18
	SBR III	36	15,9
p53	Negative	58	65,9
	Positive	30	34,1
Age	Minimum	83	
	Maximum	35	
	Median	54,3	
Lymph node invasion	Yes	17	19,31
	No	71	80,68

Morphological description

In normal tissues none of lectins used recognized their specific carbohydrates in ductal cells of mammary gland. However UEA-I showed positive staining in the apical membrane of luminal cells. In IDC tissues Con A stained ductal cells with a homogeneous, diffuse and cytoplasmatic pattern (Figure 1a), few tissue samples also presented membrane staining. This lectin did not recognize inflammation area differing from stroma which was positive stained. In addition Con A recognized vascular endothelium in IDC. For PNA staining was observed in the nuclear membrane and cytoplasm. Atypical mitoses were stained by PNA (Figure 1b) while stroma and inflammation area were not. In UEA-I positive cases L-fucose residues in poor-differentiated cells were recognized (Figure 1c) and its adjacent stroma was negative. As Con A UEA-I stained vascular endothelium too.

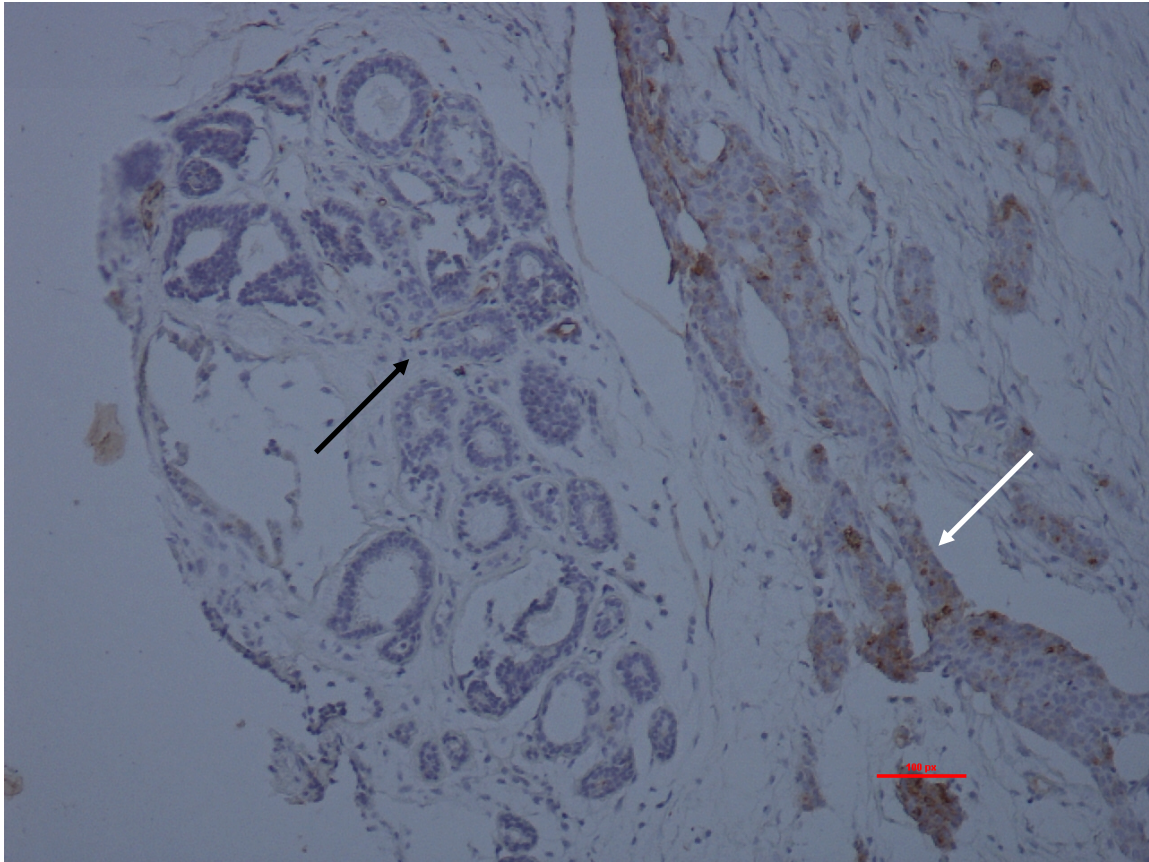


Figure 1a: Lectin histochemistry of invasive ductal carcinoma. Con A staining ductal cells in poor-differentiated (white arrow) but not in well-differentiated (black arrow) in the same biopsy (100x).

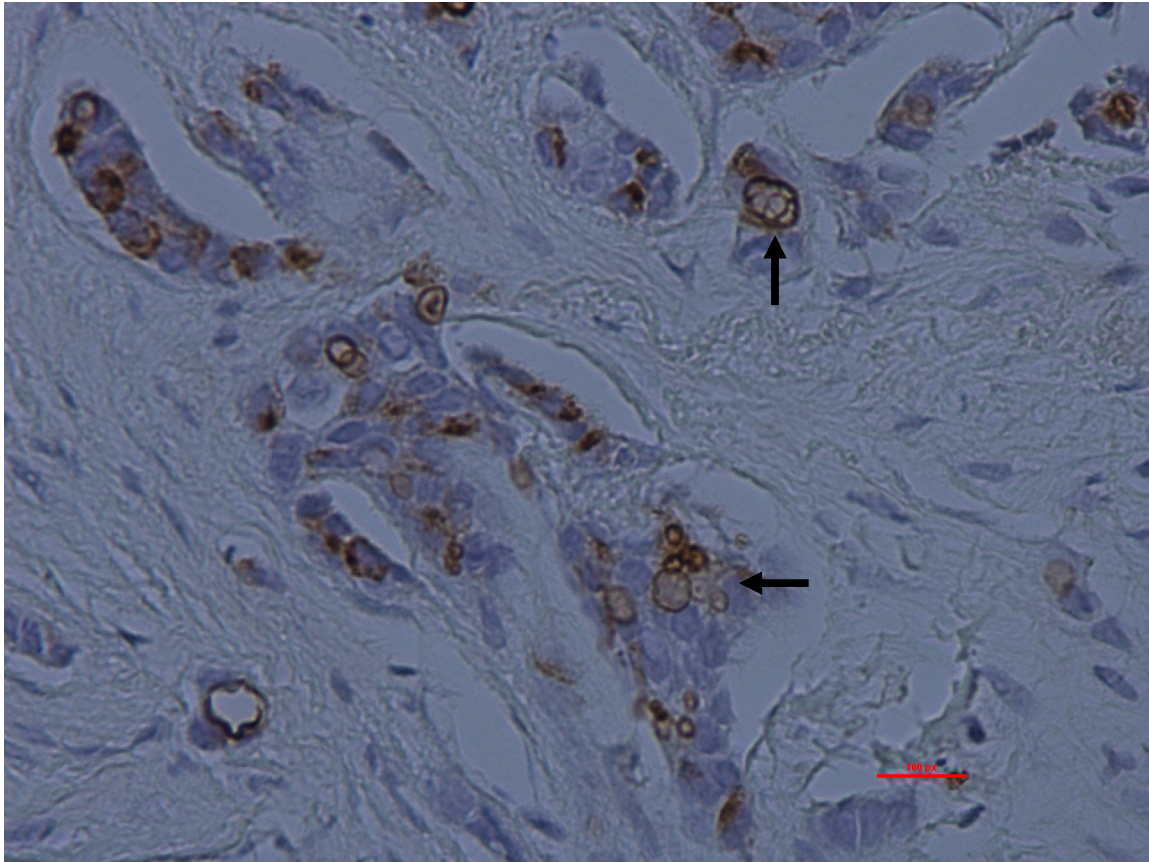


Figure 1b: Lectin histochemistry of invasive ductal carcinoma. PNA staining atypical mitosis (arrows) (200x).

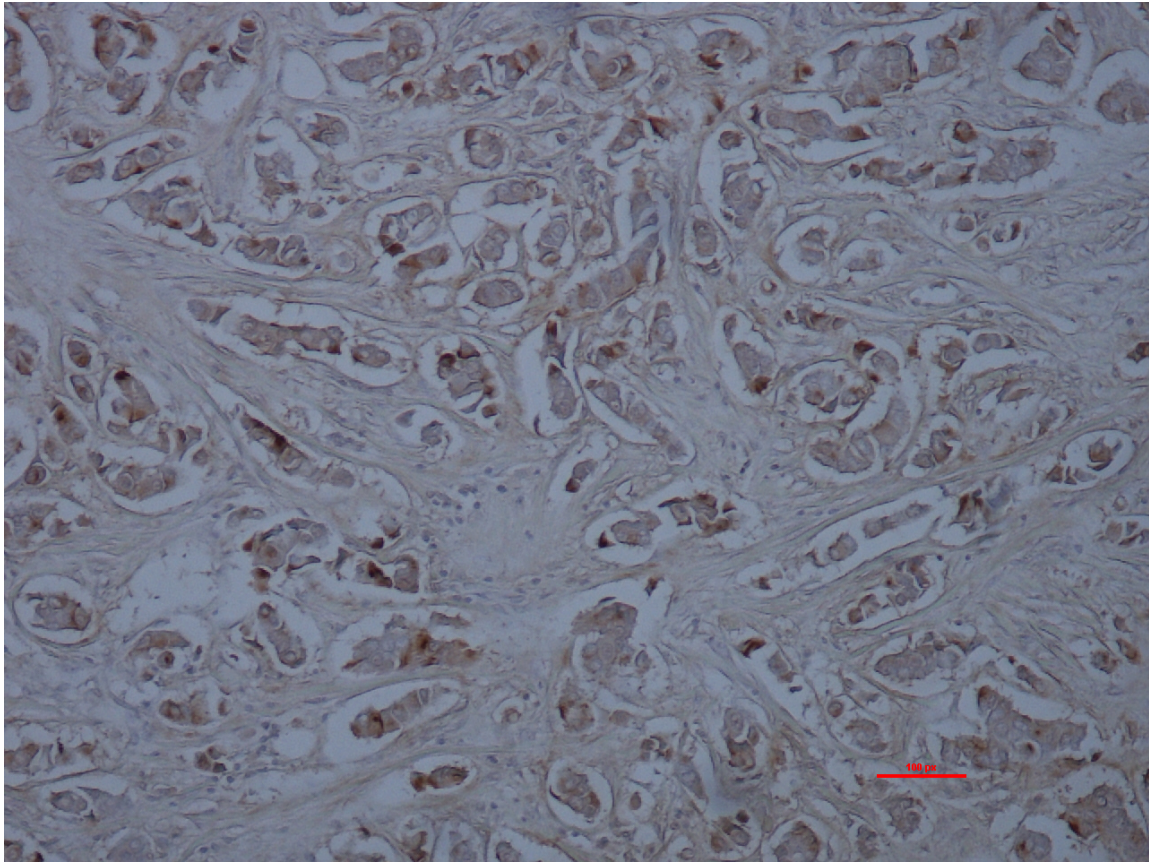


Figure 1c: Lectin histochemistry of invasive ductal carcinoma. Membrane and cytoplasmatic staining pattern of UEA-I (200x).

Statistical analysis of lectin histochemistry

In this series of patients tumours were classified in five groups Con A, PNA and UEA-I positive groups, triple negative and triple positive groups. Table 1 summarizes tumour related factors and lectin histochemistry staining evaluated in this series. Table 2 depicts the lectin histochemistry staining of neoplastic and normal breast tissues. Lectin histochemistry of neoplastic and normal tissues showed that neoplastic tissues showed a significant association with tissue malignant transformation Con A ($p < 0,001$), PNA ($p < 0,001$) and UEA-I ($p < 0,001$) when compared to their normal counterpart. Lectin staining was abolished with specific carbohydrates at 300 mM.

For the mean age at diagnosis we have found no significant differences among lectin groups. But we found that patients with triple negative lesions were significantly younger than women with triple positive (45.41 vs. 56.54; $P < 0.01$). Eight per cent of tumours were triple negative for the lectins used (Con A, PNA and UEA-I) while 29.5% were triple positive for the same lectins. We have found no significant association with lectins and age (Con A, $P = 0.539$; PNA, $P = 0.449$; UEA-I, $P = 0.881$) or p53 expression (Con A, $P = 0.541$; PNA, $P = 0.553$; UEA-I, $P = 0.234$).

Table 2: Lectin histochemistry of neoplastic (IDC) and normal tissues of breast.

Lectin	Neoplastic Tissue		Normal Tissue		<i>p</i> value
	n	%	n	%	
Con A					
Positive	67	76,1	0	0,0	
Negative	21	23,9	88	100,0	<0,001
PNA					
Positive	46	52,3	0	0,0	
Negative	42	47,7	88	100,0	<0,001
UEA-I					
Positive	51	58,0	8	9,1	
Negative	37	42,0	80	90,9	<0,001

DISCUSSION

An important area of cancer research is to search for biomarkers for a very early detection of the disease, thus avoiding the cancer spread and metastasis (20). In the post-genomic era other molecules begin to prominence in the research for biomarkers with diagnosis and prognostic value, such as carbohydrates since evidence has been gathered

that the cellular protein glycosylation pattern is influenced by several physiological changes, such as occurrence of a disease (12, 21). At that point where the genome is deciphered, the deciphering of glycode has just beginning. The versatility of these molecules to encode biological information is shown when two identical monosaccharides can link to form 11 different disaccharides (6, 22).

Our results shown a significant expression of D-galactose $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetylgalactosamine, L-fucose and Glucose/Branched Mannose in IDC patients. This changes in the expression of carbohydrates and less than or greater expression of these may be involved with the emergence of tumor metastases and angiogenesis (23). L-fucose over expression was detected to and fucosylated glycans have been implicated in the pathogenesis of several human diseases. Many examples of altered glycosylation in cancer involve fucose-containing oligosaccharides (24).

Our study can not establish a statistically association between lectin staining and tumor size, age, lymph node invasion and histological grade (BSR). These results are in accordance with previous studies using lectins and other biomarkers in breast tissue (14, 25, 26). When we compared the lectin histochemistry with immunohistochemistry for p53 similar results are observed for both groups, negative and positive p53. These findings indicated a no association between p53 and lectin staining. p53 is expressed at low levels under unperturbed conditions. However, the p53 pathway is activated by any cellular stress that alter the normal cell-cycle progression or can induce mutations of the genome leading to the transformation of a normal cell into a cancerous cell. p53 prevents the multiplication of damaged cells that are more likely to contain mutations and exhibit abnormal cellular growth than undamaged cells (27). The positive and negative immunostaining for p53 on

tumour section in our study should be interpreted with cautious. Bourdon (2007) (28) drawn the attention that commonly available p53 antibodies can detect some p53 isoforms, but do not identify them specifically. Such observation may explain our results regarding p53 positivity and negativity since all samples were previously diagnosed as IDC.

Lectin histochemistry is a tool in pathology which enables us to reach the carbohydrate profile of cell in normal and pathologic development. Changes in glycosylation are commonly observed in human carcinomas and may contribute to the malignant phenotype downstream of certain oncogenic events. Recent studies emphasize the importance of understanding the structure of carbohydrates present in tumour tissues for two clinical needs. In one aspect, antibodies against unique carbohydrate in tumour-associated antigens, especially those secreted into blood, may provide new and better biomarkers. Secondly, glycans uniquely expressed on cancer cells provide targets for novel cancer therapy. The levels of glycosyltransferase activities are altered in cancer cells and hence target structures can be selected on an enzymatic basis considering the specificity of the particular enzymes involved in the assembly of these complex carbohydrate structures (20).

The altered accessible content of glucose/mannose in IDC has already been observed by us (29). We observed that among normal, fibrocystic disease (intraductal hyperplasia and fibroadenoma) and IDC breast tissues undergo changes regarding their saccharide in membrane glycoconjugates.

Recent advances in glycotechnology will find number carbohydrates in glycoconjugates as tumour markers. This search is to create a cell identification tag and as well as to answer one of the most important issues in cancer, why specific sugar(s) change(s) its(their) content in cell to increase their ability of surviving.

In summary, our results support the hypothesis that altered glycosylation of the membrane-bound glycoconjugates in IDC evidenced by lectin histochemistry can be used as a potential signature in cancer.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors thank to CNPq and FACEPE for financial support.

REFERENCES

1. Parkin DM, Bray F, Farlay J et al (2005) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
2. Yoder BJ, Wilkinson EJ et al (2007) Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. *The Breast J.* 13(2): 172-179.
3. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS et al (2008) Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology* 52: 67–81.
4. Pusztai L (2008) Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. *The Oncologist* 13:350–360.
5. Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G et al (2008) Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 10(2):R30.
6. Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8(4): 187-192.
7. Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-Filho JL et al (2006) Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, 11(5):480-484.

8. Kennedy JF, Palva PMG, Correia MTS et al (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr Pol.* 24: 219-30.
9. Sharon N (2007) Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem.* 282:2753-64.
10. Gemeiner P, Mislovičová D, Tkáč J et al (2009) Lectinomics. II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnol Advanc.* 27(1):1-15
11. Ambrosi M, Cameron NR and Davis BG. (2005) Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem.* 3:1593-608.
12. Gabius HJ, Siebert HC, Andre S et al (2004). Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem.* 5:741-64.
13. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al (2005). Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods.* 2:851-6.
14. Korourian S, Siegel E, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma *in situ* of the breast by lectin histochemistry. *BMC cancer* 2008; **8**:136.
15. Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG et al (2003) *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meninge tumor. *Eur J Histochem.* 27(2):139-142.
16. Thoma I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I et al (2007) Lectin Histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer.* 56:391-397.
17. Gabius HJ, Vehmeyer K, Gabius S et al (1988) Clinical application of various plant and endogenous lectins to leukemia. *Blut.* 56(4):147-52.

18. Moll UM, Erster S, Zaika A. (2001) p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta*.1552(2): 47-59.
19. Sirvent JJ, Fortuño-Mar A, Olona M, Orti A. (2001) Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol*.16(1): 99-06.
20. Chandrasekaran, N et al. (2006) The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr Research*, 341:983-994.
21. Kelly LS, Birken S, Puett D. (2007) Determination of hyperglycosylated human chorionic gonadotropin produced by malignant gestational trophoblastic neoplasias and male germ cell tumors using a lectin-based immunoassay and surface plasmon resonance. *Mol Cell Endocrinol*. 2;260-262:33-9.
22. Sharon N and Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol*. 14:53R-62R.
23. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Can. Sci*. 95: 377–384.
24. Becker DJ, Lowe JB (2003) Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiol*. 13(7):42-53.
25. Muños M, Fernández-Aceñero J, Martín S, Schneider J (2008) Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. DOI: 10.1007/s00404-008-0867-1.

26. Baynes C, Healey CS, Pooley KA et al. (2007) Common variants in the , ATM, BRCA1, BRCA2, chek2, TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast C Research*. 9:R27 (DOI: 10.1186/bcr1669).
27. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, et al. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*. 19(18): 2122-37.
28. Bourdon JC (2007) p53 and its isoforms in cancer. *Brit J Cancer*, 97:277-282.
29. Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J et al. (1998) Binding evaluation de isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotechnol*. 74:125-134.

4 CONCLUSÕES

- Há uma diferença significativa na expressão de L-fucose, D-galactose e glicose/manose nas células neoplásicas dos pacientes com IDC em relação ao controle normal;
- Há uma expressão de p53 mutante em apenas 34,1% dos casos não sendo estatisticamente significante entre os grupos analisados;
- Não foi observada uma correlação estatística entre invasão linfonodal, tamanho do tumor e variante histológica com a marcação das lectinas;
- os pacientes triplo negativos para as lectinas foram significativamente mais jovens que os triplo positivos;
- Não há correlação entre marcação IHQ para p53 e os parâmetros clínicos e histopatológicos analisados;
- Não há correlação entre marcação da p53 e a marcação das lectinas;
- Con A pode ser utilizada com biomarcador das células pouco-diferenciadas em pacientes com áreas tumorais bem-diferenciadas e pouco diferenciadas;
- PNA pode ser um possível biomarcador para mitose atípica;
- Con A, PNA e UEA-I apresentaram-se como sondas histoquímicas para CDI.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrosi M, Cameron NR and Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Org Biomol Chem.** 3:1593-608; 2005.

Anensen N, Oyan AM, Bourdon JC, Kalland KH, Bruserud O, Gjertsen BT. A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. **Clin Cancer Res.** 12(13): 3985-92; 2006

ASTOUL, C.H., *et al.* Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 274(2): 455-460, 2000

Beltrão E.I.C. ; Correia M.T.S.; Figueredo-Silva J.; Coelho L.C.B.B. Binding evaluation de isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechn.** v. 74, p. 125-134, 1998.

Beltrão E.I.C. ; Medeiros P.L. ; Rodrigues O.G. ; Figueredo-Silva J. ; Valença M.M. ; Coelho L.C.B.B. ; Carvalho-Jr L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meninge tumor. **Eur J Histochem.** v 27,n. 2 p. 139-142, 2003.

Beltrão, E.I.C, Cabral T.A, Figueredo-Silva J, Coelho, L.C.B.B.; Carvalho Jr. L.B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: a lectin histochemistry study. **Anais Faculdade Medicina da UFPE.** 46(1):32-35, 2001

Bloom e Richardson. Histological grading and prognosis in breast cancer, a study of 1409 cases of wich 395 have been followed for 15 years. 1957

Boldrup *et al*, Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. 2007

Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. **Hum Mutat.** 21(3): 292-00; 2003

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. **Genes Dev.** 19(18): 2122-37; 2005

Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. **Br J Cancer.** 97(3): 277-82; 2007

Campos, L.M.; Cavalcanti, C.L.B.; Lima-Filho, J.L.; Carvalho-Junior, L.B.; Beltrão, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, Sep-Oct, V.11, n. 5, 480-484, 2006

Chapman JA, Miller NA, Lickley HL, Qian J, Christens-Barry WA, Fu Y, Yuan Y, Axelrod DE. Ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS) with heterogeneity of nuclear grade: prognostic effects of quantitative nuclear assessment.. **BMC Cancer**, 7:174-181, 2007.

Conde, D.M.; Terresan, R.Z.; Kashimoto, e.; Carvalho, L.E.C.; Filho, C.C. Fibroadenoma in axillary supernumerary breast: case report. **São Paulo Med. J.** v. 123, n. 5, p. 253-5, 2005.

Dabelsteen, E.; Clausen, H.; Mandel, U. Carbohydrate changes in Squamous cell carcinomas. **Apmis.** (suppl. 27) v. 100, p. 130-138, 1992.

Dantas, K.A.; Santos, G.C.; Filho, O.G. Sistemas de graduação para carcinoma: estudo comparativo da concordância cito-histológica. **Rev Bras Gine Obst.** v. 25, n. 2, 2003

Datasus, 2007. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus>. Acesso em 12 nov. 2008.

Debies MT, Gestl SA, Mathers JL, Mikse OR, Leonard TL, Moody SE, Chodosh LA, Cardiff RD, Gunther EJ. Tumor escape in a Wnt1-dependent mouse breast cancer model is

enabled by p19Arf/p53 pathway lesions but not p16 Ink4a loss. **J Clin Invest.** 118(1):51-63; 2008.

De Mejia EG, Bradford T, Hasler C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. **Nutr Rev.** 61(7): 239-46; 2003

Dumitresco, R.G.; Cotarla, I. Understanding breast câncer risk — where do we stand in **J Cell Mol Med.**v. 9, n. 1, p. 208-21, 2005.

Duverger, E; , Frison N, Roche AC, Monsigny M Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. **Biochimie.** (85): 167–179, 2003.

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. **Mol Cell Biol.** 8(2): 531-9; 1988

Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematol Oncol Clin North Am.**15(5): 931-56; 2001

Fischer E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. **Ber Dtsch Chem Ges.**27:2985-93; 1894

Fusker M.M and Esko J..D. The sweet and sour of cancer: glycans and therapeltic targets. **Nature reviews.** 5:526-542; 2005

Gabius HJ, Andre S, Kaltner H and Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. **Biochim Biophys Acta.** 1572:165-77; 2002.

Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J and Rudiger H. Chemical biology of the sugar code. **Chembiochem.** 5:741-64; 2004

Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. **Cancer Res.** 61(6): 2505-12; 2001

Gemeiner P, Danica Mislovičová, Ján Tkáč, Juraj Švitel, Vladimír Pätoprstý, EvaHrabárová, Grigorij Kogan, Tibor Kožár. Lectinomics. II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances.** In press, 2008

Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, Guillaud-Bataille M, Million K, Wittmer-Dupret E, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. **Nucleic Acids Res.** 34(19): 5603-12; 2006

Guo HB, Nairn A, Harris K, Randolph M, Alvarez-Manilla G, Moremen K, Pierce M. Loss of expression of N-acetylglucosaminyltransferase Va results in altered gene expression of glycosyltransferases and galectins. **FEBS Letters**, 582:527-535, 2008.

Hardy BJ. The glycosidic linkage flexibility and time-scale similarity hypotheses. **Theochem-Journal of Molecular Structure.** 395:187-200; 1997.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA.** 97(10): 5462-7; 2000

Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. **Biochem J.** 352 Pt 1: 1-17; 2000

INCA - Instituto Nacional de Câncer Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 94p, 2006. Disponível em: [http:// www.inca.gov.br /2006](http://www.inca.gov.br/2006). Acesso em: 28 nov. 2008.

Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. **FEBS Lett.**470(1): 77-82; 2000

Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. **Cell.** 71(4): 587-97;1992

Kerlikowske K, Molinaro A, Cha I, Ljung BM, Ernster VL, Stewart K, Chew K, Moore DH 2nd, Waldman F.Characteristics associated with recurrence among women with ductal carcinoma in situ treated by lumpectomy. . J. **Nat. Cancer Inst**, 95:1692-1702, 2003.

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

Korourian, S. Eric Siegel, Thomas Kieber-Emmons, Behjatolah Monzavi-Karbassi. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma *in situ* of the breast by lectin histochemistry. **BMC cancer**; 8:136. 2008

Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, Yamada M, et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. **Nat Methods.** 2:851-6; 2005

Lajos P. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. **The Oncologist**, 13:350–360. 2008.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature.** 278(5701): 261-3; 1979

Leonard, G.D; Swain, S.M. J. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. **Nat Cancer Inst**, 96:906-920, 2004.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta**. 3;1383(1):9-36; 1998.

Meisner, L.W.A, M. Houman Fekrazad, Melanie E. Royce, MD. Breast Disease: Benign and Malignant. **Med Clin N Am**. 92; 1115–1141. 2008.

Melchor and Javier Benítez. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. **Carcinogenesis** vol.29 no.8 pp.1475–1482, 2008.

Melchor L, Honrado E, García MJ, Alvarez S, Palacios J, Osorio A, Nathanson KL, Benítez J. Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. **Oncogene**, 27, 3165–3175. 2008

Melo-Júnior M.R.; Araújo-Filho J.L.S.; Patu, V.J.R.M.; Machado, M.C.F.P.; Beltrão, E.I.C.; Carvalho-Jr, L.B. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. **J Bras Patol Med Lab**. v. 42, n. 6, p. 455-460, 2006.

Menezes, M.V.M.; Cestari, A.L.O.; Almeida, O.; Alvarenga, M.; Pinto, G.A.; Gurgel, A.S.C.; Souza, G.A.; Zeferino, L.C. Protein expression of c-erbB-2 and p53 in normal ducts, ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the same breast. **São Paulo Med J**. v. 124, n. 3, p. 121-124, 2006.

Mitchell SW Researches upon the venom of the rattlesnake: With an investigation of the anatomy and physiology of the organs concerned: *Smithsonian Contributions to Knowledge*, p. 145. 1860.

Mirtrunen, K.; Hirvonen, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research** v. 544, p. 9–41, 2003.

Moll UM, Erster S, Zaika A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. **Biochim Biophys Acta**.1552(2): 47-59; 2001

Mullican M. CAS Search Service Report # 1971632 for Lectins used as Diagnostics, Columbus, OH, USA. 2007.

Phipps, S.; Yang, T.H.J.; Habib, F.K.; Reuben, R.L.; Mcneill, S.A. Measurement of tissue mechanical characteristics to distinguish between benign and malignant prostatic disease. **Urology**. v. 66, p. 447–450, 2005.

Porter, D.; Lahti-Domenici, J.; Keshaviah, A.; Bae, Y.K. *et al*. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. **Mol Cancer Res**. v. 1, p. 362, 2004.

Rakha E.A, M E El-Sayed, J S Reis-Filho1 & I O Ellis. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopathology** 52, 67–81. 2008.

Rêgo, M.J.B.M., Cavalcanti, C.L., Carvalho-Jr L.B., Sobral A.P.V., Beltrão E.I.C. **Lectin histochemistry of Mucoepidermoid Carcinoma**. Oral Oncology Supplement. 1(1): 178-179, 2005.

Santos CF, Mann K, Farias CM, Del Sol FG, , Grangeiro TB, Nagano CS, Cavada BS, Calvete JJ. The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. **Eur J Biochem**. 268(16):4414-22; 2001.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 32(3): 233-45; 2003

Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J Biol Chem.** 282:2753-64; 2007

Sharon N and Lis H. Lectins. Dordrecht ; Boston:Kluwer **Academic Publishers**.2003.

Sharon N and Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.**Glycobiology.** 14:53R-62R; 2004

Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ. Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. **Genomics.** 37(2): 183-6; 1996

Shekhar, M.M.; Nangia-maakker, N.; Tait, L.; Raz, M.F. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial– endothelial interactions. **Am. J. Pathol.** v. 165, p. 1931–1941, 2004.

Sirvent JJ, Fortuño-Mar A, Olona M, Orti A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. **Histol Histopathol.**16(1): 99-06; 2001

Sociedade Americana do Câncer. Cancer Facts and figures 2008. Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf> Acessado em: 15/07/2008

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. **J Mol Biol.** 260(5): 623-37; 1996

Stillmark H. Über rizin, ein giftiges ferment aus Samen von Ricinis communis L., und ainigen anderen Euphorbiaceen. Dorpat (Tartu):1888.

Yoder. Brian J, Edward J. Wilkinson, and Nicole A. Massoll. Molecular and Morphologic Distinctions between Infiltrating Ductal and Lobular Carcinoma of the Breast. **The Breast Journal**, Volume 13 Number 2, 2007 172–179.

Thoma I.; Schult-Kronefelda O.; Burkholderbi.; Goerna M.; Andritzky B.; Blonski K.; Kuglerd C.; Edlerb L.; Bokemeye C..Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **L Cancer**. v 56, p. 391-397,2007.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov**. 7(12):979-87; 2008.

Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, Merkle E, Jackisch C, Costa SD, Caputo A, Kaufmann M. Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53, and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res**. 10(2):R30. 2008.

Wicha,M.S. Liu S, Dontu G.. (Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. **Cancer Res**., 66, 1883–1890; discussion 1895–1886. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2006. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 05 nov. 2008.

Wang H, Ng TB, Liu Q. A novel lectin from, the wild mushroom Polyporus adusta. **Biochem Biophy Res. Com**. 307:535-539, 2003.

ANEXO I

Instruções para autores da revista **Pathology And Oncology Research**

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of Pathology & Oncology Research the option of using our fully

web-enabled online manuscript submission and review system. We request authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to:

<http://pore.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for Pathology & Oncology Research offers easy and

Straight forward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts – Word (preferred), WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures – TIFF (preferred), GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

Electronic versions of your figures must be supplied. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language. pore.edmgr.com

Manuscript Presentation

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. Leave adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Number the pages consecutively with the first page containing:

- running head (shortened title)
- article type
- title
- author(s) full name(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Original papers must be structured as follows: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion

Abstract

Please provide a short abstract of a minimum of 100 , up to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Article types

Original Papers, Reviews, Brief Communications, Case Reports, and Book Reviews will be considered for publication.

Symbols and units

Système International (SI) units should be used throughout.

Section headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections.

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the References. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-referencing

References should be cited in the Vancouver style, i.e. numbered in the order in which they appear in the text and arranged in numerical order in the reference list.

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

2. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

3. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. Mod Genomics J 14(6):126–233

4. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York

5. Book, authored:

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

6. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) The demise of modern genomics. Blackwell, London

7. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) Handbook of environmental chemistry, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

8. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) Neuromuscular junction. Handbook of experimental pharmacology, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

9. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) PRICAI'96: topics in artificial intelligence. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

10. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) Proceedings of the genomic researchers, Boston, 1999

11. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

12. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

14. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

15. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) Nomina anatomica. Excerpta Medica, Amsterdam

16. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) Atlas der Anatomie, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

17. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) Nadmolekulyarnaya struktura polimerov (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

18. Published and In press articles with or without DOI:

18.1 In press

Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) Style manual. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

18.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

18.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

18.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

19. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

19.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000
University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999
FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999
Organization site

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labelled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figures legends in the manuscript.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Offprints

Twenty-five offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page charges and colour figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Colour figures are printed free of charge.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Cristina dos Santos, PhD

Pathology & Oncology Research

Springer Science Business+Media B.V.

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: cristina.dossantos@springer.com

Please visit our site at:

MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO

**"Carcinoma ductal invasivo mamário esporádico: Uma abordagem
histoquímica e imunohistoquímica"**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Eduardo I. Carneiro Beltrão

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Presidente)

Luiz Bezerra

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Examinador interno)

Maria Teresa dos Santos Correia

Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia (examinador interno)

Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti (examinador externo)