

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

BRUNO TRAJANO BARBOSA

CARCINOMAS MAMÁRIOS: ENXERGANDO OS ATÍPICOS
ENTRE OS TÍPICOS

Recife

2014

BRUNO TRAJANO BARBOSA

**CARCINOMAS MAMÁRIOS: ENXERGANDO OS ATÍPICOS
ENTRE OS TÍPICOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo I. C. Beltrão

Recife

2014

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

Barbosa, Bruno Trajano
Carcinomas mamários: enxergando os atípicos entre os típicos / Bruno Trajano
Barbosa. – Recife: O Autor, 2015.

97 f.: il.

Orientador: Eduardo I. C. Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2015.
Inclui referências

1. Mamas – Câncer 2. Lectinas 3. Câncer – Diagnóstico I. Beltrão,
Eduardo I. C. (orient.) II. Título.

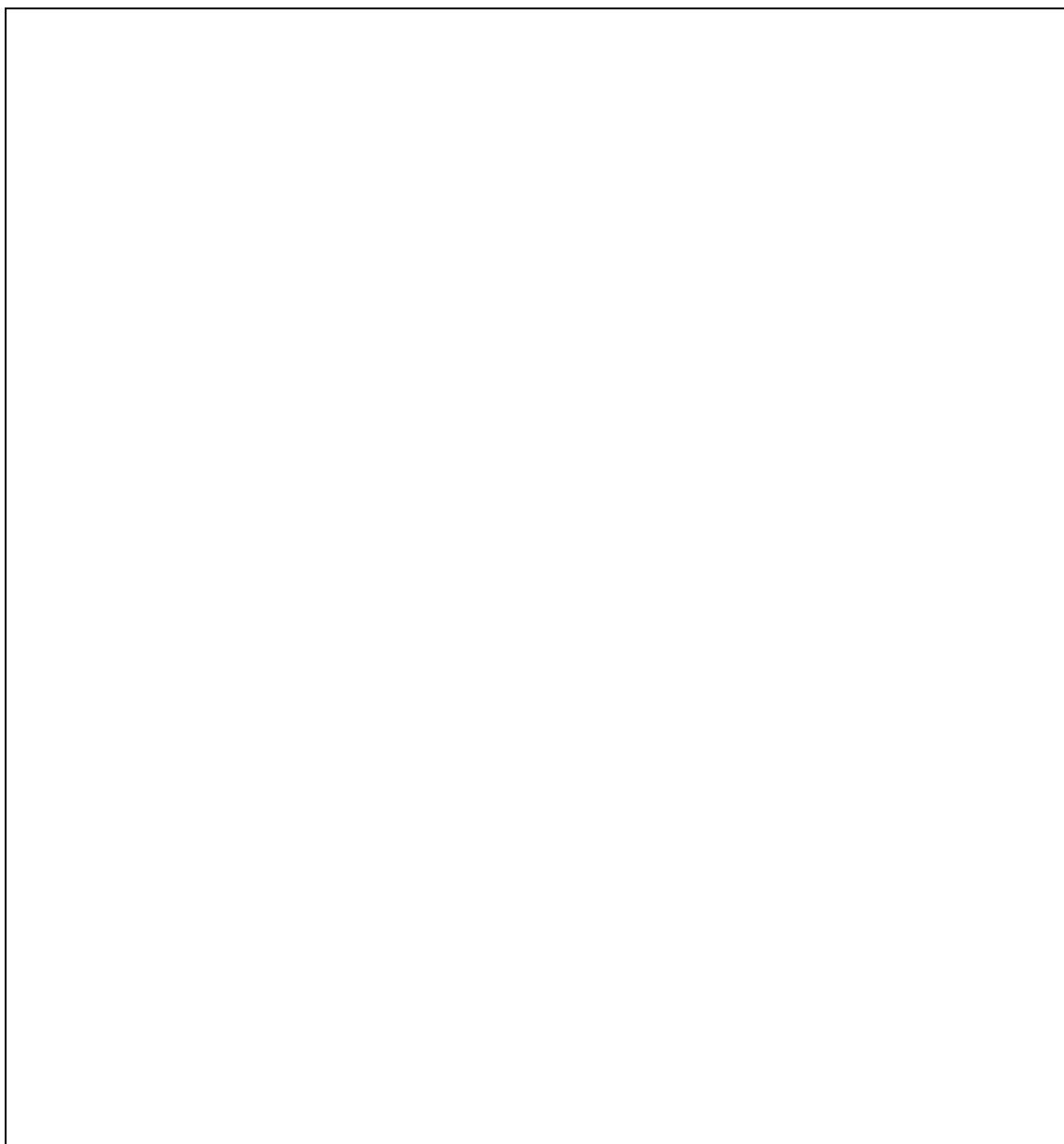
616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-246

Barbosa, B.T.	CARCINOMAS MAMÁRIOS: ENXERGANDO OS ATÍPICOS ENTRE OS TÍPICOS		Mestrado PPGIT/UFPE 2014
---------------	---	--	--------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BARBOSA, Bruno Trajano

Título: CARCINOMAS MAMÁRIOS: ENXERGANDO OS ATÍPICOS ENTRE OS TÍPICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 24/02/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Depto. de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Instituição: Depto. de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: Depto. de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

Profa. Dra. Cíntia Renata Rocha

Instituição: Depto. de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Instituição: Depto. de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus, a
minha mãe Maria José e a todos
os meus amigos e familiares.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que Ele me proporcionou e me proporciona. (“Até aqui nos ajudou o Senhor.” Slm 7:12).

A minha mãe Maria José por todo suporte, orações por nunca medir esforços para me proporcionar uma boa educação e sempre me instruir a seguir nos caminhos de Deus.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Eduardo Beltrão por ter um coração enorme, paciência de Jó, pela confiança, ensinamentos e amizade.

A Moacyr Barreto, por toda ajuda dicas, críticas construtivas, amizade e disposição para ajudar a qualquer hora.

Ao Prof Dr César Andrade por toda ajuda, conselhos e por toda preocupação com o corpo discente e docente do PPGIT e por acreditar no potencial de cada aluno.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) e funcionários do LIKA por, além de serem pessoas incríveis, estarem sempre dispostos a ajudar uns aos outros, e por todas as vezes que tive dúvida ou precisei de algo e sempre encontrei alguém pra me ajudar. Sou grato ao grupo pelo meu crescimento pessoal, intelectual e profissional.

Ao PPGIT por me acolher mesmo antes de entrar no programa e valorizar todos os seus discentes.

Aos meus amigos PPGITanos (docentes e discentes) por me mostrarem na íntegra o que é multidisciplinaridade. Sem esquecer de Paulo Germano, secretário do programa, por ser eficiente, rápido e sempre preocupado com os alunos.

A família IBJSP, os meus pastores, líderes e amigos por todo carinho força e orações.

RESUMO

BARBOSA, B. T. CARCINOMAS MAMÁRIOS: ENXERGANDO OS ATÍPICOS ENTRE OS TÍPICOS. 2014. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de mama é uma das neoplasias com as maiores taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e a principal causa de mortes por câncer em mulheres. Os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar a expressão das proteínas HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 e BRCA2 em tumores de mama humana diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica; b) avaliar a expressão de Gal-1 e Gal-3 e o glicocódigo em glicoconjugados de superfície celular de tumor mamário diagnosticado como carcinoma mucinoso puro usando imunohistoquímica e histoquímica com lectinas (Con A, HPA, PNA e UEA-I), respectivamente; c) avaliar a expressão de BRCA1 e BRCA2 em carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) bilateral utilizando imunohistoquímica; d) avaliar a expressão de MUC1, Gal-1 e Gal-3 em tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica. Os resultados foram; a) HIF-1 α apresentou correlação estatística direta com a invasão linfonodal ($p=0,036$), BRCA2 apresentou uma correlação inversa com o receptor de progesterona ($p=0,02$), MGAT5, embora com imunomarcção positiva, não apresentou nenhuma correlação significativa com fatores clínico-histopatológico analisado (idade, invasão linfonodal e grau nuclear) nem com os marcadores de rotina no diagnóstico (receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER-2); b) a marcação de Con A e HPA foram positivas para histoquímica com lectinas, a imunohistoquímica foi positiva para Gal-1 e Gal-3. Gal-3 foi também positiva para o estroma associado as células tumorais e ao endotélio vascular; c) a positividade para BRCA1 e BRCA 2 bem como para RE, RP e HER-2 não conferiu um aspecto de proteção quanto a progressão do câncer e comprometimento linfonodal, d) os marcadores avaliados apresentaram expressão diferenciada nos componentes celulares do tumor: BRCA1 (componente mucinoso), BRCA2 (CDI), MUC1 e Gal-3 (citoplasma e membrana apical das células do carcinoma mucinoso e apenas na membrana apical das células de CDI) e Gal-1 (células estromais associadas ao tumor). Desta forma se conclui que: a) HIF-1 α e BRCA2 são capazes de serem correlacionados com parâmetros clínico-histopatológicos da rotina diagnóstica e que seua positividade auxilia na caracterização do carcinoma ductal invasivo; b) apesar de ser caracterizado por um bom prognóstico, o carcinoma mucinoso aqui estudado apresentou características glicobiológicas que indicam a aquisição de um fenótipo agressivo; c) os resultados possibilitam a caracterização dos tumores como Luminal B cujo prognóstico se caracteriza como reservado. E os biomarcadores avaliados BRCA1 e BRCA2 aliados aos da rotina clínica (RP, RE, HER-2 e Ki-67) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva; d) os resultados possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos morfológicos e moleculares do carcinoma de mama mucinoso misto (com componente invasivo – CDI) auxiliando o diagnóstico apresentado pelos biomarcadores de rotina clínica (RP, RE, HER-2).

Palavras-chave: carcinoma mucinoso, CDI, lectinas, diagnóstico, receptores.

ABSTRACT

BARBOSA, B. T. BREAST CARCINOMA: SEARCHING ATYPICAL AMONG THE TYPICAL. 2014. Dissertation (Master's degree). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Breast cancer is one of the neoplasms with the highest rates of morbidity and mortality worldwide. The aims of this work were: a) evaluate the protein expression of HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 and BRCA2 in human mammary tumors diagnosed as invasive ductal carcinoma (CDI) using immunohistochemistry; b) evaluate the expression of Gal-1 and Gal-3 and the glycode of glycoconjugates of cell surface in a mammary tumor diagnosed as pure mucinous carcinoma using immunohistochemistry and lectin histochemistry (Con A, HPA, PNA and UEA-I), respectively; c) evaluate the expression of BRCA1 and BRCA2 in bilateral invasive ductal carcinoma (IDC) of human breast using immunohistochemistry; d) evaluate the expression of MUC1, Gal-1 and Gal-3 in human breast tumor diagnosed as mucinous carcinoma with invasive component (IDC) using immunohistochemistry. Results were: a) HIF-1 α presented a direct correlation with lymph node invasion ($p=0.036$), BRCA2 presented an inverse correlation to progesterone receptor ($p=0.02$), MGAT5 (positive staining) did not present correlation with neither the clinic-histopathologic features studied (age, lymph node invasion and nuclear grade) nor routine diagnostic parameters (progesterone and estrogen receptors and HER-2); b) Con A and HPA staining were positive and immunohistochemistry was positive for Gal-1 and Gal-3. Gal-3 was also positive to tumor cells associated stroma and vascular endothelium; c) BRCA1 and BRCA2 positivity as well as ER, PR and HER-2 positivity, did not conferred a protection to cancer aggressive progress where it was also observed a lymph node invasion; d) the tumor markers evaluated presented a positive differential expression in tumor cell components: BRCA1 in mucinous component, BRCA2 in IDC cells, MUC1 and Gal-3 in the cytoplasm and membrane of apical cells of mucinous carcinoma and also exclusively in the membrane of apical cells of IDC, Gal-1 was positive in tumor cells associated to stroma. As conclusions it can be presented that: a) HIF-1 α and BRCA2 were correlated to clinic-histopathologic parameters of routine diagnosis and their positivity helps the characterization of invasive ductal carcinoma; b) despite being characterized by a good prognosis breast carcinoma, the mucinous carcinoma here studied presented glycobiology features that indicate the acquisition of an aggressive phenotype; c) results allowed to characterize both tumors as luminal B type which is a poor prognosis tumor and that the biomarkers evaluated, BRCA1 and 2, together with ER, PR and HER-2 contribute to a better understanding and correlations with clinic, morphologic and molecular aspects of the bilateral carcinoma regarding therapy, epidemiology and predictive informations; d) it was possible to conclude that correlation to morphology and molecular features of breast mucinous carcinoma with invasive component (IDC) helps the diagnosis when in association to routine diagnoses biomarkers (PR, ER, HER-2).

Keywords: mucinous carcinoma, IDC, lectins, diagnosis, receptors.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 01: Marcos do câncer. Características das células neoplásicas que modulam e controlam a sua proliferação e sobrevivência. (Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2000). 21
- Figura 02: Adição de quatro elementos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer aos Marcos do Câncer. (Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2011). 22
- Figura 03: Estágios do desenvolvimento anormal de populações celulares mamárias normais até o câncer invasivo: A) Ducto normal; B) Crescimento das células epiteliais intraductais; C) Mudança na morfologia das células epiteliais; D) Invasão na luz do ducto; E) Invasão do estroma. (Fonte: VELASCO et al., 2008). 23
- Figura 04: Imagem histológica de um carcinoma ductal invasivo sem nenhum tipo específico. Magnificação de 4x. (Fonte: CORBEN, 2013). 26
- Figura 05: Imagem histológica de um carcinoma mucinoso de mama indicando o componente celular (seta vermelha) e o mucinoso (seta preta). Amplificação 4x. (Fonte: CORBEN, 2013). 29
- Figura 06: Glicocódigo de glicoconjugados de superfície celular. Os glicoconjugados estão envolvidos em funções especializadas nos vários tipos celulares nos tecidos normal e transformados (Fonte: FUSTER, ESKO, 2005). 33

ARTIGO 1

- Figura 01: Imunohistoquímica para o Fator induzido por hipóxia (HIF-1 α). Sua positividade foi correlacionada com a invasão linfonodal. (Aumento 40x). 73
- Figura 02: Imunomarcção para a proteína de BRCA2. Sua positividade apresentou uma correlação inversa com o receptor de progesterona. (Ampliação 10x e detalhe: 40x). 73

ARTIGO 2

- Figure 01: Lectin histochemistry and immunohistochemistry of mucinous carcinoma: a) Con A staining positivity of neoplastic cells (heterogeneous – red arrow) and mucous secretion (black arrow); b) and c) stroma positive staining pattern to Gal-1 and Gal-3, respectively (blue arrows); d) PNA positive staining in mucous secretion (white arrow) but not in neoplastic cells. 81

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 01: Classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.	27
Tabela 02: Publicações mais recentes do BmC utilizando histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e outras técnicas.	37

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 01: Lectinas, especificidades e suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho.	42
Tabela 02: Anticorpos e suas respectivas diluições utilizadas neste trabalho.	43

ARTIGO 3

Tabela 01: Descrição histopatológica e subtipagem molecular utilizando parâmetros da rotina clínica (prontuário IMIP) e avaliação de BRCA1 e 2 (estudo) das amostras de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) contralaterais.	86
---	----

LISTA DE ABREVIações

BmC	Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer
BRCA1	Gene do cancer de mama 1 (do inglês: <i>Breast Cancer 1</i>)
BRCA2	Gene do cancer de mama 2 (do inglês: <i>Breast Cancer 2</i>)
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CK	Citoqueratina
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
Con A	Concanavalin A
DNMTs	DNA Metiltransferase
EGFR	Receptor do tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>epidermal growth fator receptor type 1</i>)
GAL-1	Galectina-1
GAL-3	Galectina-3
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (do inglês: <i>human epidermal growth fator receptor type 2</i>)
HIF-1 α	Fator induzível de Hipóxia 1 (do inglês: <i>hypoxia inducible fator type 1 – alpha</i>)
HPA	<i>Helix pomatia</i> agglutinin
HqL	Histoquímica com Lectinas
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	Proteína de proliferação celular Ki67
MGAT5	β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferase V
MUC-1	Glicoproteína Mucina-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
UEA-I	<i>Ulex europeus</i> I agglutinin
UICC	União Internacional para Controle do Câncer
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIII
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL	19
3.2 MARCOS DO CÂNCER	20
3.3 CÂNCER DE MAMA	23
3.4 CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA	25
3.5 CARCINOMA MUCINOSO	28
3.6 HIPÓXIA	29
3.7 BRCA1 E BRCA2	30
3.8 GLICOSILAÇÃO E CÂNCER	32
3.9 MGAT5/GNT V	34
3.10 LECTINAS	35
3.11 GALECTINA 1 E 3	38
3.12 MARCADORES NA ROTINA DIAGNÓSTICA	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 AMOSTRAS	41
4.2 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS	41
4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA	42
4.4 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS	43
4.5 <i>CUT OFF</i>	43
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	43
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 REFERÊNCIAS	45
6 RESULTADOS	61
6.1 ARTIGO 1: INVESTIGANDO BRCA1, BRCA2, HIF-1α E	

	MGAT5 EM CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA	61
6.2	ARTIGO 2: MUCINOUS CARCINOMA: A GLYCOBIOLOGICAL INVESTIGATION	74
6.3	ARTIGO 3: SUBTIPAGEM MOLECULAR DE BRCA1 E BRCA2 CARCINOMA DUCTAL INVASIVO BILATERAL EM PACIENTE JOVEM	82
6.4	ARTIGO 4: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CARCINOMA MUCINOSO ASSOCIADO À CARCINOMA DUCTAL INVASIVO	89
7	CONCLUSÕES GERAIS	96
8	PERSPECTIVAS	97

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer, também denominado como neoplasia ou tumor maligno, é utilizado para caracterizar um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que podem acometer virtualmente qualquer tecido, levando ao crescimento celular, invasão e destruição de tecidos adjacentes, com possível migração das células alteradas para diferentes tecidos do organismo (metástase). Estas metástases levam, em última análise, à morte do indivíduo. Nesse contexto o câncer de mama recebe destaque, sendo a neoplasia que apresenta as maiores taxas de morbi/mortalidade de mulheres no Brasil e no mundo. Dados mostram que a incidência da doença vem aumentando com o passar dos anos, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), e as estimativas para o ano de 2014 são de 57.120 novos casos (WHO, 2014; INCA 2014).

Neoplasias malignas expressam aberrantemente vários glicanos. A glicosilação aberrante ocorre essencialmente em todos os tipos de cânceres experimentais e humanos e muitos epítomos glicosil constituem antígenos associados a tumor. Estudos indicam que a glicosilação aberrante é resultado da transformação oncogênica inicial, bem como um evento-chave na indução da invasão e metástase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Além disso, outro evento que possibilita as neoplasias a adquirirem um fenótipo mais agressivo é a formação de um ambiente hipóxico intratumoral, este fenômeno promove uma gama de alterações biológicas, tais como aumento da transcrição e expressão gênicas, seleção de clones resistentes a apoptose, indução da invasão e metástase, redução da expressão de genes de reparo do DNA e maior instabilidade genômica para adaptar-se ao ambiente mais hostil tornando-as mais agressivas (WARTENBERG et al., 2003; RUAN et al., 2009; YOSHIMURA et al., 2013).

Diante deste contexto, o uso de biomarcadores é de suma importância para subtipagem molecular do câncer de mama, determinação da terapêutica e do prognóstico. Alguns destes biomarcadores, como o receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) e a proteína de proliferação celular (Ki-67), já são bem aceitos e utilizados na clínica. (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013).

Dentre os tumores malignos de mama, os carcinomas representam o maior grupo, a maioria deles são adenocarcinomas e sua classificação histopatológica baseia-se no padrão de crescimento e características citológicas de tumor. O carcinoma ductal

invasivo (CDI) é o tipo mais comum de câncer de mama invasivo, sendo responsável por até 70% a 75% dos casos. Estes tumores correspondem a um grupo heterogêneo no que diz respeito a características patológicas e evolução clínica (CORBEN, 2013).

Carcinoma mucinoso da mama (também conhecido como carcinoma colóide) é um tipo histológico especial de câncer. Estes tumores são incomuns, representam cerca de 2% dos carcinomas da mama invasivos e são tipicamente associados a um prognóstico favorável, pois não é comumente envolvido à invasão linfonodal e apresenta uma baixa taxa de recidiva (BARKLEY et al., 2008; CHANG et al., 2009; HA E DELEON, 2013).

Assim, histoquímica com lectinas e a imunohistoquímica apresentam-se como ferramentas valiosas no estudo desses tumores, visto que, estas técnicas são capazes de identificar alterações no perfil de carboidratos de tumores sólidos, bem como expressão de várias proteínas associadas a progressão tumoral (BELTRÃO et al., 1998; 2003; LIMA et al., 2010).

Os objetivos deste trabalho foram: a) avaliar a expressão das proteínas HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 e BRCA2 em tumores de mama humana diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica; b) avaliar a expressão de Gal-1 e Gal-3 e o glicocódigo em glicoconjugados de superfície celular de tumor mamário diagnosticado como carcinoma mucinoso puro usando imunohistoquímica e histoquímica com lectinas (Con A, HPA, PNA e UEA-I), respectivamente; c) avaliar a expressão de BRCA1 e BRCA2 em carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) bilateral utilizando imunohistoquímica; d) avaliar a expressão de MUC1, Gal-1 e Gal-3 em tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliação do uso potencial de novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de tumores de mama humana.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão das proteínas HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 e BRCA2 em tumores de mama humana diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI);
- Avaliar a expressão de Gal-1 e Gal-3 e o perfil glicídico de glicoconjugados de superfície celular de tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso puro utilizando imunohistoquímica e histoquímica com lectinas (Con A, HPA, PNA e UEA-I), respectivamente;
- Avaliar a expressão de BRCA1 e BRCA2 em carcinoma ductal invasivo de mama bilateral em paciente jovem;
- Avaliar a expressão de MUC1, Gal-1 e Gal-3 em tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI);
- Correlacionar o perfil glicídico e a expressão dos marcadores estudados com os dados clínico-histopatológicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER: UMA VISÃO GERAL

O termo câncer também denominado como neoplasia maligna ou tumor maligno é utilizado para caracterizar um conjunto de mais de 100 tipos de doenças, caracterizado por um crescimento descontrolado de células anormais com capacidade de acometer virtualmente qualquer tecido (INCA 2014).

A carcinogênese ou oncogênese (formação do câncer) é um processo multifatorial, sendo definidas como proliferações clonais onde eventos genéticos e/ou epigenéticos promovem alterações na fisiologia celular (KOPF, 2007; SONNENSCHN, SOTO, 2008; DEY, 2011). Tais alterações levam a mudanças da expressão de proteínas celulares e nas vias de sinalização, resultando em modificações no perfil das proteínas celulares, de membrana ou secretadas, modulando e/ou determinando a transição de uma célula normal para a malignidade adquirindo, assim, autonomia e vantagens quanto à proliferação e/ou resistência a morte celular (COMPAGNI; GREENMAN et al., 2007; DEY, 2011; SALVADOR, 2012).

A manutenção da célula alterada depende de um microambiente permissivo ao seu desenvolvimento, que inclui a interação bidirecional entre células cancerígenas e o estroma, comunicação transiente com proteínas da matriz extracelular e vasos sanguíneos (SWARTZ et al., 2012). Estes últimos estão intimamente relacionados com a progressão tumoral, pois poderão ser utilizados pelas células neoplásicas para a formação de novos tumores (processo de metástase). O angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) garantirá um aporte apropriado de oxigênio e nutrientes acarretando em um maior desenvolvimento e crescimento celular, além da capacidade de invasão e destruição de tecidos adjacentes, bem como metástase, a qual é responsável pela morte de dois a cada três pacientes com câncer (INCA, 2014). Células de um mesmo tumor apresentam uma heterogeneidade genotípica e fenotípica. Uma das principais causas de heterogeneidade genética no câncer é a instabilidade genômica que conduz a aquisição de mutações específicas em oncogenes, genes supressores tumorais e genes de manutenção do genoma (SALVADOR, 2012; BURRELL, 2013).

As células tumorais também apresentam uma grande plasticidade fenotípica, o que explica a capacidade diferencial de subconjuntos celulares para iniciar tumores em modelos experimentais. Essa plasticidade possibilita as células a alterar seu fenótipo em respostas a pressões seletivas do seu microambiente, como hipóxia, acidez e a presença de fatores de crescimento, que podem existir dentro de um tumor. Como resultado da interação célula-microambiente o comportamento do tumor e sua progressão são moduladas (SALVADOR, 2012; JUNTILA; SAUVAGE, 2013).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um notável problema de saúde pública no mundo, uma vez que apresenta, em geral, uma incidência crescente e alta taxa de mortalidade. Essa doença foi responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012, excedido apenas pelas doenças cardiovasculares (WHO, 2014).

respostas a pressões seletivas do seu microambiente, como hipóxia, acidez e a presença de fatores de crescimento, que podem existir dentro de um tumor. Como resultado da interação célula-microambiente o comportamento do tumor e sua progressão são moduladas (SALVADOR, 2012; JUNTILA; SAUVAGE, 2013).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um notável problema de saúde pública no mundo, uma vez que apresenta, em geral, uma incidência crescente e alta taxa de mortalidade. Essa doença foi responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012, excedido apenas pelas doenças cardiovasculares (WHO, 2014).

Historicamente o câncer foi considerado uma doença de países desenvolvidos, porém há aproximadamente quarenta anos que essa doença vem sendo observada em países em desenvolvimento, principalmente daqueles com poucos e médios recursos financeiros (INCA 2014).

A União Internacional para Controle do Câncer (UICC) estimou em 2012, que cerca de 8 milhões de pessoas morreram de câncer durante o ano e se medidas não forem tomadas esse número aumentará para 13,2 milhões até 2030. A OMS estima que, no ano 2030, teremos 27 milhões de casos incidentes de câncer além de 13,1 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas portadores da doença (WHO, 2014).

No Brasil a estimativa para o ano de 2014 apontam o surgimento de 580.000 novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes entre as mulheres, com exceção do câncer de pele não-melanoma, os cânceres de mama e colo do útero; e nos homens, os cânceres de próstata e pulmão (INCA, 2014). Com esse número alarmante de pessoas diagnosticadas com câncer, faz-se necessário o desenvolvimento de novas terapias, novas técnicas para diagnóstico precoce, além de medidas de prevenção, informações sobre fatores de risco e desfazer mitos e equívocos sobre a doença.

3.2 MARCOS DO CÂNCER

O câncer surge a partir de células normais que sofreram alterações em seu genoma, devido à instabilidade genômica dessas células que as capacitam a desenvolver características peculiares (WEINBERG, 2008).

HANAHAN e WEINBERG (2000) observaram a existência de seis fatores fundamentais para o desenvolvimento do câncer: 1) manutenção do sinal de proliferação; 2) fuga de genes supressores; 3) evasão da morte celular programada

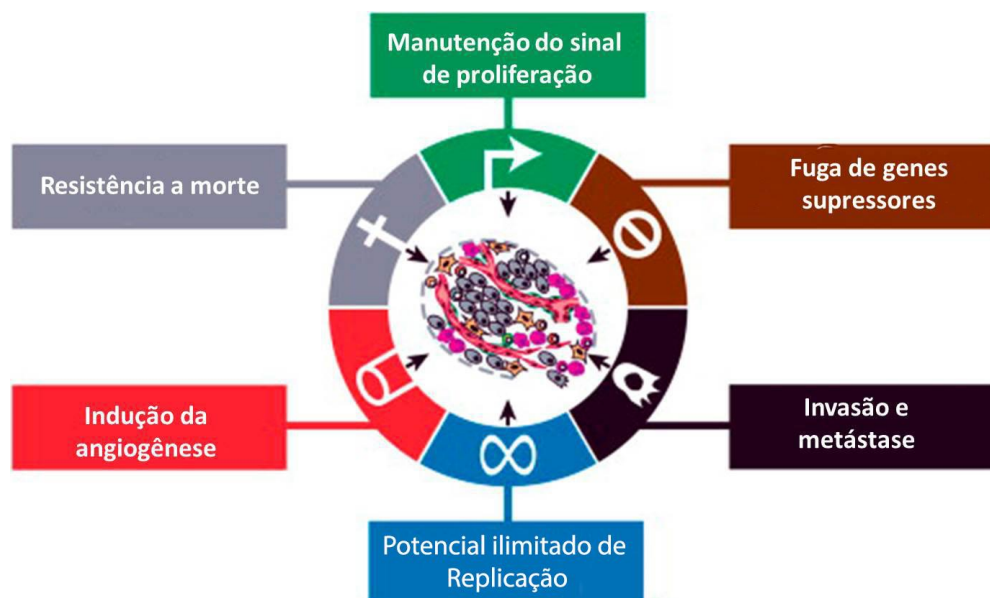


Figura 01: Marcos do câncer. Características das células neoplásicas que modulam e controlam a sua proliferação e sobrevivência. (Fonte: HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Onze anos depois HANAHAN e WEINBERG, acrescentaram mais algumas características em relação ao microambiente tumoral e o papel das células não-neoplásicas na carcinogênese. Subjacente as características descritas há 11 anos estão a instabilidade do genoma, o que gera a diversidade genética que acelera a aquisição do fenótipo tumoral; e inflamação, que promove múltiplas funções em todas as características anteriormente estabelecidas além de reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imunológico (Figura 02).

Sendo assim, o desenvolvimento neoplásico necessita da construção de um nicho bem sucedido, interação de células malignas e não malignas do microambiente tumoral, como da seleção natural de mutações específicas que habilitam essas células cancerígenas a sobrevivência e proliferação (BARCELLOSHOFF et al., 2013).

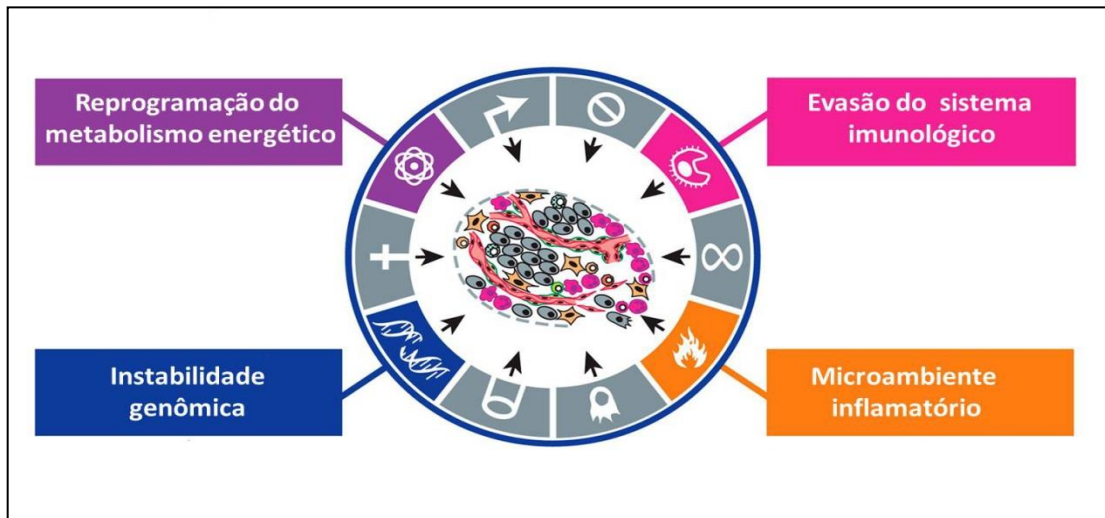


Figura 02: Adição de quatro elementos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer aos Marcos do Câncer (Fonte: HANAHAAN e WEINBERG, 2011).

As neoplasias são classificadas de acordo com o seu comprometimento orgânico e no geral, podem ser benignas ou malignas. As neoplasias benignas em geral se assemelham ao seu tecido original, além das células poderem apresentar ou não suas relações normais. Esses tipos de tumor em geral apresentam um crescimento lento, expansivo e localizado, envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que os separa do tecido normal e podem evoluir por anos sem sintomas ou com manifestações discretas e raramente constitui um risco de morte a não ser que esteja localizada em órgãos vitais. Contudo, o ritmo de crescimento depende de fatores como suprimento sanguíneo e hormonal. Neoplasias malignas tendem, geralmente, a proliferar em ritmo acelerado traduzido, a princípio, por aumento das figuras de mitose ao exame histológico, apresentarem contornos fracamente definidos, serem agressivas e incontroláveis. Essas neoplasias apresentam dois aspectos característicos: anormalidades celulares e invasão de tecidos vizinhos. Quando ambos estão presentes o diagnóstico torna-se mais acessível. As células desenvolvem-se de forma muito mais desorganizada do que a encontrada nas neoplasias benignas (MEISNER; FEKRAZAD; ROYCE, 2008).

A progressão de populações celulares malignas proporciona o desarranjo das características fenotípicas do tecido (Figura 3), culminando com o surgimento de um câncer invasivo (VELASCO et al., 2008).

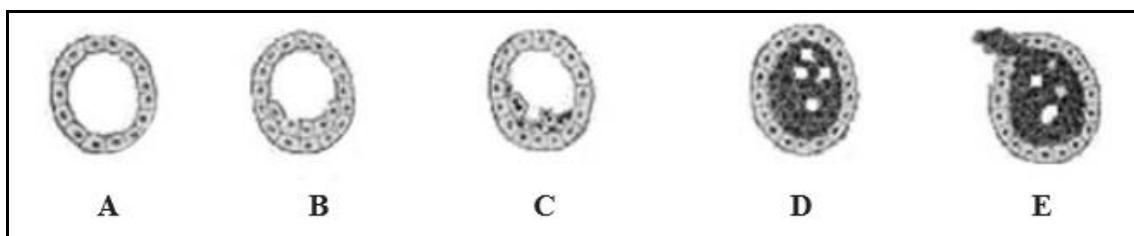


Figura 03: Estágios do desenvolvimento anormal de populações celulares mamárias normais até o câncer invasivo: A) Ducto normal; B) Crescimento das células epiteliais intraductais; C) Mudança na morfologia das células epiteliais; D) Invasão na luz do ducto; E) Invasão do estroma. (Fonte: VELASCO et al., 2008).

3.3 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de doenças, com diferentes formas de apresentação clínica, características morfológicas e imunohistoquímicas peculiares, apresentando uma resposta terapêutica diferenciada e associada a parâmetros prognósticos distintos (REIS-FILHO; TUTT, 2008; RAKHA, EL-SAYED, REIS-FILHO, ELLIS, 2009; SUBA, 2014).

Esta neoplasia é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo (WHO, 2014). O risco é maior nas sociedades economicamente desenvolvidas, e está aumentando rapidamente nas sociedades em desenvolvimento. Isso está relacionado a múltiplos fatores, tais como, a não amamentação, falta de atividade física e alimentação saudável e manutenção do peso corporal (SOERJOMATARAM et al, 2012).

No Brasil, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, excluindo os de pele do tipo não-melanoma, tendo sido estimado para 2014 um total de 57.120 novos casos, enquanto que em 2010 a estimativa era de 49.240 casos, caracterizando um aumento bastante significativo em um curto período. Na região Nordeste a estimativa é de 10.490 novos casos (INCA, 2014).

A etiologia do câncer de mama é complexa e envolve fatores de risco endógenos e exógenos. (WHO, 2014).

Pode-se destacar: a) a faixa etária: o tumor é raro antes dos 35 anos de idade, e estatisticamente mais prevalente entre 50 e 60 anos; b) predisposição genética: a maioria dos tipos hereditários de câncer de mama ocorre em mulheres na pré-menopausa e os casos esporádicos ocorrem em mulheres na pós-menopausa; c) distúrbios endócrinos relacionados ao estímulo estrogênico: seja endógeno ou exógeno, com o risco aumentado quanto maior for o tempo de exposição (ADAMI et al., 2008; DESANTIS et al., 2013; INCA, 2014).

São também de importância quanto aos fatores de risco: mulheres com história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos de idade) já que elas estarão expostas por mais tempo ao estrógeno; o uso de contraceptivos orais mais antigos, que continham altos níveis de estrógeno, foi associado a um risco aumentado para câncer de mama; a menopausa tardia (após os 50 anos de idade); primeira gravidez após os 30 anos de idade (mulheres nulíparas que têm o primeiro parto numa idade avançada estão sob risco duas vezes maior de desenvolver câncer de mama); nuliparidade, sabe-se que a prolactina e a gonadotrofina coriônica humana no desenvolvimento de estruturas ductais, lobulares e alveolares na última metade de gravidez causa um efeito protetor contra um possível desenvolvimento de uma neoplasia maligna no futuro; terapia de reposição hormonal pós-menopausa, principalmente se prolongada por mais de cinco anos; exposição a carcinógenos; histórico de alterações histológicas na mama, tais como: hiperplasia atípica, carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobular *in situ* (CLIS) aumenta o risco de desenvolver câncer de mama. Um câncer de mama anterior aumenta de duas a quatro vezes o risco de desenvolver uma neoplasia contralateral (RUBIN et al., 2006; SCHULZ, 2007; DESANTIS et al., 2013).

Outros fatores relevantes incluem a exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 40 anos; a resistência à insulina e hiperinsulinemia que predispõem a diabetes, pode aumentar o risco de câncer da mama (LANN e LeROITH, 2008), a ingestão de bebida alcoólica, mesmo que em quantidade moderada (30g/dia), obesidade, definida em adultos, como um índice de massa corporal (IMC) de 30 kg/m² ou mais, principalmente quando o aumento de peso se dá após a menopausa, e sedentarismo (ADAMI et al., 2008; DESANTIS et al., 2013). Além disso, independentemente da menopausa, mulheres obesas têm maior probabilidade de apresentar câncer de mama mais agressivo e ter um prognóstico reservado. Os níveis de estrógenos são mais altos em mulheres pós-menopausadas obesas em razão dos altos níveis de aromatase, uma

enzima que converte andrógenos em estradiol no tecido adiposo (STEPHENSON e ROSE, 2003; MAHONEY; 2008).

Práticas de comportamento, tais como a manutenção de um peso saudável, adotar um estilo de vida fisicamente ativo, e consumir uma dieta saudável são abordagens importantes para reduzir o risco de câncer, assim como muitas outras doenças crônicas (KUSHI et al., 2012). Vale salientar que a prática de exercício físico regular associada a uma alimentação saudável também são indicadas para auxiliar no resultado do tratamento do câncer, a qualidade de vida do paciente e a sobrevida livre da doença, pois sabe-se que a atividade física pode reduzir o risco de recorrência e aumentar a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer (IRWIN et al., 2008; COURNEYA, 2009; KUSHI et al., 2012).

Um fator de risco decorrente da industrialização e da vida moderna é a mudança do ritmo circadiano e sono relacionado a melatonina. Estudos apontam que a capacidade antiproliferativa e antioxidante da melatonina, além da sua capacidade de aumentar a vigilância imunológica, e os seus efeitos na modulação das respostas humoral e celular e alterações epigenéticas são fatores importantes no desenvolvimento do câncer (STEVENS et al., 2013).

3.4 CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA

Cânceres de mama invasivos constituem um grupo heterogêneo de lesões. A maioria deles são adenocarcinomas e sua classificação histopatológica baseia-se no padrão de crescimento e características citológicas de tumor. Cânceres de mama invasivos surgem em maioria, na unidade ducto-lobular terminais independentemente do tipo histológico (GOBBI, 2012, CORBEN, 2013).

Carcinomas ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum de cancer de mama invasivo, sendo responsável por até 70% a 75% dos casos. Estes tumores correspondem a um grupo heterogêneo no que diz respeito a características patológicas e evolução clínica (CORBEN, 2013). O CDI é iniciado no sistema de minúsculos tubos que levam a secreção dos lóbulos para o mamilo. Este processo começa quando células epiteliais alteradas que revestem os ductos se dividem, se multiplicam e invadem a camada de células ductais e, em estágios mais avançados da doença, podem invadir o estroma (VELASCO et al., 2008).

Macroscopicamente o CDI apresenta-se como uma massa palpável, endurecida e com bordas irregulares, seu tamanho pode variar de alguns milímetros a vários centímetros. Histopatologicamente, as células formam estruturas glandulares, ninhos sólidos, cordões celulares de células tumorais e > 50% do tumor não apresenta padrões de tipo especial (Figura 04). O tumor pode apresentar regiões de necrose, de microcalcificação, e de carcinoma *in situ* (SCHMITT, 2011).

Além disso, 70% -80% dos CDI Sem Outra Especificação (SOE) apresentam positividade para receptor de estrogênio (RE) e 15% -30% de positividade para o Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2) (CORBEN; 2013).

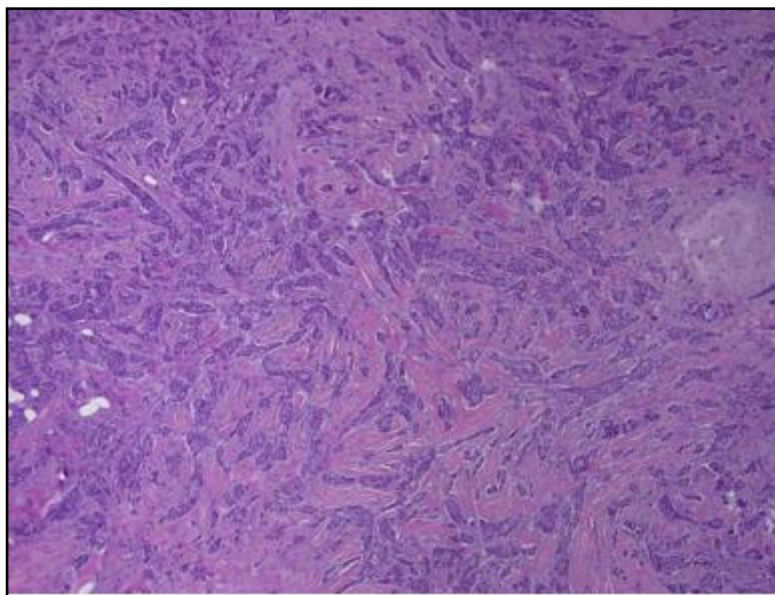


Figura 04: Imagem histológica de um carcinoma ductal invasivo sem nenhum tipo específico. Magnificação de 4x.
(Fonte: CORBEN, 2013).

A Classificação Internacional de Tumores - TNM (tamanho; presença de invasão linfonodal e presença de metástases) é utilizada para a classificação clínica da doença. Nesta o tamanho pode ser classificado em T1 (tumores $\leq 2,0$ cm), T2 (tumores entre 2,0 e 5,0 cm), T3 (tumores $> 5,0$ cm) e T4 (apresenta extensão direta à parede torácica ou à pele). Quanto ao envolvimento dos linfonodos a classificação é N0 (ausência de linfonodos acometidos), N1, N2 e N3 (presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais). O último parâmetro é a presença de metástases sendo classificada em M0 ou M1 para presença ou ausência (respectivamente) de metástases à distância. De maneira semelhante tem-se a classificação patológica (pTNM) sendo o pT o tamanho do componente invasor, pN componente linfonodal (pN1 quando há

acometimento de 1 a 3 linfonodos, pN2 de 4 a 9 linfonodos e pN3 mais de 10 linfonodos acometidos). A metástase a distância (pM) é também investigada histologicamente (SOBIN e WITTEKIND, 2002). Outra forma de classificação é a de Scarff-Bloom-Richardson. Esta é baseada na diferenciação das células tumorais, avaliando as estruturas tubulares, glandulares e papilares do tumor, bem como a forma do núcleo e o índice mitótico, pontuados individualmente de 1 a 3 e posteriormente somados para formar índices de 3 a 9, onde a pontuação 8 ou 9 indica tumores pouco diferenciados, sem características de normalidade e que tendem a crescer e se disseminar de modo mais agressivo (ELSTON e ELLIS, 1998).

Os carcinomas de mama podem ser avaliados molecularmente sendo subdivididos em cinco grupos (Tabela 01). Para tal o Consenso de Saint Gallen em 2011, recomenda a avaliação dos seguintes fatores preditivos: Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) e HER-2 (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) (GNANT et al., 2011). A rotina diagnóstica utiliza este perfil molecular para escolha da terapêutica mais adequada. A expressão de citoqueratinas (CKs) e receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e Ki-67 também podem ser utilizadas para diferenciação dos subtipos moleculares (ABD EL-REHIM et al., 2004; CIRQUEIRA et al., 2011).

Tabela 01: Classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.

Subtipo	Imunomarcação			
	RE	RP	HER-2	Prognóstico
Luminal A	+	+	-	Bom
Luminal B	+	+	+	Reservado
Superexpressão de HER-2	-	-	+	Responsivo a terapêutica com Anti-HER-2
Basaloide	-	-	-	Não responsivo as terapias antiestrogênicas e anti-HER-2
Tipo-normal	Expressão de genes em tecido adiposo e tipos celulares não-epiteliais			Não definido

3.5 CARCINOMA MUCINOSO

Carcinoma mucinoso da mama (também conhecido como carcinoma colóide) é um tipo histológico especial de câncer. Estes tumores são incomuns, representam cerca de 2% dos carcinomas da mama invasivos e são tipicamente associados a um prognóstico favorável, pois não é comumente envolvido à invasão linfonodal e apresenta uma baixa taxa de recidiva (BARKLEY et al., 2008; CHANG et al., 2009; HA e DELEON, 2013). Sua baixa incidência e seu baixo comprometimento quanto a sobrevivência da paciente não desperta muita atenção para sua investigação. Esse carcinoma tende a ocorrer em mulheres com idades mais avançadas (55-60 anos) e após menopausa (BAE et al., 2011)

Estes tumores são caracterizados pelo acúmulo extracelular de glicoproteínas ricas em carboidratos conhecidas como mucinas (CHANG et al., 2009; BAE et al., 2011). As mucinas são glicoproteínas complexas secretadas principalmente por células epiteliais especializadas e do tecido conjuntivo e tem como função, desempenhar um papel protetor dos tecidos compostos por células epiteliais. Além disso, acredita-se que elas estão envolvidas em diversos processos, como diferenciação epitelial, modulação da adesão celular e sinalização celular. No câncer de mama a mucina está associada com a progressão maligna, adesão célula-célula, vigilância imunológica, modulação do potencial proliferativo, invasivo e metastático das células tumorais (ZANETTI, SILVA, 2010; MUKHOPADHYAY et al., 2011).

O carcinoma mucinoso, pode ser classificado em dois subtipos: puro e misto. Para que um carcinoma mucinoso seja diagnosticado puro, é necessário que pelo menos 90% do tumor tenha componente mucinoso. Caso tenha menos de 90%, ele é considerado misto, estes são comumente associados ao carcinoma ductal invasivo puro (sem subclassificação) o qual contribui com metástase para os linfonodos axilares e cujo prognóstico é frequentemente reservado (BAE et al., 2011).

Macroscopicamente o carcinoma mucinoso apresenta-se bem definido, circunscrito, ou com uma massa gelatinosa, com tamanho médio de 2cm. Os achados microscópicos revelam ninhos de células tumorais ou trabéculas dentro de grandes lagos de mucina e apresentam pleomorfismo nuclear moderado (Figura 05). Além disso, essa neoplasia é comumente associada a positividade para RE, RP e negatividade para HER-2 (CORBEN, 2013).

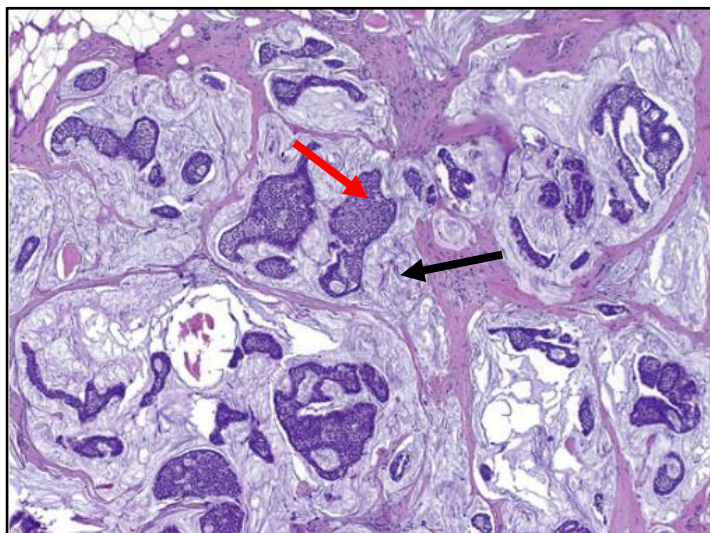


Figura 05. Histológica de um carcinoma mucinoso de mama indicando o componente celular (seta vermelha) e o mucinoso (seta preta). Amplificação 4x. (Fonte: CORBEN, 2013).

3.6 HIPÓXIA

Hipóxia ou deficiência de oxigênio é uma característica saliente e localmente avançada em tumores sólidos, esse fato é resultante do desequilíbrio entre a oferta e consumo de oxigênio. Os principais fatores causadores de hipóxia no microambiente tumoral são a estrutura e função anormal dos microvasos que irrigam o tumor e o aumento da distância de difusão entre os vasos sanguíneos nutritivos e as células tumorais (SALVADOR, 2012).

A formação de um ambiente hipóxico intratumoral promove uma gama de alterações biológicas, tais como aumento da transcrição e expressão gênicas, seleção de clones resistentes a apoptose, indução da invasão e metástase, redução da expressão de genes de reparo do DNA e maior instabilidade genômica para adaptar-se ao ambiente mais hostil tornando-as mais agressivas (WARTENBERG et al., 2003; RUAN et al., 2009; YOSHIMURA et al., 2013). As células tumorais hipóxicas tendem a ser mais agressivas em sua natureza e mais resistentes aos tratamentos disponíveis quando comparadas as células tumorais não hipóxicas dentro do mesmo tumor, apesar de sua base genética similar (KIM et al., 2009).

A hipóxia já é considerada um fator de prognóstico independente para progressão da doença e estudos clínicos tem demonstrado que pacientes com tumores hipóxicos ($pO_2 \leq 10$ mmHg) tem maior probabilidade de recorrência local e metástase (RUAN et al., 2009; VAUPEL; MAYER, 2007; FRIEDL et al., 2011).

A ampla resposta celular desencadeada pela hipóxia é mediada pelo HIF-1 α (fator indutor de hipóxia). Este é uma proteína heterodímera reconhecida como uma das mais importantes influências do microambiente no comportamento tumoral fazendo com que as células tumorais adquiram um fenótipo mais agressivo e se tornem resistentes à quimioterapia e radioterapia. HIF-1 α é transcrito continuamente, em condições de normóxia, contudo é mantido em níveis muito baixos por uma rápida degradação via sistema ubiquitina-proteossoma. Por apresentar uma expressão constitutiva, as moléculas que modulam a expressão dele adquirem um papel central no fornecimento de informações diagnósticas, prognósticas e preditivas (RUAN et al., 2009; FRIEDL et al., 2011; YOSHIMURA et al., 2013).

3.7 BRCA1 e BRCA2

Embora apenas 10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários, acredita-se que os genes envolvidos no processo de carcinogênese desempenhem papel importante também nos casos esporádicos. Em linhas gerais, a aquisição de alterações genéticas (mutações, polimorfismos) ou epigenéticas (hipermetilação da região promotora do gene), em genes reguladores do ciclo celular, responsáveis pela apoptose, ou genes de reparo do DNA é fundamental para que a célula ganhe autonomia. Dessa forma, a célula pode se desenvolver independentemente dos controles interno e externo (BERTRAM, 2001; KIM, CHOI, 2013).

Em 1990 foi localizado o primeiro gene de susceptibilidade ao câncer de mama, o *Breast Cancer 1* (BRCA1), no cromossomo 17q21 que compreende 24 exons, codifica uma proteína com 1863 aminoácidos e apresenta dois domínios conservados, um localizado na região N-terminal e outro na região C-terminal da proteína. Dentre as funções desempenhadas por este gene, destacam-se atividade de reparo do DNA, regulação transcricional, progressão do ciclo celular e inativação meiótica de cromossomo sexual. Pouco tempo depois outro gene de susceptibilidade ao câncer, o *Breast Câncer 2* (BRCA2) foi localizado no cromossomo 13q12 possui 27 exons,

codifica uma das maiores proteínas humanas, com 3.418 aminoácidos e desempenha um importante papel no reparo do DNA por recombinação homóloga. Ambos, BRCA1 e BRCA2, são genes supressores de tumor e encontram-se frequentemente inativados no desenvolvimento do câncer de mama, levando ao surgimento de instabilidade genômica, representada por translocações, duplicações e fusões aberrantes entre cromossomos não-homólogos ((BOULTON, 2006; KIM, CHOI, 2013).

No câncer, é comum haver perda da expressão das proteínas codificadas pelos genes BRCA1 e BRCA2, este fenômeno pode ser verificado através da técnica de iminohistoquímica. Sabe-se, que o padrão de marcação imunohistoquímico dos BRCA's é diferente no tecido normal e neoplásico. Enquanto a marcação no epitélio normal é exclusivamente nuclear, nos carcinomas pode ser exclusivamente nuclear, predominantemente nuclear, predominantemente ou exclusivamente citoplasmática, devido a mutações em alelos que controlam o direcionamento da proteína até o núcleo (CHAMBON et al., 2003; AL-MULLA et al., 2005; SILVA et al., 2005; TULCHIN et al., 2010; JEYASEKHARAN et al., 2013).

Na célula normal, as proteínas codificadas pelos genes BRCA1 e BRCA2 é sintetizada no citoplasma e transportada ao núcleo, local onde desempenha seu papel de checkpoint do ciclo celular, regulação da transcrição, reparação do DNA, ubiquitinação de proteínas e apoptose (SILVA et al., 2005; DACHEUX et al., 2013).

A ausência ou expressão diminuída das proteínas BRCA1 e BRCA2 pode ser explicada devido as possíveis mutações do tipo *frameshift* (frequentes nestes genes) que ocorram antes da região onde o epítipo reconhecido pelo anticorpo está localizado, podem causar a perda da sequência deste epítipo e consequentemente resultar em uma imunohistoquímica sem marcação (WANG et al., 2012). Outro fator que pode estar relacionado é o silenciamento gênico via hipermetilação na região promotora dos genes, tendo como consequência, um efeito semelhante ao da mutação (ESTELLER et al., 2005; BEN et al., 2012; HSU et al., 2013).

3.8 GLICOSILAÇÃO E CÂNCER

A glicosilação é uma modificação ubíqua que ocorre nos organismos superiores após a tradução, e corresponde a uma ligação covalente de um carboidrato a uma proteína ou lipídeo catalisada por glicosiltransferases. Essa modificação permite que estas moléculas adquiram diferentes funções, proporcionando uma grande diversidade estrutural que justifica o fato da diversidade biológica não se correlacionar com o baixo número de genes do genoma humano (FUSTER e ESKO, 2005).

É estimado que 50% de todas as proteínas das células dos mamíferos são glicosiladas em um determinado momento. A adição de carboidratos pode influenciar a carga, a conformação e a estabilidade das proteínas, conferindo heterogeneidade a biomoléculas, tendo como consequência direta o surgimento de várias glicoformas possíveis, ou seja, glicoformas heterogêneas da mesma proteína com propriedades ou atividade biológica diferentes (Figura 06). Alterações nesse processo estão associadas com muitos eventos normais e patológicos, tais como interação parasita-hospedeiro, diferenciação, migração, tráfego celular, sinalização, invasão e metástase (LAZAR et al., 2011; GHAZARIAN et al., 2011).

São descritos dois tipos principais de glicosilação: a N- e a O-glicosilação. A maioria dos glicoconjugados encontra-se sob a forma do tipo N-, caracterizado pela união de uma N-acetilglucosamina a um resíduo de asparagina. Diferente desta, a O-glicosilação mais comum se dá pela união de um resíduo de N-acetilgalactosamina à serina ou treonina presentes no esqueleto polipeptídico (FUSTER e ESKO, 2005).

Todos os tipos de células malignas demonstraram alterações em seus padrões de glicosilação quando comparados às células normais. A glicosilação aberrante pode ser alterada de várias maneiras gerando estruturas de glicanos que funcionam como marcadores que podem ser utilizados para diagnóstico e prognóstico (POWLESLAND et al., 2009).

A maioria das glicosilações aberrantes frequentemente resulta num encurtamento das cadeias dos glicanos ou uma super-expressão dessas estruturas nas células (GUILLOT et al., 2004). A variação estrutural dos glicanos de superfície celular durante a glicosilação produz marcadores variados, alguns dos quais se correlacionam com a diferenciação, ativação celular e doenças. Por isso, esses glicanos têm sido foco de muitas vertentes de investigação, principalmente com a intenção de novas estratégias para prevenção e terapia do câncer, pois algumas células cancerosas utilizam cadeias de

carboidratos para escapar do reconhecimento imunológico, além de migrar através da corrente sanguínea (OHTSUBO, MARTH, 2006; JANKOVIC; KOSANOVIC; MILUTINOVIC, 2008).

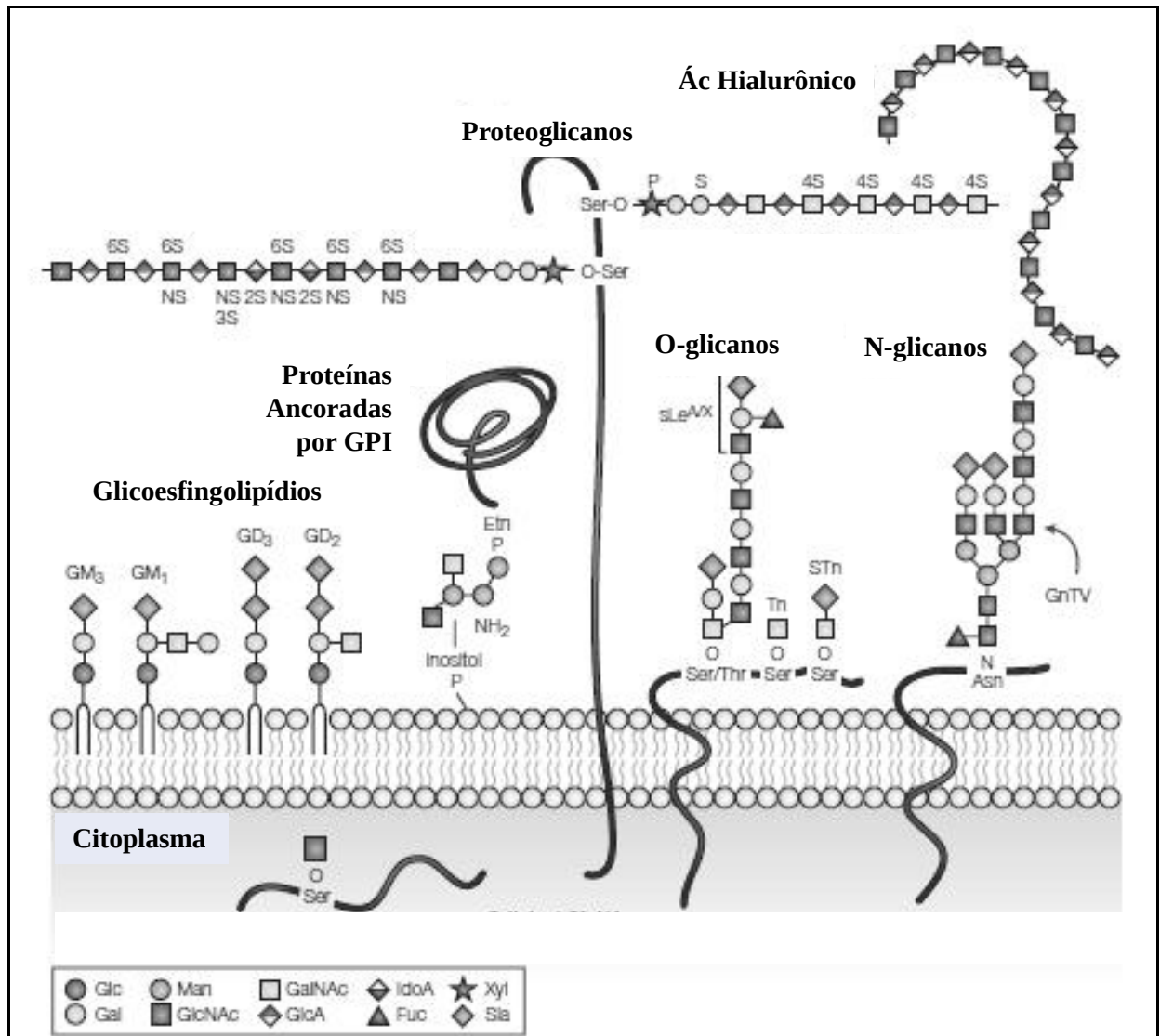


Figura 06: Glicocódigo de glicoconjugados de superfície celular. Os glicoconjugados estão envolvidos em funções especializadas nos vários tipos celulares nos tecidos normal e transformados (Fonte: FUSTER, ESKO, 2005).

3.9 MGAT5/GNT V (B1,6-N-ACETILGLUCOSAMINILTRANSFERASE V)

Dentre as glicosiltransferases, as N-acetilglucosaminil transferases (GnTs) estão diretamente envolvidas no poder de invasão do tumor. Essas enzimas são capazes de adicionar carboidratos específicos a proteínas presentes na membrana ou matriz extracelular. A superprodução da enzima MGAT5/GnT-V, uma N-acetilglucosaminil transferase, aumenta a ramificação da β -1,6-GlcNAc, e devido a este aumento a célula já não é capaz de aderir às subunidades do receptor integrina (proteínas transmembranas envolvidas na ancoragem de células através de sua matriz extracelular), o que leva a modificações nas propriedades de adesão celular, permitindo que as células alcancem a corrente sanguínea ou linfática, levando ao mecanismo de metástase (GUO; RANDOLPH; PIERCE, 2007; LI et al., 2008).

Vários estudos com tecidos tumorais relatam a associação entre a elevada imunomarcagem desta enzima com a progressão tumoral e metástase, entre eles o câncer colón retal, o melanoma, o câncer de pulmão, o câncer de esôfago, o câncer do endométrio, o câncer gástrico e o câncer de ovário. GRANOVSKY et al. (2000) nocautearam o gene MGAT5 em camundongos e observaram a redução do crescimento tumoral e metástase, sugerindo que inibidores de MGAT5 podem ser úteis no tratamento de neplasias malignas (GRANOVSKY et al., 200; HANDERSON; PAWELEK, 2003; DOSAKA-AKITA et al., 2004; ISHIBASHI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2007; LI et al., 2008; TAKAHASHI et al., 2009).

A expressão da MGAT5 é reduzida ou inexistente no tecido mamário normal ou hiperplásico (FERNANDES et al., 1991), ao passo que no câncer de mama, o aumento da expressão dos produtos glicanos da MGAT5 está associada à progressão tumoral, metástase nodal e prognóstico reservado, fatos que provavelmente resultam da sua atividade em induzir alterações funcionais em vários substratos envolvidos na progressão tumoral (HANDERSON et al., 2005; SIDIQI et al., 2005). Além disso, recentes estudos relatam que a atividade desta enzima na promoção da mobilidade das células tumorais e metástase está relacionada à instabilidade da adesão célula-célula, à remodelação da matriz extracelular e à migração das células metastáticas (BOSCHER; NABI, 2013). Por outro lado, a supressão da expressão e atividade da MGAT5 resulta na diminuição da mobilidade e invasão das células tumorais mamárias (GUO; RANDOLPH; PIERCE, 2007).

3.10 LECTINAS

Na década de 1880 começaram a se observar a existência na natureza de proteínas com habilidade de aglutinar eritrócitos. Por este motivo estas proteínas foram denominadas hemaglutininas, ou fitoaglutininas, por terem sido originalmente encontradas em extratos de plantas. Historicamente se atribui a primeira descrição de uma hemaglutinina a Peter Hermann Stillmark na sua tese de doutorado defendida em 1888 (SHARON, 2007).

Mais de meio século depois, em 1952, foi demonstrada que a atividade aglutinante estava relacionada a especificidade de ligação entre a hemaglutinina e seu carboidrato correspondente (VAN DAMME, 2011).

O termo lectina refere-se a sua especificidade da ligação, do latim *legere* que significa escolhido, selecionado e foi proposto por Boyd e Sharpleigh, em 1954. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que reconhecem e se ligam a carboidratos específicos de maneira específica, por meio de ao menos, dois sítios de ligação ao carboidrato, através do domínio de reconhecimento a carboidratos. Estas moléculas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares, pluricelulares e plantas (RABINOVICH et al., 2007; MAURYA et al., 2010).

Lectinas endógenas participam de vários processos biológicos, tais como, reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação patógeno-hospedeiro, dobramento e endereçamento de glicoproteínas, indução mitogênica e homeostase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Por causa de sua capacidade em reconhecer e ligar-se a glicanos específicos, associada à mudança no perfil de expressão de carboidratos de superfície nas células, as lectinas se apresentam como ferramentas histoquímicas valiosas na identificação e monitoramento de mudanças na glicosilação de glicoconjugados durante diferenciação celular e transformação neoplásica (BELTRÃO et al., 1998; 2003; FUSTER, ESKO, 2005; LIMA et al., 2010).

A histoquímica com lectinas (HqL) pode ser empregada como ferramenta auxiliar e complementar no diagnóstico realizado com imunohistoquímica (IHQ), rotineiramente utilizada em laboratórios de anatomia patológica. Além disso, esta

técnica é sensível, estável e de fácil manipulação, contribuindo com informações sobre o desenvolvimento, estágios de diferenciação, grau de malignidade e potencial do tecido em desenvolver metástase a partir do estabelecimento de perfil de carboidratos do tecido estudado (MELO-JÚNIOR et al., 2006; SOBRAL et al., 2010).

A família das leguminosas é a maior fonte de lectinas utilizadas em pesquisas (SHARON, 2007). Específica para resíduos de α -N-acetilgalactosamina (GalNAc) e seus derivados a lectina de *Helix pomatia* (HPA) tem sido explorada, entre outras aplicações, como sonda na identificação dos tipos de câncer que têm o potencial metastático, por reconhecer uma gama diversificada de glicoproteínas chave envolvidos nas vias relacionadas com a proliferação de células cancerígenas e invasão (SANCHEZ, 2006; MARKIV, 2011). HPA é considerada uma sonda para resíduos de GalNAc o qual é um marcador de prognóstico reservado para o adenocarcinoma da mama (CHEN et al., 2007).

A lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A (Con A) reconhece especificamente resíduos de α -D-manose ou α -D-glicose de glicanos ou livres, exibindo alta afinidade por oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípídios de superfície celular. Sua estrutura molecular é composta por duas subunidades idênticas de 237 resíduos de aminoácidos de 25,5 KDa cada uma (CHATTERJEE; MANDAL, 2005; DAM, BREWER, 2002; SHARON, 2007). Con A tem se mostrado ser uma sonda glicídica de malignidade eficaz no câncer de mama. CAMPOS et al. (2006) observou uma expressão diferenciada em células de tecidos normal e neoplásico deste órgão.

Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I) reconhece especificamente resíduos de L-fucose e forma um homotetrâmero com peso molecular 63 KDa (MEISSNER et al., 1995). Estes resíduos de carboidrato estão presentes na porção mais externa dos glicoconjugados de superfície celular, como já observado nas células endoteliais, ceratinócitos e células das glândulas ecrínas da pele, tanto no tecido normal como durante modificações moleculares que acontecem em diversas patologias. Esta lectina se apresenta como uma sonda eficiente para evidenciar proliferação ou depleção de tipos celulares específicos (MELO-JUNIOR, 2003). Além de ser amplamente utilizada como sonda para a caracterização histoquímica de vários tipos de células em vários estágios de diferenciação e maturação de câncer (LIMA et al, 2010).

Isolada do amendoim *Arachis hypogaea* a Peanut agglutinin (PNA) possui especificidade pela sequência Gal- β (1-3)-GalNAc e apresenta estrutura multimérica

com quatro monômeros idênticos de ligação a carboidratos com peso molecular de 110 KDa. Sua especificidade foi descoberta devido a sua habilidade em aglutinar linfócitos T tornando-a uma ferramenta molecular para investigar mudanças em glicoconjugados, principalmente glicoproteínas como as galectinas, em tumores (SHARON, 2007).

Um grande número de lectinas, de origem vegetal, tem sido empregado como ferramenta histoquímica no diagnóstico histopatológico. O Grupo Biomarcadores no Câncer (BmC) da UFPE tem empregado a histoquímica com lectinas e a imunohistoquímica para avaliar o perfil de carboidratos e a expressão de proteínas de filamentos intermediários de tecidos humanos e animais. A tabela 2 apresenta alguns artigos científicos publicados.

Tabela 02: Publicações mais recentes do BmC utilizando histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e outras técnicas.

Tecido	Referência
Mamário humano (doença fibrocística, fibroadenoma, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal <i>in situ</i>)	Beltrão et al., 1998, 2001 Campos et al., 2006 Santos et al., 2006 a; 2006b Brunstein et al., 2011 Rêgo et al., 2009; 2010; 2013a; 2013b; 2013c Bandeira et al., 2012 Santos et al., 2010 Santos et al., 2012
Pele Humana (carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide, tricoepidermóide, ceratocantoma, ceratose seboréica, ceratose aqtínica)	Melo-Júnior et al., 2006 Ferreira et al., 2013a; 2013b Melo et al., 2006
Cólon Humano (coliti ulcerativa)	Melo-Júnior et al., 2004
Nervoso Humano (meningioma)	Beltrão et al., 2003
Glândula Salivar e Dentição Humanas	Rêgo et al., 2005, 2011 Sobral et al., 2010 Iglesias et al., 2012
Mucosa Gástrica Humana (<i>H. pylori</i>)	Melo-Júnior et al., 2008 ^a
Hepático Humano (esquistossomose)	Guimarães et al., 2008 Melo-Júnior et al., 2008b
Próstata Humana (adenocarcinoma e hiperplasia)	Lima et al., 2010 De Albuquerque Vasconcelos et al., 2013

3.11 GALECTINAS 1 E 3

Inicialmente chamadas de S-lectinas, galectinas representam o grupo de proteínas mais comumente expressas dentre as lectinas em todos os organismos. São provavelmente a mais antiga classe de proteínas ligadoras de glicanos conhecidas até hoje e são encontradas desde metazoos, esponjas, fungos até invertebrados e vertebrados. Elas apresentam uma sequência contendo aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e possuem afinidade por β -galactosídeos presentes nas células normais e tumorais. (LEFFLER, 2001; RABINOVITCH et al., 2011).

As galectinas estão envolvidas em vários processos biológicos nos organismos, tais como interações célula-célula e célula-matriz extracelular, resposta imune, adesão celular, apoptose e metástase. Estas galectinas se ligam especificamente a proteínas da matriz como laminina, fibronectina e integrinas através de ligações dependentes de carboidratos (FUKUMORI, KANAYAMA, 2007; HAUDEK, PATTERSON, WANG, 2010).

A Galectina-1 (Gal-1) é uma proteína de apenas 14Kd, suas funções dependem da sua ligação a receptores específicos, tais como laminina, proteínas de membrana, fibronectina que estão localizados na superfície celular ou matriz extracelular. Tais ligações proporcionam as galectinas a participarem de processos chave, como apoptose, regulação do ciclo celular, adesão célula-célula, célula-matriz extracelular, além de atuar como um regulador negativo de respostas auto-imunes e inflamatórias (DEMYDENKO, BEREST, 2009).

Gal-1 tem sido expressa em vários tumores, como mama, melanoma, tumores ovarianos, tireoidianos, cérebro e adenocarcinoma de útero (ELOLA et al., 2005; DEMYDENKO, BEREST, 2009). No câncer de mama a Galectina-1 parece estar associada às células estromais, este fenômeno foi observado por LE e colaboradores (2011), eles encontraram uma forte correlação entre a imunexpressão de Gal-1 com as células estromais associadas ao tumor, além de invasão linfonodal e estadiamento TNM, por funcionar como reguladora negativa da ativação de células T promovendo a fuga do sistema imunológico dessas células e conferirem privilégio imunológico (NAJAR et al., 2010).

A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina intracelular e extracelular, que interage com glicoproteínas da matrix extracelular. Ela pode ser expressa tanto em células normais, quanto em células neoplásicas, inclusive nas células do sistema imunológico. No câncer, sua expressão está correlacionada com invasão tumoral e potencial metastático, regulando o crescimento, adesão e proliferação celular, bem como angiogênese e

apoptose. Nas células tumorais, a Gal-3 é encontrada predominantemente no citoplasma, porém ela pode ser detectada no núcleo, apresentando funções distintas, no citoplasma ela pode atuar como inibidor apoptótico e promotor tumoral, aumentando a capacidade de invasão, crescimento independente de ancoragem, crescimento tumoral *in vivo*, angiogênese e diminuição da indução de apoptose, no núcleo atua como moduladora positiva da progressão tumoral induzindo a expressão de genes pró-neoplásicos (RABINOVITCH et al., 2011).

3.12 MARCADORES NA ROTINA DIAGNÓSTICA

Atualmente são utilizados como alvo na rotina clínica para o diagnóstico de câncer de mama os receptores hormonais (Receptor de Estrógeno - RE e Receptor de Progesterona - RP), o receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) e a proteína de proliferação celular (Ki-67) de acordo com o Consenso de Saint Gallen (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013).

Para esta finalidade a imunohistoquímica (IHQ) é uma ferramenta valiosa no diagnóstico e investigação de neoplasias e doenças infecciosas bem como na pesquisa básica para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas expressas em diferentes partes de um tecido biológico (RAMOS-VARA; 2008).

A expressão dos receptores hormonais RE, RP e a superexpressão ou amplificação do HER-2 foram identificadas como importantes fatores preditivos entre as pacientes com câncer de mama. Esses marcadores são usados para definição do tratamento e estabelecimento do prognóstico da doença, associados às variáveis clínicas e patológicas, tais como o envolvimento linfonodal, tamanho do tumor, tipo histológico, grau do tumor e margens cirúrgicas (KARGER, 2010; CINTRA et al., 2012).

Aproximadamente dois terços dos tumores da mama expressam ativação para RE e RP no núcleo tumoral e, portanto, são candidatos à terapia antiestrogênica. Clinicamente a terapia endócrina com drogas anti-estrógenos ou inibidores da aromatase são utilizadas nos casos em que os tumores apresentam ER+. Neste caso o anti-estrógeno Tamoxifeno® liga-se ao receptor tornando-o não funcional, enquanto os inibidores de aromatase reduzem os níveis de estrógenos. Outros 20% apresentam amplificação para HER-2 e podem se beneficiar de terapia alvo-dirigida, com a droga Trastuzumab®, que é um anticorpo monoclonal que pode ser usado isolado ou

associado à quimioterapia, reduzindo o risco de recidiva em 50%, quando usado em indicação de adjuvância (IKEDA; INQUE, 2004; CINTRA et al., 2012).

Contudo, análise de biomarcadores, além de seu valor diagnóstico e prognóstico, possibilita uma melhor compreensão da biologia do tumor influenciando como preditivos de maior sucesso quanto à escolha da conduta terapêutica a ser adotada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Artigo 1: Biópsias de pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) (n=31, com idade média de 54,3 anos), diagnosticadas no ano de 2013, foram adquiridas no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). A presença de carcinoma inflamatório ou medular foi considerada como critério de exclusão das amostras. As informações clínico-histopatológicas (idade, grau nuclear e invasão linfonodal) das pacientes foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

Artigo 2: Biópsia de carcino mucinoso diagnosticado em 2003 foi adquirido no Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e as informações clínico-histopatológicas (idade, marcadores moleculares para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2; e Ki-67, estadiamento T2, N0 e M0) foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística da UFPE. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

Artigo 3: Biópsia de carcino ductal invasivo diagnosticado em 2013 foi adquirido no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e as informações clínico-histopatológicas (idade, marcadores moleculares para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2; e Ki-67, de grau histológico 2) foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

Artigo 4: Biópsia de carcino mucinoso com componente ductal invasivo diagnosticado em 2013 foi adquirido no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e as informações clínico-histopatológicas (idade, marcadores moleculares para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2, estadiamento T2, N2 e M1) foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

4.2 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Os protocolos foram desenvolvidos de acordo com BELTRÃO et al. (1998). Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol, hidratados em álcool etílico (100% e 70%), tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e incubados com solução de metanol (0,3%) e H₂O₂ por 30 mi a 25°C. Os tecidos foram, então, incubados com as lectinas conjugadas a biotina, separadamente, por 2 horas à

4°C. A ligação lectina-carboidrato foi visualizada com o kit estreptavidina-biotina-HRP e revelada com uma solução de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Todas as lavagens, entre as etapas descritas, foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2, suplementado com NaCl 150mM (PBS). As reações de controle negativo foram realizadas com omissão das lectinas. Os controles positivos foram aqueles descritos pelo fabricante.

Tabela 01: Lectinas, especificidades e suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho.

Lectinas	Concentração	Especificidade	Fabricante
Con A	80µg/mL	D-manose/D-glicose	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
HPA	80µg/mL	GalNAc	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
PNA	80µg/mL	β-D-Gal(1,3)-GalNAc	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
UEA-I	80µg/mL	L-fucose	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

GalNAc: N-acetil-galactosamina; Gal: galactose.

4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por RÊGO *et al.* (2011). Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6,0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de albumina sérica bovina (BSA em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 suplementado com NaCl 150mM - PBS) a 3% por 45 minutos a 25°C. Na etapa seguinte, os tecidos foram incubados com os anticorpos monoclonais (Tabela 2) por 16h a 4°C. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o kit biotina-estreptavidina-HRP e sua revelação com diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Todas as lavagens, entre as etapas descritas, foram realizadas com PBS. As reações de controle negativo foram realizadas com omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram aqueles descritos pelo fabricante.

Tabela 02: Anticorpos e suas respectivas diluições utilizadas neste trabalho.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
MGAT-5	HPA010919	1:50	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA.
BRCA1	I-20	1:150	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA
BRCA2	H-299	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA
HIF-1 α	H-206	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA
Gal-1	-	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA
Gal-3	-	1:150	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA
Ki-67	-	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA

4.4 ANÁLISE DIGITAL DAS IMAGENS

Foi utilizado um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon,USA). As análises das células marcadas foram realizadas utilizando três áreas independentes e aleatórias em cada amostra.

4.5 *Cut off*

Para análise da expressão de BRCA1 e BRCA2 foram considerados positivos aqueles tumores com marcação: 0 (negativa), + (positiva em menos de 25% das células neoplásicas), ++ (positiva entre 25% e 50% das células neoplásicas) e +++ (positiva em mais de 50% das células neoplásicas) (SILVA et al., 2005). Para MGAT-5 foi utilizado o *cut off* descrito por DOSAKA-AKITA et al. (2004) que estabelece a positividade para $\geq 10\%$ das células tumorais. A análise da expressão da HIF-1 α seguiu os critérios descritos por BOS et al. (2005) e VAN DER GROEP et al. (2013) que estabelece a positividade nuclear para $\geq 10\%$ das células tumorais. A avaliação da marcação das lectinas foi de acordo com DORNELAS (2009): negativo para ausência de marcação, fraca para menos $< 30\%$ das células neoplásicas, moderada para $< 60\%$ das células neoplásicas e intensa para $\geq 60\%$ das células neoplásicas.

4.6 ASPÉCTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CAAE 06586612.9.0000.5208– Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada através do software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As

diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 REFERÊNCIAS

ABD EL-REHIM, D.M.; PINDER, S.E.; PAISH, C.E.; BELL, J.; BLAMEY, R.W.; ROBERTSON, J.F. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*, v.203, n.2, p.661-671, 2004.

ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. Textbook of Cancer Epidemiology. 2nd ed.: Oxford University Press, 2008.

AL-MULLA, F.; ABDULRAHMAN, M.G.; VARADHARAJ-AKHTER, N.; ANIM, J.T. BRCA1 gene expression in breast cancer: a correlative study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, v.53, p.621-629, 2005.

BAE, S.Y.; CHOI, M.Y.; CHO, D.H.; LEE, J.E.; NAM, S.J.; YANG, J.H. Mucinous carcinoma of the breast in comparison with invasive ductal carcinoma: clinicopathologic characteristics and prognosis. *J Breast Cancer*, v.14, p.308-313, 2011.

BANDEIRA, A.R.G.; BRANDÃO, J.M.; VASCONCELOS, J.L.A.; CAVALCANTI, C.L.B.; ALVES-JUNIOR, S.; BELTRÃO, E.I.C. Evaluation of Lectins Conjugated to Cryptates of Europium (III) in Human Breast Tissues in Histochemistry. *Revista Saúde.com*, v.7, p.100-108, 2011.

BARKLEY, C.R.; LIGIBEL, J.A.; WONG, J.S.; LIPSITZ, S.; SMITH, B.L.; GOLSHAN, M. Mucinous breast carcinoma: a large contemporary series. *The American Journal of Surgery*, v.196, p.549-551, 2008.

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 Fac Med Univ Fed Pernam*, v.46, n1, p.32-35, 2001.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L.C.B.B. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissues. *Appl Biochem Biotechnol*, v.74, p:125-134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C.; MEDEIROS P.L.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M.M.; COELHO, L.C.B.B., CARVALHO-JR. L.B. *Parkia pendula* Lectin as Histochemistry marker for Meningothelial Tumour. *Europ J Histochem*, v.47, n.2, p.139-142, 2003.

BERTRAM, J.S. The Molecular Biology of Cancer. *Mol Asp Med*, v.21, p.167-223, 2001.

BOS, R.; VAN DIEST, P.J.; DE JONG, J.S.; VAN DER GROEP, P.; VAN DER VALK, P. Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis and expression of bFGF, PDGF-BB and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathol*, v.46, p.6-31, 2005.

BOSCHER, C.; NABI, I.R. Galectin-3- and phospho-caveolin-1-dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF motogenic response in mammary cancer cells. *Mol Biol Cell*, v.24, p.2134-2145, 2013.

BOULTON, S.J. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Transact*, v34, p.68-75, 2006.

BRUNTEIN, V.P.; CAVALCANTI, C.L.B.; MELO-JUNIOR, M.R.; CORREIA, M.T. S.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B. Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. *Appd Biochem Biotech*, v.166, p.268-275, 2012.

BURRELL, R.A.; MCGRANAHAN, N.; BARTEK, J.; SWANTON, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, v.501, p.338-345, 2013.

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, v.11, n.5, p.480-484, 2006.

CHAMBON, M. et al. Localization of BRCA1 protein in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, v.79, n.1, p.107-19, 2003.

CHANG, Y.W.; KWON, K.H.; LEE, D.W. Synchronous bilateral mucinous carcinoma of the breast: case report. *Clinic Imag*, v.33, p.62-66, 2009.

CHATTERJEE, A.;MANDAL, D. K.Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. *Int J Biol Macromol*, v.35, p.103-109, 2005.

CHEN, T.; HEVI, S.; GAY, F.; TSUJIMOTO, N.; HE, T.; ZHANG, B.; UEDA, Y.; LI, E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet*; v.39, p.391–6, 2007.

CINTRA et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Méd Brasil*, v.58, p.178-87, 2012.

CIRQUEIRA, M.B.; MOREIRA, M.A.R.; SOARES, L.R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. Molecular subtypes of breast cancer. *Femina*, v.39, n.10, p.499-503, 2011.

COMPAGNI, A.; GREENMAN, C. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Brit J Cancer*. v.83, n.1, p.1–5, 2007.

CORBEN, A,D. Pathology of invasive breast disease. *Surg Clin North Amer*, v.93, p.363-392, 2013.

COURNEYA, K.S. Physical activity in cancer survivors: a field in motion. *Psychooncol*, v.18, p.337-342, 2009.

DACHEUX, E.; VINCENT, A.; NAZARET, N.; COMBET, C.; WIERINCKX, A.S.; MAZOYER-DIAZ, J.J.; LACHUER, J.; VENEZIA, N.D. BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *Plos one*, v.8, p.67313, 2013.

DAM, T. K.; BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry, *Chem Rev*, v.102, p.387-429, 2002.

DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS, J.L.; FERREIRA, S.A.; LIMA, A.L.R.; RÊGO, M.J.B.M.; BANDEIRA, A.R.G.; CAVALCANTI, C.L.B.; LIRA, M.M.L.; BELTRÃO, E.I.C. Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Acta Histochem Cytochem*, v.46, p.105-109, 2013.

DEMYDENKO, D.; BEREST, I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol*, v.31, p.74-9, 2009.

DESANTIS, C. et al. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v.64, p.52-62, 2013.

DEY, P. Epigenetic changes in tumor microenvironment. *Indian J Cancer*. v.48, p.507-512, 2011.

DING, S.L. et al. Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br J Cancer*, v.90, p.1995-2001, 2004.

DORNELAS, M.T.; RODRIGUES, M.F.; MACHADO, D.C.; FERREIRA, A.P.; GOLLNER, A.M. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actínica. *Anais Bras Dermatol*, v.84, p.469–475, 2009.

DORSSERS, L.C. et al. The prognostic value of BRCA1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, v.10, p.6194-202, 2004.

DOSAKA-AKITA, H.; MIYOSHI, E.; SUZUKI, O.; ITOH, T.; KATOH, H. N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase v is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, v.10, p.1773-9, 2004.

ELOLA, M.T. et al. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci*, v.12, p.13-29, 2005.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol*, v.19, p.403-410, 1991.

ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol*, v.45, p.629-656, 2005.

FERNANDES, B.; SAGMAN, U.; AUGER, M.; DEMETRIO, M.; DENNIS, J.W. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res.*, v.51, p. 718-23, 1991.

FERREIRA, S.A.; SILVA, R.C.W.C.; CAVALCANTI, C.L.B.; RÊGO, M.J.B.M.; BELTRÃO, E.I.C. Expression patterns of α 2,3-Sialyltransferase I and α 2,6-Sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. *Eur J Histochem*, v.57, p.41-45, 2013a.

FERREIRA, S.A.; VASCONCELOS, J.L.; CAVALCANTI, C.L.B.; RÊGO, M.J.B.M.; BELTRÃO, E.I.C. Sialic Acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. *Med Molec Morphol*, v.46, p. 198-202, 2013b.

FRIEDL, P.; ALEXANDER S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, v.147, p.992-1009, 2011.

FUKUMORI, T., KANAYAMA, H.O, AVRAHAM, R. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resist Updates*, v.10, p.101-108, 2007.

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

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, v.113, p. 236-254, 2011

GNANT, M.; HARBECK, N.; THOMSEN. C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*, v.6, n.2, p.136–141, 2011.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *J Brasi Patol Med Laborat*, v.48, p.463-474, 2012.

GRANOVSKY, M.; FATA, J.; PAWLING, J.; MULLER, W.J.; KHOKHA, R.; DENNIS, J.W. Suppression of tumor growth and metastasis in *Mgat5*-deficient mice. *Nature Medicine*, v.6, p. 606-12, 2000.

GREENMAN, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. v.446, p.153,158, 2007.

GUILLOT, J., GUERRV, M., KONSKA, G., CALDEFIE-CHEZET, F., DE LATOUR, M., PENAULT-LIORCA, F. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull Cancer*, v. 91, p.141-58, 2004.

GUO, H.B.; RANDOLPH, M.; PIERCE, M. Inhibition of a specific N-glycosylation activity results in attenuation of breast carcinoma cell invasiveness-related phenotypes: inhibition of epidermal growth factor-induced dephosphorylation of focal adhesion kinase. *Biol Chem*, v.282, p.22150-22162, 2007.

GUIMARÃES, M.T.; MELO-JUNIOR, M.R.; COSTA SILVA, R.B.; CAVALCANTI, C.B.L.; BELTRÃO, E.I.C. Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovogranuloma hepático na esquistossomose humana e experimental *Rev Inst Adolfo Lutz*, v.67, n.1, p.59-63, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v.100, p.57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v.144, p.646-674, 2011.

HA, K.Y.; DELEON, P. Invasive mucinous carcinoma of the breast. Baylor University Medical Center, v. 26, p.295-297, 2013.

HANDERSON, T.; CAMP, R.; HARIGOPAL, M.; RIMM, D.; PAWELEK, J. β 1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. Clin Cancer Res, v.11, p.2969-2973, 2005.

HANDERSON, T.; PAWELEK, J.M. Beta1,6-branched oligosaccharides and coarse vesicles: a common, pervasive phenotype in melanoma and other human cancers. Cancer Res, v.63, p. 5363-9, 2003.

HARBECK, N.; THOMSEN, C.; GNANT, M. St. Gallen 2013: Brief Prelim Histopathol, v.52, n.1, p.108-18, Jan. 2008.

HARBECK, N.; THOMSEN, C.; GNANT, M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. Breast Care (Basel), v.8, n.2, p.102-109, 2013

HAUDEK K.C., PATTERSON R.J., WANG JL SR. Proteins and galectins: what's in a name? Glycobiol, v.10, p.1199-207, 2010

HSU, N.C.; HUANG, Y.F.; YOKOYAMA, K.K.; CHU, P.Y.; CHEN, F.M.; HOU, M.F. Methylation of brca1 Promoter Region Is Associated with Unfavorable Prognosis in Women with Early-Stage Breast Cancer. Plos one, v.8, e56256, 2013.

IKEDA, K.; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. Arch Histol Cytol, v. 67, p.435-442, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. (Acesso em 1 de Janeiro de 2014).

ISHIBASHI, Y.; DOSAKA-AKITA, H.; MIYOSHI, E.; SHINDOH, M.; MIYAMOTO, M.; KINOSHITA, I.; MIYAZAKI, H. T.; ITOH, KONDO, S.; NISHIMURA, M. N. TANIGUCHI. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the development of

human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby noncancerous lesions. *Oncol*, v.69, p. 301-10, 2005

IRWIN, M.L.; MAYNE, S.T. Impact of nutrition and exercise on cancer survival. *Cancer J*, v.14, p.435-441, 2008.

JANKOVIC, M.; KOSANOVIC, M.; MILUTONOVIC, B. Glycans as a target in the detection of reproductive tract cancers. *J Molecular Biol*, v.27, p.17-29, 2008.

JEYASEKHARAN, A.D.; LIU, Y.; HATTORI, H.; PISUPATI, V.; JONSDOTTIR, A.B.; RAJENDRA, E.; LEE, M.; SUNDARAMOORTHY, E.; SCHLACHTER, S.; KAMINSKI, C.F.; OFIR-ROSENFELD, Y.; SATO, K.; SAVILL, J.; AYOUB, N.; VENKITARAMAN, A.R. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature Struct Mol Biol*, v.20, p.1191–1198, 2013.

JUNTILA, M.R.; DE-SAUVAGE, F.J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, v.501, p.346-354, 2013.

KARGER, S.; FREIBURG, G.H. Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, v.5, p.185-187, 2010.

KIM, H.; CHOI, D.H. Distribution of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Asian Patients with Breast Cancer. *J Breast Can*, v.16, p.57-365, 2013.

KIM, Y.; LIN, Q.; GLAZER, P.M.; YUN, Z. Hypoxic Tumor Microenvironment and Cancer Cell Differentiation, *Cur Mol Med*, v.9, p.425-34, 2009.

KOPF, E.; ZHARHARY, D. Antibody arrays – an emerging tool in cancer proteomics. *Biochem Cell Biol*, v. 39, n.7-8, p.1305-1317, 2007.

KUSHI, L.H. et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Can J Clin*, v.62, p.30-67, 2012.

LANN, D.; LeROITH, D. The role of endocrine insulin-like growth factor-I and insulin in breast cancer. *J Mam Gland Biol Neoplas*. v.13, p.371-379, 2008.

LAZAR, I. M. et al. Recent advances in the MS analysis of glycoproteins: Theoretical considerations. *Electrophor*, v.32, p.3–13, 2011.

LEFFLER H. Galectins structure and function- A synopsis. *Results Probl Cell Differ*, v.33, p.57-83,2001.

LI, D. et al. Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4⁺ T cells and macrophages. *Journal of Immunology*, v.180, p.3158-3165, 2008.

LIMA, A.L.R., CAVALCANTI, C.C.B., SILVA, M.C.C., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B., BELTRÃO, CORREIA, M.T.S. Histochemical Evalution of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed lectin. *J Biomed Biotechnol*, v.5, p.1-6, 2010.

MAHONEY, M. C. et al. Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA: A Can J Clin*, v.58, p. 347-371, 2008.

MARKIV, A.; D. PEIRIS , CURLEY ,G.P.; ODELL, M.; DWEK, M.V. Identification, cloning, and characterization of twoN-acetylgalactosamine-bindinglectins from the albumengland of *Helix pomatia*. *J Biol Chem*, v.266, p.20.260-20.266, 2011.

MAURYA, S.D., AGGARWAL, S., DHAKAR, R.C., TILAK, V.K., PRAJAPATI, S.K. Targated delivery of drug to the colon with lectins and neoglycoconjugates: a review. *Inter J Pharmaceut Scienc Biotechnol*. v.1, n.4, p.178-194, 2010.

MEISSNER, A. L. W.; FEKRAZAD, M. H.; ROYCE, M. E. Breast disease: benign and malignant. Med Clin North Amer, v. 92, p.1115-1141, 2008.

MEISSNER, C. et al. L-fucose residues o cellulose-based dialysis membranes: quantification of membraneassociated l-fucose and analysis of specific lectin binding. Glycoconj J, v.12, p.632-638, 1995.

MELO, C.M.L.; LIMA, A.L.R.; BELTRÃO, E.I.C.; CAVALCANTI, C.C.B.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MELO-JÚNIOR, M.R.; ARAÚJO, J.L.; MACHADO, M.; MALTA, V.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO-JUNIOR, L.B. Digital analysis of skin neoplasmas evaluated by lectin histochemistry. J Brasil Pat Med Lab, v.42, n.4, p.455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin Staining Patterns in Human Gastric Mucosae With And Without Exposure to *Helicobacter pylori*. Braz J Microbiol, v.39, p.238- 240, 2008a.

MELO-JUNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Carbohydrates Detection in the Hepatic Egg-granuloma System Using Lectin Histochemistry. Inter J Morphol, v.26, p.967-972, 2008b.

MELO-JÚNIOR, M.R.; TELLES, A.M.S.; ALBUQUERQUE, F.E.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. J Brasil Pat Med Lab, v.40, n.3, p.102-104, 2004.

MUKHOPADHYAY, P.S.; CHAKRABORTY, P.P.; LAKSHMANAN, I.; JAIN, M.; BATRA, S.K. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. Biophys Acta, V.1185, p.224-240, 2011.

NAJAR, M.; RAICEVIC, G.I.D.; BOUFKER, H.; STAMATOPOULOS, B.D.E.; BRUYN, C.; MEULEMAN, N.; BRON, D.; TOUNGOUZ, M.; LAGNEAUX, L.

Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions. *Exp Hematol*, v.38, p. 922-32, 2010.

OHTSUBO, K., MARTH, J.D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, v.126, p.855-867, 2006.

POWLESLAND, A. S. et al. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiol*, v.19, p.899-909, 2009.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A.; JACKSON, S.S.; VASTA, G.R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol*, v.17, n.5, p.513-20, 2007.

RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I.O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* v.113, n.3, p.411-22, 2009.

RAMOS-VARA J.A. et al Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diag Investig*, v.20, p.393-413, 2008

RÊGO, M.J.B.M.; SANTOS, L.X.; SOBRAL, A.P.V.; CARVALHO-JÚNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin Histochemistry of Mucoepidermoid Carcinoma. *Oral Oncol Supplem*, v.1, n.1, p.178-179, 2005.

RÊGO, M.J.B.M.; BELTRÃO, E.I.C. Avaliação do glicocódigo do carcinoma ductal invasivo mamário e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. *Rev Brasil Ginecol Obstet*, v.31, p.626-626, 2009.

RÊGO, M.J.B.M.; CORDEIRO, M.F.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Análise da expressão de carboidratos no estroma do carcinoma ductal invasivo da mama e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. *Rev Brasil Mastol*, v.20, p.109-114, 2010.

RÊGO, M.J.B.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C.; SOBRAL, A.P.V.

Histochemical Localization of Carbohydrates in Morphological Stages of Developing Human Minor Salivary Glands: A Comparative Study with Cytoskeletal Markers. *Inter J Morphol*, v.29, p.604-613, 2011.

RÊGO, M.J.B.M.; MELO, G.S.V.; SANTOS, C.A.S.; CHAMMAS, R.; BELTRÃO, E.I.C. Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. *Med Molec Morphol*, v.1, p. 92-96, 2013a.

RÊGO, M.J.B.M.; CORDEIRO, M.F.; CAVALCANTI, C.L.B.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Immunohistochemiluminescence detection: A quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Mark*. v.34, p.373-377, 2013b.

RÊGO, M.J.B.M.; BELTRÃO, E.I.C. Prognostic and predictive biomarkers for hypoxic regions on breast cancer: advances and challenges. *J Brasil Patol Med Laborat*. v.49, p.67-70, 2013c.

REIS-FILHO, J.S, TUTT, A.N. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathol*, v.52, p.108-118, 2008.

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

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, F.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin's *Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SALVADOR, J.; DIAZ-CANO, T.. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable Application of Molecular Marker Design. *Inter J Mol Sci*, v.13, p.1951-2011, 2012.

SANCHEZ, J.F.; LESCAR, J.; CHAZALET, V.; AUDFRAY, A.; GAGNON, J.; ALVAREZ, R.; BRETON, C.; IMBERTY, A. MITCHELL, E.P. Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol Chem*, v.281, p.20171–20180, 2006

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.C.; ALVES-JR, S.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin Functionalized Quantum Dots for Recognition of Mammary Tumors. SPIE, 6096:60961-90962, 2006a

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.C.; ALVES-JR, S.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; BELTRÃO, E.I.C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with Concanavalin A lectin for recognition of mammary tumors, Physica Status Solidi C, v.3, n.11, p.4017-4022, 2006b.

SANTOS, C.A.S.; SILVA, R.C.W.C.; RÊGO, M.J.B.M.; LIMA M.C.C.A.; CAVALCANTI, C.B.L; BELTRÃO, E.I.C. Analysis of cell surface carbohydrate expression of in situ ductal carcinoma using lectin histochemistry and immunohistochemistry for p53. Appl Cancer Res, v.1, p.16-16, 2010.

SANTOS, P.B.; ZANETTI, J.S.; SILVA, A.R.; BELTRÃO, E. I. C. Beta-1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. Diag Pathol, v.7, p.104, 2012.

SCHMITT, F.C.L.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G.B. - Patologia. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.18, p.651-681, 2011.

SCHULZ, W.A. Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook. Springer, 2007.

SIDDIQUI, S.F.; PAWELEK, J.; HANDERSON, T.; LIN, C-Y.; DICKSON, R.B.; RIMM, D.L.; CAMP, R.L. Coexpression of β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase Vglycoprotein substrates defines aggressive breast cancers with poor outcome. Cancer Epidemiol Biomark Prev, v.14, p.2517-23, 2005.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. J Biol Chem, v.282, n.5, p.2753-2764, 2007.

SILVA, A.R. et al, Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas. J Brasil Patol, v.41, p.97-203, 2005.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C.H. TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. John Wiley & Sons editors, INC. 2002.

SOBRAL, A.P.V.; REGO, M.J.B.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; CARVALHO, L.B.J.; BELTRÃO, E.I.C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepithelioid carcinoma. J Oral Sci, v.52, p.49-54, 2010.

SOERJOMATARAM, I. et al. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. Lancet, v.380, p.1840-1850, 2012.

SONNENSCHN C, SOTO AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. Sem Can Biol, v.18, p.372-377, 2008.

STEPHENSON, G.D.; ROSE, D.P. Breast cancer and obesity: an update. Nut Cancer, v.45, p.1-16, 2003.

STEVENS, R.G. et al. Breast Cancer and Circadian Disruption From Electric Lighting in the Modern World. CA: Can J Clinic, v.680, p.106-108, 2013.

SUBA, Z. Triple-negative breast cancer risk in women is defined by the defect of estrogen signaling: preventive and therapeutic implications. Onco Targ Ter, v.7, p.147-164, 2014.

SWARTZ, M.A.; IIDA, N.; ROBERTS, E.W.; SANGALETTI, S.; WONG, M.H.; YULL, F.E.; COUSSENS, L.M.; DECLERCK, Y.A. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. Canc Res, v.72, p.2473-2480, 2012.

TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, E.; INO, K.; MIYOSHI, E.; NAGASAKA, T.; KAJIYAMA, H.; K SHIBATA.; NAWA, A.; KIKKAWA, F. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. Oncol Rep, v.22, p.1027-32, 2009.

TULCHIN N, CHAMBON M, JUAN G, DIKMAN S, STRAUCHEN J, ORNSTEIN L, BILLACK B, WOODS NT, MONTEIRO AN. BRCA1 protein and nucleolin colocalize in breast carcinoma tissue and cancer cell lines. *Amer J Pathol*, v.173, p.1203-1214, 2010.

VAN DAMME, E.J. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. *Meth Molec Biol*, v.753, p.289-297, 2011.

VAN DER GROEP, P.; VAN DIEST, P.J.; SMOLDERS, Y.H.; AUSEMS, M.G.; VAN DER LUIJT, R.B.; MENKO, F.H.; BART, J.; DE VRIES, E.G.; VAN DER WALL, E. HIF-1 α overexpression in ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Plos One*, v.8, p.1-7, 2013.

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome, *Can Metast Rev*, v.26, p.225-239, 2007.

VELASCO, I.B.G.; Coutiño, R.; Martínez, G.; Cruz, P.H. Marcadores Glicosilados en Cancer de Mama. *REB*, v.27, p.52-59, 2008.

ZANETTI, J. S.; SILVA, A. R. Mucinous invasive carcinoma of the breast and its differential diagnosis by core biopsy: review of the literature. *Bras Patol Med Lab*, v.46, p.99-104, 2010.

WANG, F.; FANG, Q.; GE, Z.; YU, N.; XU, S.; FAN, X. Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Repor*, v.39, p.2109-2118, 2012.

WARTENBERG, M. et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J*, v.17, p.02-0358, 2003.

WEINBERG, R.A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer. Disponível em <
<http://www.who.int/cancer/en/>> (Acesso em 03 de Fevereiro de 2014).

YAMAMOTO, E. et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis. *Brit J Can*, v.97, p.1538-1544, 2007.

YANG, Q. et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer*, v.92, p.54-60, 2001.

YOSHIMURA, M.; ITASAKA, S.; HARADA, H.; HIRAOKA, M. Microenvironment and radiation therapy. *Biomed Res Int*, v.1, p.2013:685308, 2013.

ZANETTI, J. S.; SILVA, A. R. Mucinous invasive carcinoma of the breast and its differential diagnosis by core biopsy: review of the literature. *Bras Patol Med Lab*, v.46, p.99-104, 2010.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1

INVESTIGANDO BRCA1, BRCA2, HIF-1 α E MGAT5 EM CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA

Bruno Trajano Barbosa¹, Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque¹, Moacyr Jesus
Barreto de Melo Rêgo^{1,2}, Horácio Mário Fitipaldi Júnior³, Eduardo Isidoro Carneiro
Beltrão^{1,2}

- 1- Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil;
- 2- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.
- 3 - Setor de Anatomia-patológica, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brasil.

*Correspondência para:

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

LIKA – UFPE. Avenida Professor. Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária

Recife – PE – Brasil - 50670-901

Telefone: +55 81 2126.8484

Fax: +55 81 2126.8485

E-mail: ebeltrao@hotmail.com

RESUMO

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum de câncer de mama formando um grupo heterogêneo no que diz respeito a características patológicas e evolução clínica. Neste sentido este trabalho objetivou avaliar a expressão das proteínas HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 e BRCA2 em tumores de mama humana diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica. As biópsias (n=31) foram adquiridas no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e as informações clínico-histopatológicas (idade, grau nuclear e invasão linfonodal) das pacientes foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. HIF-1 α apresentou correlação estatística direta com a invasão linfonodal (p=0,036), BRCA2 apresentou uma correlação inversa com o receptor de progesterona (p=0,02), MGAT5, embora com imunomarcção positiva não apresentou nenhuma correlação significativa os fatores clínico-histopatológico analisado (idade, invasão linfonodal e grau nuclear) nem com os marcadores de rotina no diagnóstico (receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER-2). Os resultados indicam que HIF-1 α e BRCA2 são capazes de serem correlacionados com parâmetros clínico-histopatológicos da rotina diagnóstica e que sua positividade auxilia na caracterização do carcinoma ductal invasivo.

Palavras-chave: Tumor mamário. Carcinoma. Hipóxia. Glicosiltransferases.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia que apresenta as maiores taxas de morbi/mortalidade de mulheres no Brasil e no mundo (INCA 2014). Dentre os tumores malignos de mama, os carcinomas representam o maior grupo e sua classificação histopatológica baseia-se no padrão de crescimento e características citológicas do tumor. O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum de câncer de mama invasivo, sendo responsável por até 70% a 75% dos casos. Estes tumores correspondem a um grupo heterogêneo no que diz respeito a características patológicas e evolução clínica (CORBEN, 2013).

A glicosilação aberrante ocorre essencialmente em todos os tipos de cânceres e muitos epítomos glicosil constituem antígenos associados ao tumor. Neste cenário as glicosiltransferases desempenham papel crucial no desenvolvimento e manutenção do

tumor, bem como um evento-chave na indução da invasão e metástase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Além disso, outro evento que possibilita as neoplasias a adquirirem um fenótipo mais agressivo é a formação de um ambiente hipóxico intratumoral. Este fenômeno promove alterações biológicas, como aumento da transcrição e expressão gênicas, seleção de clones resistentes a apoptose, indução da invasão e metástase (RYU et al., 2011).

Genes com atuação no controle e inspeção do ciclo celular precisam desempenhar suas funções de maneira precisa. Dentre estes os genes BRCA1 e BRCA2 são importantes (SILVA et al., 2005; DACHEUX et al., 2013). No processo de transformação maligna, mutações em seus alelos podem estar associados à hereditariedade do câncer de mama (TULCHIN et al., 2010; JEYASEKHARAN et al., 2013).

Diante deste contexto, a caracterização dos tumores quanto a moléculas que atuam na manutenção e malignidade destes se faz necessário para que auxiliando os biomarcadores de rotina diagnóstica possam permitir uma maior e melhor abordagem terapêutica. Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar a expressão das proteínas HIF-1 α , MGAT5, BRCA1 e BRCA2 em tumores de mama humana diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de Casos

Biópsias de pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) (n=31, com idade média de 54,3 anos), diagnosticadas no ano de 2013, foram adquiridas no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). A presença de carcinoma inflamatório ou medular foi considerada como critério de exclusão das amostras. As informações clínico-histopatológicas (idade, grau nuclear e invasão linfonodal) das pacientes foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP.

Imunohistoquímica

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por RÊGO et al., (2011). Cortes histológicos (4 μ m) foram desparafinizados em xilol e

hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6,0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de albumina sérica bovina (BSA em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 suplementado com NaCl 150mM - PBS) a 3% por 45 minutos a 25°C. Na etapa seguinte, os tecidos foram incubados com os anticorpos monoclonais (BRCA1, 1:150; BRCA2, 1:50; HIF-1 α , 1:100 – SANTA CRUZ, USA; MGAT5, 1:50 – SIGMA-ALDRICH, USA) por 16h à 4°C. A localização do anticorpo foi feita com o kit biotina-estreptavidina-HRP e sua revelação com DAB-H₂O₂. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com PBS. As reações de controle negativo foram realizadas com omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram aqueles descritos pelo fabricante. As lâminas foram analisadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1.

Cut off

Para análise da expressão de BRCA1 e BRCA2 foram considerados positivos aqueles tumores com marcação: 0 (negativa), + (positiva em menos de 25% das células neoplásicas), ++ (positiva entre 25% e 50% das células neoplásicas) e +++ (positiva em mais de 50% das células neoplásicas) (SILVA et al., 2005). Para MGAT-5 foi utilizado o *cut off* descrito por DOSAKA-AKITA et al., (2004) que estabelece a positividade para $\geq$ 10% das células tumorais. A análise da expressão da HIF-1 α seguiu os critérios descritos por BOS et al., (2005) e VAN DER GROEP et al., (2013) que estabelece a positividade nuclear para $\geq$ 10% das células tumorais.

Aspéctos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (CAAE 06586612.9.0000.5208– Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada através do software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As

diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HIF-1 α e a invasão linfonodal: uma correlação perigosa

O fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) apresentou correlação estatística direta com a invasão linfonodal ($p=0,036$ – Figura 1), não sendo observado com nenhum outro fator clínico-histopatológico analisado (idade e grau nuclear) nem com os marcadores de rotina no diagnóstico (receptor de estrógeno, receptor de progesterona e HER-2).

HIF-1 α é uma proteína associada à invasão linfonodal, ao elevado grau histológico, a tumores receptores hormonais negativos e ao baixo tempo livre de metástase, possuindo, assim, valor diagnóstico e prognóstico no câncer de mama (DALES et al., 2010). Ela é reconhecida como sinalizadora do microambiente hipóxico no tumor sendo capaz de influenciar as células tumorais para adquirirem um fenótipo agressivo e se tornarem resistentes à quimioterapia e radioterapia (MOELLER et al., 2007; COSSE, MICHIELS, 2008).

Além disso, HIF-1 α está relacionada à progressão tumoral e angiogênese, participando do controle da expressão de uma variedade de genes envolvidos na adaptação à deficiência de oxigênio e nutrientes que levam à sobrevivência celular, inibição da apoptose e indução de migração (SEMENZA, 2003; POWIS, KIRKPATRICK, 2010; RYU et al., 2011).

Estudos mostram que a expressão da HIF-1 α em carcinomas mamários é maior do que 50% dos casos analisados (GRUBER et al., 2004; BOS et al., 2005; KRONBLAD et al., 2006). Nossos resultados mostraram a positividade para HIF-1 α em 82% dos casos (23/28) avaliados e sua associada com a invasão linfonodal. Tal associação está em concordância o estudo de HAUPT et al., em 2010, comprovando a maior agressividade do CDI. KAYA et al. (2012) encontraram uma correlação entre HIF-1 α e o diagnóstico para pacientes com metástase linfonodal diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo RE e RP negativos e HER-2 positivo confirmando o prognóstico reservado destes casos de CDI. Interessantemente a superexpressão de HIF-1 α foi associada a uma taxa local de sobrevivência livre de doença em pacientes diagnosticados com carcinoma escamosos de boca, onde esta proteína se comportou

como um novo marcador de bom prognóstico pós-radioterapia (SANTOS et al., 2012) indicando um comportamento diferente daquele observado nos tumores da mama, mesmo estes dois tipos de glândulas (mamária e da cavidade oral) apresentarem organização histológica e anatômica relacionadas.

BRCA2 uma proteína influente

A proteína expressa pelo gene BRCA1 não apresentou correlação estatística com nenhum fator clínico-histopatológico analisados (idade, invasão linfonodal e grau nuclear) nem com os marcadores de rotina no diagnóstico (receptor de estrógeno, receptor de progesterona e HER-2).

Neste estudo o produto gênico do BRCA2 apresentou uma correlação inversa com o receptor de progesterona ($p=0,02$ – Figura 2). Nenhum outro fator clínico-histopatológico ou marcador de rotina no diagnóstico apresentou correlação significativa.

Com atividades no checkpoint do ciclo celular, regulação da transcrição, reparo do DNA, ubiquitinação de proteínas e apoptose, as proteínas codificadas pelos genes BRCA1 e BRCA2 são sintetizadas no citoplasma e transportadas ao núcleo (SILVA et al., 2005; DACHEUX et al., 2013). No processo de transformação maligna, mutações em alelos que controlam a expressão e direcionamento destas proteínas até o núcleo alteram a localização celular das mesmas resultando num padrão de localização predominantemente nuclear, exclusivamente nuclear, predominantemente ou exclusivamente citoplasmática (CHAMBON et al., 2003; AL-MULLA et al., 2005; SILVA et al., 2005; TULCHIN et al., 2010; JEYASEKHARAN et al., 2013).

Os nossos resultados demonstraram a imunomarcacão citoplasmática e nuclear das proteínas BRCA1 e BRCA2 em 87% (27/31) e 67,7% (21/31) dos casos analisados, respectivamente. Embora pouco frequente nos casos analisados, e em acórdância com o observado na literatura, a ausência da imunomarcacão destas proteínas em nossos resultados pode decorrer de mutações do tipo *frameshift* (frequentes nos genes BRCA1 e BRCA2) em regiões anteriores ao local de reconhecimento do epítipo pelo anticorpo. Tais mutações podem causar perdas na sequência deste epítipo e resultar na ausência de marcação em ensaios imunohistoquímicos (WANG et al., 2012). Outro fator que pode estar relacionado à ausência da marcação é o silenciamento gênico via hipermetilação

na região promotora dos genes BRCA1 e BRCA2, tendo como consequência, um efeito semelhante ao da mutação (HSU et al., 2013).

Cânceres de mama relacionados ao BRCA2 são mais frequentes no tipo ductal invasivo não hereditário, contudo esta associação é mais fraca do que quando comparada ao BRCA1. O padrão geral das características clínico-histopatológicas dos tumores relacionados a mutações dos genes BRCA1 e 2, e por consequência expressão e modulação de suas proteínas-produto, sugere uma via de carcinogênese diferente dos tumores esporádicos. BRCA2 relacionado a alterações do meio hormonal da mama normal podendo facilitar eventos subsequentes ao desenvolvimento e manutenção de cânceres de mama quando sua proteína é expressa de forma aberrante (MOTE et al., 2004).

No câncer de mama, a relação entre a expressão do gene BRCA1 e o prognóstico reservado, decorre da correlação inversa existente entre a reduzida expressão deste e a alta taxa de proliferação, o grau histológico e a reduzida diferenciação dos tumores (DING et al., 2004; DORSSERS et al., 2004). Além disso, carcinomas com baixa expressão da proteína BRCA1 são negativos para os receptores de estrogênio e progesterona, mas positivos para HER-2. Ao passo que se especula o comportamento inverso para o BRCA2 (SILVA et al., 2005).

MGAT5 e o mundo glicosilado

O aumento da transcrição do gene *MGAT5*, cujo produto tem a função catalítica de adicionar resíduo de N-Acetil-glicosamina cria uma nova estrutura antenária passível de crescimento pela ação de outras glicosiltransferases, em glicoconjugados de superfície celular. Desta forma sua ação alterada impõe ramificações em N-glicanos, que ficam maiores e mais complexos. Este novo glicocódigo estrutural está associado a interações mais fracas entre a célula maligna e a matriz extracelular, resultando no aumento da migração e invasão celulares, e uma possível consequente metástase (WANG et al., 2012). Este comportamento pode ocorrer devido o aumento dos sítios de polilactosaminas e por alteração na meia vida de receptores de fatores de crescimento que são frequentemente N-glicosilados. O maior número de resíduos de ácido siálico na superfície celular diminui a aderência das células tumorais à matriz e protege as células tumorais do reconhecimento do sistema imune (HANDERSON et al., 2005).

A expressão da MGAT5 é reduzida ou inexistente no tecido mamário normal ou hiperplásico, ao passo que no câncer de mama o aumento da sua expressão e dos seus produtos glicanos está associada à progressão tumoral, metástase nodal e prognóstico reservado, fatos que provavelmente resultam da sua atividade em induzir alterações funcionais em vários substratos envolvidos na progressão tumoral (HANDERSON et al., 2005; SIDIQUI et al., 2005). Em nossos resultados, embora a imunomarcção citoplasmática da MGAT5 tenha sido observada na maioria dos casos analisados e esteja em acordo com o padrão de marcação imunohistoquímico (HANDERSON et al., 2005), nenhuma correlação significativa foi observada entre a sua expressão e a invasão linfonodal, os receptores hormonais e HER-2.

Os resultados indicam que HIF-1 α e BRCA2 são capazes de serem correlacionados com parâmetros clínico-histopatológicos da rotina diagnóstica e que sua positividade auxilia na caracterização do carcinoma ductal invasivo. Atualmente o Grupo de Pesquisas Biomarcadores no Câncer (BmC) amplia seus estudos relacionados a estes genes e agrega outros na avaliação de seus potenciais moduladores no ambiente hipóxico do câncer de mama *in vitro* e *ex vivo*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AL-MULLA, F.; ABDULRAHMAN, M.; VARADHARAJ, G.; AKHTER, N.; ANIM, J.T. BRCA1 gene expression in breast cancer: a correlative study between real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, v.53, p.621-629, 2005.

BOS, R.; VAN DIEST, P.J.; DE JONG, J.S.; VAN DER GROEP, P.; VAN DER VALK, P. Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis and expression of bFGF, PDGF-BB and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathol*, v.46, p.6-31, 2005.

CHAMBON, M. et al. Localization of BRCA1 protein in human breast cancer cells. *Breast Can Res Treat*, v.79, n.1, p.107-19, 2003.

CORBEN, A.D. Pathology of invasive breast disease. *Surg Clin North Amer*, v.93, p.363-392, 2013.

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

DACHEUX, E.; VINCENT A, NAZARET N, COMBET C, WIERINCKX A, S MAZOYER, DIAZ JJ, LACHUER J, VENEZIA ND. BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *Plos one*, v.8, p. 67313-67320, 2013.

DALES, J.F.; BEAUFILS, N.; SILVY, M.; PICARD, C.; PAULY, V.; PRADEL, V.; FORMISANOTRÉZINY, C.; BONNIER, P.; GIUSIANO, S.; CHARPIN, C.; GABERT, J. Hypoxia inducible factor 1 α gene (HIF-1 α) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Medic*, v.2, p.8:44, 2010.

DING, S. L. et al. Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br J Cancer*, v.90, p.1995-2001, 2004.

DORSSERS, L.C. et al. The prognostic value of BRCA1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, v.10, p.6194-202, 2004.

DOSAKA-AKITA, H.; MIYOSHI, E.; SUZUKI, O.; ITOH, T.; KATOH, H. N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase v is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, v.10, p.1773-9, 2004.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, v.113, p. 236-254, 2011.

GRUBER, G.; GREINER, R.H.; HLUSHCHUK, R.; AEBERSOLD, D.M.; ALTERMATT, H.J.; BERCLAZ, G.; DJONOV, V. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res*, v.6, p.191-8, 2004.

HANDERSON, T.; CAMP, R.; HARIGOPAL, M.; RIMM, D.; PAWELEK, J. β 1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, v.11, p.2969-2973, 2005.

HAUPT, B.; RO, J.Y.; SCHWARTZ, M.R. Basal-like Breast Carcinoma A Phenotypically Distinct Entity. *Arch Pathol Lab Med*, v.134, p.130–133, 2010.

HSU, N.C.; HUANG, Y.F.; YOKOYAMA, K.K.; CHU, P.Y.; CHEN, F.M.; HOU, M.F. Methylation of *brca1* Promoter Region Is Associated with Unfavorable Prognosis in Women with Early-Stage Breast Cancer. *Plos one*, v.8, e56256, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rio de Janeiro: INCA, 2014. www.inca.gov.br (acessado em janeiro de 2014).

JEYASEKHARAN, A.D.; LIU, Y.; HATTORI, H.; PISUPATI, V.; JONSDOTTIR, A.B.; RAJENDRA, E.; LEE, M.; SUNDARAMOORTHY, E.; SCHLACHTER, S.; KAMINSKI, C.F.; OFIR-ROSENFELD, Y.; SATO, K.; SAVILL, J.; AYOUB, N.; VENKITARAMAN, A.R. A cancer-associated BRCA2 mutation reveals masked nuclear export signals controlling localization. *Nature Struct Mol Biol*, v.20, p.1191–1198, 2013.

KAYA, A.O.; GUNEL, N.; BENEKLI, M.; AKYUREK, N.; BUYUKBERBER, S.; TATLI, H.; COSKUN, U.; YILDIZ, R.; YAMAN, E.; OZTURK, B. Hypoxia inducible

factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients J BUON, v.17, p.663-668, 2012.

KRONBLAD, A.; HELCZYNSKA, K.; NIELSEN, N.H.; PAHLMAN, E.; EMDIN, S.; PAHLMAN, S.; LANDBERG, G. Regional cyclin D1 overexpression or hypoxia correlate inversely with heterogeneous estrogen receptor-alpha expression in human breast cancer. In Vivo, v.17.p.311-8, 2003.

MOELLER, B.J.; RICHARDSON, R.A.; DEWHIRST, M.W. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. Can Metas Rev, v.26, p.241-248, 2007.

MOTE, P.A.; LEARY, J.A.; AVERY, K.A.; SANDELIN, K.; CHENEVIX-TRENCH, G.; KIRK, J.A.; CLARK, C.L. Germ-line mutations in BRCA1 and BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. Genes Chromos Canc, v.39, p.236-248, 2004.

POWIS, G.; KIRKPATRICK, L. Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. Mol Canc Therap, v.3, p. 647–654, 2010.

RÊGO, M.J.B.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C.; SOBRAL, A.P.V. Histochemical Localization of Carbohydrates in Morphological Stages of Developing Human Minor Salivary Glands: A Comparative Study with Cytoskeletal Markers. Inter J Morphol, v.29, p.604-613, 2011.

RYU, K.; PARK, C.; JOO-LEE, Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogenreceptor alpha gene in human breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, v.407, p.831–836, 2011.

SANTOS, M.; MERCANTE, A.M.C.; LOURO, I.D.; GONÇALVES, A.J.; CARVALHO, M.B.; SILVA, E.H.T.; SILVA, A.M.A. HIF1-Alpha Expression Predicts Survival of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. Plus One, v.7, n.9, e45228, 2012.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Canc*, v.10, p.721-32, 2003.

SIDDIQUI, S.F.; PAWELEK, J.; HANDERSON, T.; LIN, C-Y.; DICKSON, R.B.; RIMM, D.L.; CAMP, R.L. Coexpression of β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V glycoprotein substrates defines aggressive breast cancers with poor outcome. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, v. 14, p. 2517-23, 2005.

SILVA, A.R.et al, Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast carcinomas. *J Brasil Patol*, v.41, p.97-203, 2005.

TULCHIN, N.; CHAMBON, M.; JUAN, G.; DIKMAN, S.; STRAUCHEN, J.; ORNSTEIN, L.; BILLACK, B.; WOODS, N.T.; MONTEIRO, A.N. BRCA1 protein and nucleolin colocalize in breast carcinoma tissue and cancer cell lines. *Amer J Pathol*, v.173, p.1203-1214, 2010.

VAN DER GROEP, P.; VAN DIEST, P.J.; SMOLDERS, Y.H.; AUSEMS, M.G.; VAN DER LUIJT, R.B.; MENKO, F.H.; BART, J.; DE VRIES, E.G.; VAN DER WALL, E. HIF-1 α overexpression in ductal carcinoma in situ of the breast in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Plos one*, v.8, p.1-7, 2013.

VAUPEL, P.; THEWS, O.; HOECKEL, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*, v.18, p.243-59, 2001.

WANG, F.; FANG, Q.; GE, Z.; YU, N.; XU, S.; FAN, X. Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Repor*, v.39, p.2109-2118, 2012.

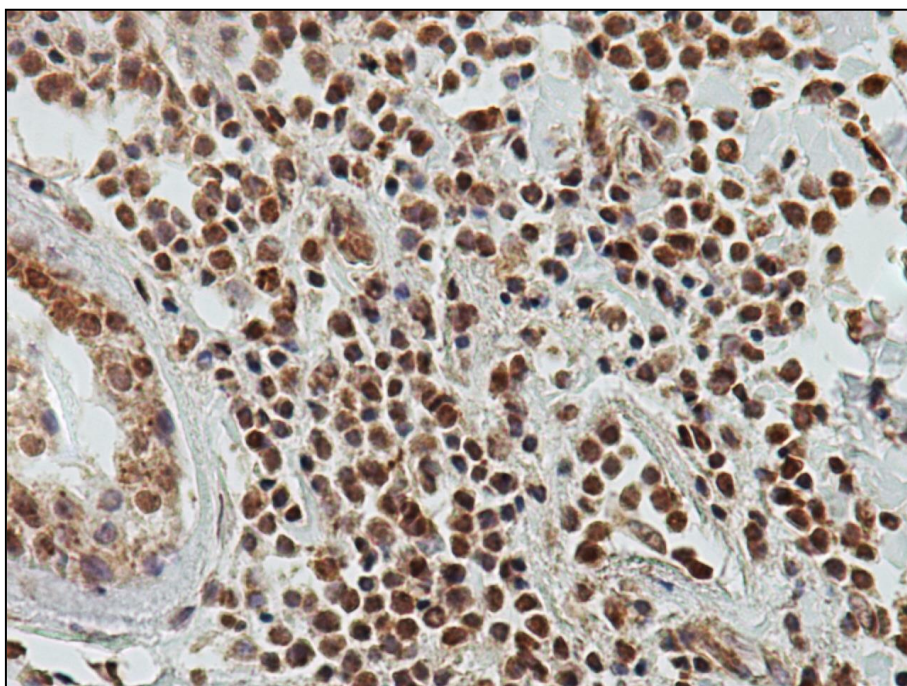


Figura 01: Imunohistoquímica para o Fator induzido por hipóxia (HIF-1 α). Sua positividade foi correlacionada com a invasão linfonodal. (Aumento 40x).

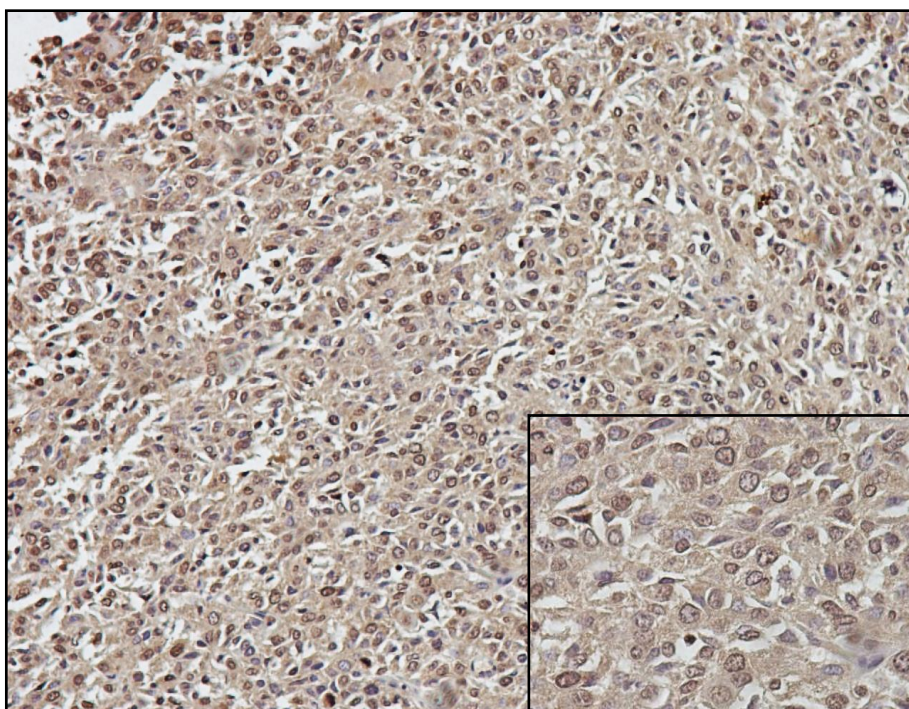


Figura 02: Imunomarcacão para a proteína de BRCA2. Sua positividade apresentou uma correlação inversa com o receptor de progesterona. (Ampliação 10x e detalhe: 40x).

6.2 ARTIGO 2

MUCINOUS CARCINOMA: A GLYCOBIOLOGICAL INVESTIGATION

Bruno Trajano Barbosa¹, Antonio Felix da Silva Filho¹, Gilberto Tenório Wanderley
Fernandes Lima¹, Mariana Montenegro de Melo Lira², Moacyr Jesus Barreto de
Melo Rêgo^{1,3}, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,3}

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

2 - Pathology Department Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil
and University Hospital (UFPE), Recife, Brazil;

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

Correspondence to: Eduardo Beltrão

LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235 CDU – Recife – PE – Brazil 50670-901

Telephone: +55 81 2126.8484

Fax: +55 81 2126.8485

E-mail: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

Breast cancer is one of the neoplasms with the highest rates of morbidity and mortality worldwide and the leading cause of cancer deaths in women. Among carcinomas the mucinous type has a low incidence (being considered rare) and is related to a good prognosis. This tumor is characterized by the accumulation of extracellular mucin but little is known about its molecular and clinical behavior. This case report aimed to evaluate the expression of Gal-1 and Gal-3 and the glycode in glycoconjugates of cell surface of a mammary tumor diagnosed as mucinous carcinoma (without invasive component) using immunohistochemistry and lectin histochemistry (Con A, HPA, PNA and UEA-I), respectively. Con A and HPA stainings were positive and immunohistochemistry was positive for Gal-1 and Gal-3. Gal-3 was also positive to tumor cells associated stroma and vascular endothelium. Results showed that despite being characterized by a good prognosis breast carcinoma, the mucinous carcinoma here studied presented glycobiology features that indicate the acquisition of an aggressive phenotype even without an invasive component.

Keywords: glycoconjugates, mucinous carcinoma, biomarkers.

INTRODUCTION

Mucinous breast cancer is a well-differentiated rare histological type of invasive ductal carcinoma which is characterized by a large amount of mucin production and a good prognosis (HANAGIRI et al., 2010). One of the most important molecules in this sort of neoplasm is the carbohydrate-rich glycoprotein called mucin. They seem to have important roles in pathological state and have immense potential as diagnostic or prognostic markers (MUKHOPADHYAY et al., 2011). Due to its saccharide high content mucins are eligible targets to lectin histochemistry as a promising method for diagnosis and prognosis of mucinous breast carcinoma. The versatility of carbohydrates in forming different glycoconjugates (glycoproteins and/or glycolipids) with different biological functions, as cell adhesion, invasion and migration, turn them capable of storing biological information, in physiological and pathological conditions which may be "deciphered" by lectins (CLAUS et al., 2003).

CASE REPORT

In 2003, a 65-year-old woman checked in the University Hospital (UH) at Federal University of Pernambuco (UFPE), Northeast Brazil, complaining of fever and redness, swelling and bleeding episodes in the right breast. An ulcerated lesion with necrotic material and fetid odor could also be observed. She reported that she had an abscess removed from the same breast (right one) when she was 35-year-old and menopause started at 49. The tumor biopsy revealed a mucinous type invasive ductal carcinoma (IDC) infiltrating the areolar dermis of the right breast. Tumor immunohistochemistry was positive for HER-2 (*human epidermal growth factor receptor type 2*), ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor) and negative for Ki-67 (proliferation associated-antigen). As treatment the patient was submitted to a radical mastectomy of the right breast. After surgery, she complained of insomnia, fluid leakage associated with occasional pain, heat sensation associated with dizziness, and numbness on the same limb. She started a hormone therapy (Anastrozole® therapy for 60 months) and adjuvant radiotherapy of chest wall and supraclavicular fossa (5040 cGy). In 2006, the patient returned to the hospital when it was diagnosed a contralateral (left breast) metachronous breast cancer which biopsy revealed invasive lobular and ductal carcinoma with lymph node metastasis. Patient started oral Tamoxifen® therapy (60 months) but abandoned treatment in 2008.

MATERIAL AND METHODS

Sample: biopsy of mucinous carcinoma (T2, N0, M0) diagnosed in 2003

Lectin Histochemistry: protocol was according BELTRÃO et al. (1998). Tissue sections (4µm) were deparaffinized in xylene, hydrated in graded ethanol (100 - 70%), treated with a 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37°C followed by a 0.3% (v/v) methanol-H₂O₂ solution for 30 min at 25°C and then incubated with lectins conjugated to biotin (Con A, HPA, UEA-I and PNA at 80 µg/ml - SIGMA, USA) for 2h at 4°C. Lectin-carbohydrate binding was visualized with the kit streptavidin-biotin-HRP and revealed with a solution of diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. Slices were counter-stained with haematoxylin. All solutions and washings were carried out using a 10mM phosphate buffer solution (PBS) pH 7.2 containing 150mM NaCl. Lectin

binding inhibition assays were developed incubating the lectin with its corresponding specific sugars, methyl- α -D-mannose for Con A, α -N-Acetylgalactosamine for HPA, L-fucose for UEA-I and D-galactose for PNA (300nM) prior to tissue incubation. Negative controls were performed replacing the lectin for PBS and positive controls were those described by manufacturers.

Immunohistochemistry: protocols were according RÊGO et al., (2011). Tissue sections (4 μ m) were deparaffinized in xylene, hydrated in graded ethanol (100 - 70%), incubated with 100mM citrate buffer pH 6.0 for 30 min into a steamer chamber. After cooling tissue slices were incubated with a methanol-H₂O₂ (1:1 – v/v) solution for 30 min at 25°C and then with a 3% bovine serum albumin (BSA) solution in a 10mM phosphate buffer solution (PBS) pH 7.2 containing 150mM NaCl, for 45 min at 25°C. Tissues were then incubated with primary antibodies (Gal-1, 1:50 and Gal-3, 1:150 – SANTA CRUZ, USA) for 16h at 4°C. Antibody-antigen binding was visualized with the kit streptavidin-biotin-HRP and revealed with a solution of diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. Slices were counter-stained with haematoxylin. All solutions and washings were carried out using PBS. Negative controls were performed replacing the primary antibody for PBS and positive controls were those described by manufacturers.

RESULTS AND DISCUSSION

Results revealed that Con A (Figure 1A) and HPA (*Helix pomatia* agglutinin) stainings were mainly membrane pattern; UEA-I (*Ulex europeus* agglutinin) presented no staining and PNA (Peanut agglutinin - Figure 1D) was positive only in mucous secretion. Immunohistochemistry for Gal-1 and Gal-3 was positive in stroma-associated tumour cells (Figure 1B and 1C).

It is well established that patients diagnosed with primary breast invasive carcinoma, including mucinous one, have an increased risk (2 to 6 times) of developing metachronous contralateral cancer (CLAUS et al., 2003) but the glycoprofile neither primary nor secondary lesions are well documented.

Studies have evaluated the expression profile of routine markers (ER, PR, HER2 and Ki67) to try to understand a possible or real biological continuity between neoplasms in the same breast or in both breasts (HANAGIRI et al., 2010; HUO et al.,

2011; ERHAN et al., 2009). One of the observations was that ER-/PR- and HER-2 overexpression in primary tumor present a higher risk to develop contralateral breast cancer than those ER+/PR+ and luminal A (HUO et al., 2011). In our study the mucinous tumor was ER+/PR+ but HER-2 positive. Furthermore, Ki-67 was negative, consistent with ERHAN et al. (2009) that showed that only 9% of mucinous carcinoma is positivity for this proliferation marker.

Aberrant glycosylation has long been described as a hallmark of cancer and the glycoprofile of tumor cells can be accessed by lectin histochemistry. Lectins are sugar probes used for normal and pathological characterization of cell surface glycoconjugates (CAMPOS et al., 2006).

In this study the mucinous tumor presented a positive staining with HPA, a lectin specific to terminal α -N-Acetylgalactosamine (GalNAc) residues. This saccharide is found in tumour-associated Tn antigen and it is related to poor prognosis since its higher expression is linked to cancer cell proliferation and invasion abilities (MARKIV, 2011). D-mannose/D-glucose residues were recognized by Con A in our sample (positive staining) and such result is in agreement with Campos et al. (2006) who showed that the increased expression or accessibility of these sugar residues is an effective malignant biomarker for breast cancer being differentially expressed in CDI when compared to benign lesions.

The positive tumor cells staining for D-galactose residues, recognized by PNA, indicated that these residues seem to be involved in differentiation and maturation of the cancer as also observed to other cancers (LIMA et al., 2010). PNA specificity allows also to infer the possibility of β -Gal(1-3)GalNAc residues being recognized by galectins on tumors. The negative UEA-I staining, for L-fucose, in tumor cell can be associated to steric impediment or absence of this carbohydrate.

Gal-1 is involved in multiple processes of cancer, such as tumor cell aggregation, cell migration, cell adhesion and promotion of angiogenesis (ITO e RALPH, 2012). Gal-1 was positive in the mucinous carcinoma cells associated stroma. Gal-3 positivity was similar to Gal-1 in tumor cells associated stroma but it was also positive in vascular endothelium. Gal-3 is frequently involved with protection against cancer cell death (RÊGO et al., 2013) and their expression could be related with a more permissive microenvironment that supports primary tumor and metachronic lesion.

Therefore, our results showed that despite being characterized by a good prognosis breast carcinoma, the mucinous carcinoma here studied presented

glycobiology features that indicate the acquisition of an aggressive phenotype even without an invasive component. Unfortunately the contralateral metachronous tumors diagnosed three years later could not be used for research purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank the Brazilian Agencies CNPq, FACEPE and CAPES for financial support. There is no conflict of interest.

REFERENCES

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L.C.B.B. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissues. Appl Biochem Biotechnol, v.74, p:125-134, 1998.

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO-JUNIOR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. Biomark, v.5, p.480-484, 2006.

CLAUS, E.B.; STOWE, M.; CARTER, D.; HOLFORD, T. The risk of a contralateral breast cancer among women diagnosed with ductal and lobular breast carcinoma in situ: data from the Connecticut Tumor Registry. Breast, v.12, n.6, p.451-6, 2003.

ERHAN, Y.; CIRIS, M.; ZEKIOGLU, O.; ERHAN, Y.; KAPKAC, M.; MAKAY, O.; OZDEMIR, N. Do clinical and immunohistochemical findings of pure mucinous breast carcinoma differ from mixed mucinous breast carcinoma? Acta Chir Belg, v.109, n.2, p.204-8, 2009.

HANAGIRI, T.; ONO, K.; BABA, T.; SO, T.; YAMASAKI, M.; NAGATA, Y.; URAMOTO, H.; TAKENOYAMA, M.; YASUMOTO, K. Clinicopathologic characteristics of mucinous carcinoma of the breast. Int Surg, v.95, n.2, p.126-9, 2010.

HUO, D.; MELKONIAN, S.; RATHOUZ, P.J.; KHRAMTSOV, A.; OLOPADE, O.I. Concordance in Histological and Biological Parameters Between First and Second Primary Breast Cancers. *Cancer*, v.117, n.5, p.907-15, 2011.

ITO, K.; RALPH, S.J. Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4⁺ and CD8⁺ T cells and reduced cancer cell adherence. *Clin Exp Metastasis*, v.29, p.561–572, 2012.

MARKIV, A.; PEIRIS, D.; CURLEY, G.P.; ODELL, M.; DWEK, M.V. Identification, cloning, and characterization of two N-acetylgalactosamine-binding lectins from the albumen gland of *Helix pomatia*, *J Biol Chem*, v.286, p.20260–20266, 2011.

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

RÊGO, M.J.B.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C.; SOBRAL, A.P.V. Histochemical Localization of Carbohydrates in Morphological Stages of Developing Human Minor Salivary Glands: A Comparative Study with Cytoskeletal Markers. *Inter J Morphol*, v.29, p.604-613, 2011.

RÊGO, M.J.B.M.; VIEIRA DE MELLO, G.S.; DA SILVA SANTOS, C.A.; CHAMMAS, R.; BELTRÃO, E.I.C. Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. *Med Mol Morphol*, v.46, n.2, p.92-6, 2013

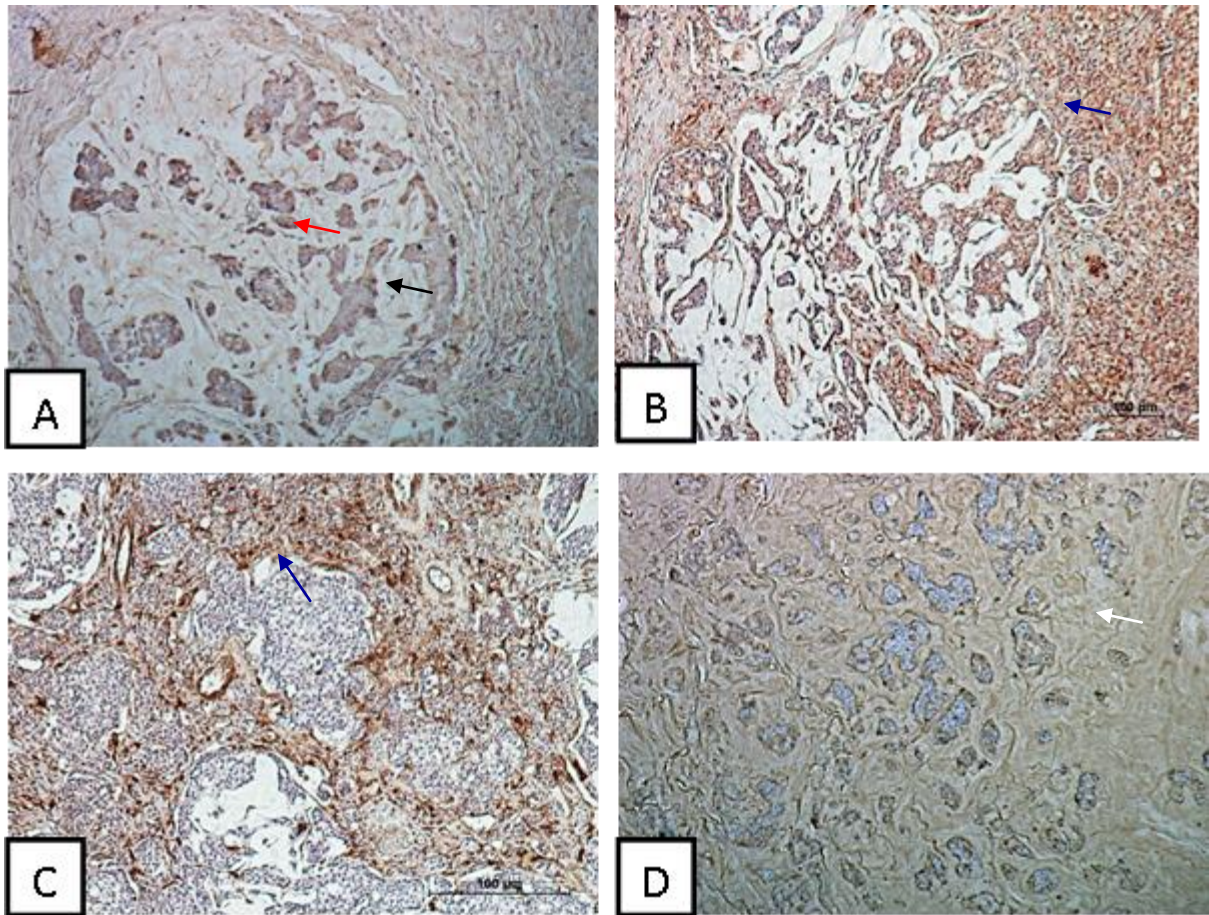


Figure 01: Lectin histochemistry and immunohistochemistry of mucinous carcinoma: a) Con A staining positivity of neoplastic cells (heterogeneous – red arrow) and mucous secretion (black arrow); b) and c) stroma positive staining pattern to Gal-1 and Gal-3, respectively (blue arrows); d) PNA positive staining in mucous secretion (white arrow) but not in neoplastic cells.

6.3 ARTIGO 3

SUBTIPAGEM MOLECULAR DE BRCA1 E BRCA2 CARCINOMA DUCTAL INVASIVO BILATERAL EM PACIENTE JOVEM

¹BARBOSA, B.T., ¹NASCIMENTO, J.C.F., ¹VASCONCELOS, J.L.A., ¹FERREIRA, S.A., ²FITTIPALDI, H.M., ^{3,4}ROCHA, C.R.C., ^{1,4}BELTRÃO, E.I.C.

¹ Setor de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

² Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

³ Setor de Biologia Molecular, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

⁴ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Correspondência para: Eduardo Beltrão

LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE – Brazil 50670-901

Telephone: +55 81 2126.8484

Fax: +55 81 2126.8485

E-mail: ebeltrao@hotmail.com

RESUMO

O câncer de mama é considerado raro em mulheres até 35 anos, sendo nesses casos mais agressivo e resultando em prognóstico reservado. O uso de biomarcadores celulares para subtipagem molecular de câncer de mama constitui potencial ferramenta diagnóstica, prognóstica e terapêutica. O presente trabalho relata o caso de uma paciente com 31 anos que apresentou carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) bilateral, com o objetivo de avaliar a expressão de BRCA1 e BRCA2 utilizando imunohistoquímica. A positividade para BRCA1 e BRCA 2 bem como para RE, RP e HER-2 não conferiu um aspecto de proteção quanto ao progresso agressivo do câncer com, também, comprometimento linfonodal. Os resultados possibilitam a caracterização dos tumores como Luminal B cujo prognóstico se caracteriza como reservado. E os biomarcadores avaliados BRCA1 e BRCA2 aliados aos da rotina clínica (RP, RE, HER-2 e Ki-67) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva.

Palavras chave: carcinoma ductal invasivo, subtipagem molecular, BRCA.

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda maior causa de morte do mundo e é reconhecido como um importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais incidente, excetuando-se o câncer de pele do tipo não-melanoma, apresentando no Brasil uma estimativa de 57.120 novos casos para o ano de 2014 (válidos para 2015), sendo considerado raro em mulheres com até 35 anos (INCA, 2014).

Na mulher adulta-jovem cerca de 2 a 4% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em idade inferior a 35 anos (ANDERS et al., 2009; FREDHOLM et al., 2009), contudo as neoplasias malignas da mama nestas pacientes tendem a ser mais agressivas e com prognóstico reservado (PRONZATO et al., 2011). Este perfil de malignidade implica em um risco sete vezes maior de desenvolver câncer de mama contralateral em comparação com as mulheres com mais de 60 anos (KOEDIJK et al., 2013).

São utilizados como alvo os receptores hormonais (Receptor de Estrógeno - RE e Receptor de Progesterona - RP), o receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013) para subtipagem molecular do câncer de mama de acordo com o Consenso de Saint Gallen (2013). Apesar de sua importância na regulação da proliferação celular e apoptose, a análise dos genes BRCA1 e BRCA2, através da expressão de suas proteínas, não é uma rotina para o diagnóstico (FOULKES e SHUEN, 2013).

A análise de biomarcadores, além de seu valor diagnóstico e prognóstico, possibilita uma melhor compreensão da biologia do tumor influenciando como preditivos de maior sucesso quanto à escolha da conduta terapêutica a ser adotada. Desta forma, avaliar o perfil molecular para BRCA1 e BRCA2 de um caso de carcinoma ductal invasivo (CDI) recorrente e contralateral em paciente adulta-jovem (31 anos) auxilia na caracterização do tumor.

RELATO DE CASO

Paciente com 31 anos de idade sem histórico familiar de câncer, menarca aos 13 anos, uso de contraceptivos orais, múltipara (um aborto e três cesáreas) queixando-se de queimação na mama direita procurou um mastologista (setembro/2012). Realizou mamografia (novembro/2012) que confirmou nódulo na mama direita, confirmado por ultrassonografia, onde se detectou, também, nódulo na mama esquerda. Submeteu-se a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) sendo diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (CDI) grau II de diferenciação celular em ambas as mamas. Realizou tratamento quimioterápico (Antraciclina seguido de Taxano) sendo interrompido diante da descoberta de gestação (parto em junho/2013). Em setembro de 2013, a paciente realizou mastectomia radical bilateral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Biópsia dos carcinomas ductais invasivos (bilateral) diagnosticados em 2013 foram adquiridas no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira receptor de estrógeno, progesterona e HER-2; e Ki-67) foram obtidas

no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

Imunohistoquímica

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por RÊGO et al. (2011). Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6,0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de albumina sérica bovina (BSA em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 suplementado com NaCl 150mM - PBS) a 1% por 45 minutos a 25°C. Na etapa seguinte, os tecidos foram incubados com os anticorpos monoclonais (BRCA1, 1:150 e BRCA2, 1:50 – SANTA CRUZ, USA – SIGMA-ALDRICH, USA) por 16h à 4°C. A localização do anticorpo foi feita com o kit biotina-estreptavidina-HRP e sua revelação com DAB-H₂O₂. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com PBS. As reações de controle negativo foram realizadas com omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram aqueles descritos pelo fabricante. As lâminas foram analisadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos resultados para os marcadores de rotina clínica (RP, RE, HER-2 e Ki-67) obtidos no prontuário da paciente, agregou-se a imunohistoquímica para as proteínas expressas pelos genes BRCA1 e BRCA2. Estes genes são supressores tumorais envolvidos no reparo de danos ao DNA, contribuindo para integridade do genoma. Os resultados para os marcadores estão apresentados na Tabela 1.

Dentre os marcadores de rotina (todos positivos) destacou-se a superexpressão do HER-2. O perfil superexpresso deste gene está envolvido na proliferação e sobrevivência celular por facilitar a formação de dímeros (dois receptores associados) e constituem um potencial mecanismo para aumentar a transdução de sinal através da

fosforilação e desfosforilação de proteínas transmembranas intermediárias e intracelulares (GUTIERREZ e SCHIFF, 2011).

A expressão protéica dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA 2 confere as pacientes um melhor prognóstico visto que ainda há ativação de genes supressores tumorais. Mutações e perda da expressão desses genes estão relacionadas ao desenvolvimento, manutenção e malignidade do câncer de mama (BERNSTEIN et al., 2013). Contudo, no presente caso a positividade para BRCA1 e BRCA 2 bem como para RE, RP e HER-2+ não conferiu um aspecto de proteção quanto ao progresso agressivo do câncer com, também, comprometimento linfonodal.

Os resultados possibilitam a caracterização dos tumores como Luminal B cujo prognóstico se caracteriza como reservado. Em geral, mulheres jovens apresentam maior frequência de tumores triplo-negativos e, por consequência, possuem tempo médio de sobrevida menor devido ao grau de malignidade e agressividade do CDI em mulheres com menos de 35 anos de idade (MORRINSON et al., 2012). Entretanto, o caso em estudo, apresentou um perfil molecular (positividade dos receptores hormonais e HER-2), o que, apesar do HER-2+ possibilita o manejo de terapêutica disponível atualmente. Contudo se fez necessário que a paciente realizasse mastectomia radical das duas mamas e esvaziamento linfonodal.

Tabela 01: Descrição histopatológica e subtipagem molecular utilizando parâmetros da rotina clínica (Hospital das Clínicas - UFPE) e avaliação de BRCA1 e 2 (estudo) das amostras de carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) contralaterais.

AMOSTRAS	DESCRIÇÃO HISTOPATOLOGIA	SUBTIPAGEM MOLECULAR
MAMA DIREITA	Mastectomia pós-quimioterapia neoadjuvante; CDI multifocal grau nuclear 2, formação tubular 1+, índice mitótico: 1=4; Tamanho do tumor: 4,5 x 2,5cm, 4x 2cm e 0,5 cm; Metástases para 5 linfonodos dissecados.	RE+ RP+ HER-2: 1+ Ki 67: 10% BRCA1 + BRCA2 +
MAMA ESQUERDA	Mastectomia pós-quimioterapia neoadjuvante; CDI multifocal grau nuclear 2, formação tubular 1 +, índice mitótico 1=4; Tamanho do tumor: 0,5cm de diâmetro distando 1,5 cm das margens mais proximais; Linfonodos livres de metástases.	RE:+ RP: fracamente +, HER-2: 1+ Ki 67: 15% BRCA1: + BRCA2: +

RE: Receptor de Estrógeno; RP: Receptor de Progesterona; HER-2: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano tipo 2; Ki-67: proteína de proliferação celular; BRCA1 e 2: proteínas expressas pelos genes do câncer de mama 1 e 2.

Os biomarcadores selecionados para o estudo validados na rotina clínica (RP, RE, HER-2 e Ki-67) e mais específicos (avaliação das proteínas expressas pelos genes BRCA1 e BRCA2) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERS, C.K. et al. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol*, v.36, p.237-249, 2009.

BERNSTEIN, J.L. et al. Contralateral breast cancer after radiotherapy among *BRCA1* and *BRCA2* mutations carriers: A WECARE Study Report. *Eur J Cancer*, v.46, n.14, p.2979-2985, 2013.

FOULKES, W.D.; SHUEN, A.Y. In Brief: *BRCA1* e *BRCA2*. *J Pathol*, v.230, n.4, p.347-349, 2013.

FREDHOLM, H. et al. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *Plos One*, v.4, p.7695, 2009.

GUTIERREZ, C., SCHIFF, R. HER-2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*, v.135, p.55-62, 2011.

HARBECKA, N.; THOMSEN, C.; GNANTZ, M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*, n.8, p.102-109, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rio de Janeiro: INCA, 2014. www.inca.gov.br (acessado em janeiro de 2014).

KOEDIJK, M.S. et al. Effectiveness of routine follow-up in the detection of contralateral breast cancer in young women with early breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, v.39, n.11, p.1186-1191, 2013.

MORRISON, D.H. et al. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Brit J Cancer*, v.107, p.1-6, 2012.

PRONZATO P. et al. Biological characteristics and medical treatment of breast cancer in young women-a featured population: results from the NORA study. *International J Breast Cancer*, v.2, p.1-6, 2011.

RÊGO, M.J.B.M.; Cavalcanti, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C.; Sobral A.P.V. Histochemical localization of carbohydrates in morphological stages of developing human minor salivary glands: a comparative study with cytoskeletal markers. *Inter J Morphol*, v.29, p.604-613, 2011.

6.4 ARTIGO 4

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CARCINOMA MUCINOSO ASSOCIADO À CARCINOMA DUCTAL INVASIVO

BRUNO TRAJANO BARBOSA¹, ANTONIO FELIX DA SILVA FILHO^{1,2},
MATHEUS FILGUEIRA BEZERRA¹, MOACYR JESUS BARRETO DE MELO
RÊGO^{1,2,4}, HORÁCIO MÁRIO FITTIPALDI JUNIOR³,
EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO^{1,4*}.

¹ Setor de Patologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);

² Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), UFPE,
Recife, Pernambuco, Brasil;

³ Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando
Figueira (IMIP), Recife, Pernambuco, Brasil;

⁴ Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondência para: Eduardo Beltrão

LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n CDU – Recife – PE – Brazil 50670-901

Telephone: +55 81 2126.8484

Fax: +55 81 2126.8485

E-mail: ebeltrao@hotmail.com

RESUMO

O carcinoma mucinoso de mama tem um bom prognóstico, mas quando encontrado associado a outros tipos neoplásicos este último componente pode levar ao desenvolvimento de tumores mais agressivos. Este trabalho avaliou a expressão de MUC1, Gal-1, Gal-3, BRCA1 e BRCA2 em tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica. Os marcadores avaliados apresentaram expressão diferenciada nos componentes celulares do tumor: BRCA1 (componente mucinoso), BRCA2 (CDI), MUC1 e Gal-3 (citoplasma e membrana apical das células do carcinoma mucinoso e apenas na membrana apical das células de CDI) e Gal-1 (células estromais associadas ao tumor). Os resultados possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos morfológicos e moleculares do carcinoma de mama mucinoso misto (com componente invasiva – CDI) auxiliando o diagnóstico apresentado pelos biomarcadores de rotina clínica (RP, RE, HER-2).

Palavras-chave: BRCA, MUC1, galectinas, diagnóstico, câncer mamário.

INTRODUÇÃO

O carcinoma mucinoso (CM) de mama é um tipo histológico raro bem diferenciado caracterizado por grande produção de mucina. Com pacientes de idade média de diagnóstico entre 55 e 60 anos, o CM representa cerca de 1% à 4% de todos os cânceres de mama. Está associado a uma baixa taxa de recorrência e não costuma apresentar metástases linfonodais (BARKLEY et al., 2008). Entretanto, apenas uma pequena porcentagem dos carcinomas mucinosos não apresenta outro componente celular além da porção mucinosa; a maioria apresenta outros tipos de carcinoma, como o carcinoma ductal invasivo (CDI), o qual comumente desenvolve metástase para os linfonodos axilares e cujo prognóstico é reservado (BAE et al., 2011).

O uso de biomarcadores para a subtipagem molecular do câncer de mama e consequentemente determinação de terapêutica e prognóstico é fundamental. Alguns destes biomarcadores, como o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2) já são bem aceitos e utilizados na clínica (HARBERCK, THOMSEN, GNANTC, 2013), mas a busca por marcadores específicos ainda persiste.

Neste cenário proteínas de membrana, intra e extra-celulares são investigadas como potenciais biomarcadores (OSBORNE; WILSON; TRIPATHY, 2004). As galectinas 1 e 3 (associadas à progressão e proteção tumoral) e a MUC1 (glicoproteína mucina 1) são alvos e juntamente com as proteínas brca1 e brca2 (produtos dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2) tem suas expressões, disponibilidades e mudança de localização investigadas (KUFE, 2012; HITTELET et al., 2013). Este trabalho avaliou a expressão de MUC1, Gal-1, Gal-3, BRCA1 e BRCA2 em tumor de mama humana diagnosticado como carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI) utilizando imunohistoquímica.

RELATO DE CASO

Em 2012, uma paciente de 44 anos, na pré-menopausa, cuja menarca foi aos 12 anos, fazia uso de contraceptivos orais, com um filho e sem histórico de câncer na família foi ao mastologista queixando-se de inchaço e vermelhidão na mama esquerda. Realizou mamografia e core-biopsy cujos resultados revelaram um tumor de 8,0x4,0cm diagnosticado como carcinoma mucinoso associado à carcinoma ductal invasivo (CDI). A imunohistoquímica foi positiva para receptor de estrógeno (RE+) e negativa para receptor de progesterona (RP-) e receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2-); e o estadiamento tumoral foi T2, N2, M1. Ressonância magnética sugeriu acometimento linfonodal e metástase. A paciente foi submetida à quimioterapia neoadjuvante com quatro ciclos de Antraciclina[®] e doze ciclos de Taxano[®]. Após a terapia neoadjuvante a paciente foi submetida a mastectomia radical da mama esquerda e esvaziamento linfonodal axilar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Biópsia de carcino mucinoso com componente ductal invasivo diagnosticado em 2013 foi adquirido no Setor de Anatomia Patológica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e as informações clínico-histopatológicas (idade, marcadores moleculares para receptor de estrógeno, progesterona e HER-2, estadiamento T2, N2 e

M1) foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do IMIP. As bordas livres foram utilizadas como tecido normal.

Imunohistoquímica

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por RÊGO et al. (2011). Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6,0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de albumina sérica bovina (BSA em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 suplementado com NaCl 150mM - PBS) a 3% por 45 minutos a 25°C. Na etapa seguinte, os tecidos foram incubados com os anticorpos monoclonais (BRCA1, 1:150; BRCA2, 1:50; ; Ki-67, 1:50; MUC1, 1:50; Gal-1, 1:50; Gal-3, 1:150 – SANTA CRUZ, USA) por 16h à 4°C. A localização do anticorpo foi feita com o kit biotina-estreptavidina-HRP e sua revelação com DAB-H₂O₂. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com PBS. As reações de controle negativo foram realizadas com omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram aqueles descritos pelo fabricante. As lâminas foram analisadas em sistema digital de imagem com microscópio óptico Nikon Eclipse 50i acoplado a câmera digital Nikon DS-Fi1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os achados imunohistoquímicos revelaram que os marcadores BRCA1 e BRCA2 encontraram-se expressos em componentes celulares distintos do tumor, com BRCA1 associado ao componente mucinoso e BRCA2 limitado ao CDI. Estes dois subtipos de carcinoma invasivo possuem diferentes padrões de expressão molecular e os resultados indicam que as diferentes áreas apresentam processos distintos de malignização e ainda, que podem ter surgido de maneira independente.

MUC-1 está frequentemente presente na membrana plasmática no polo apical de células do epitélio normal mamário, porém o aumento de sua expressão é um fenômeno comum observado em tumores de mama e vem sendo correlacionado com positividade

para RE (PARK et al., 2010; DO et al., 2013). Na amostra analisada MUC-1 foi observada no citoplasma e membrana apical das células do carcinoma mucinoso e apenas na membrana apical das células de CDI. A positividade da expressão de MUC1 indica a manutenção da polaridade celular, caracterizando um tipo celular mais diferenciado, sendo indicativo de um bom prognóstico, quando o carcinoma mucinoso não apresenta um componente invasivo (CDI).

Semelhante à MUC-1, Gal-3 teve sua marcação presente na membrana apical das células do componente invasivo, por outro lado, a presença de Gal-1 foi restrita às células estromais associadas ao tumor. A presença apical de Gal-3 tem sido relacionada com interações célula-célula e célula-matriz extracelular (YU et al., 2007). Contudo MUC-1 fornece diversos sítios de ligação para esta glicoproteína (WEISSENBACHER et al., 2011) o que pode explicar tal perfil. Ao passo que a presença estromal de Gal-1 foi relatada em tumores mamários por RÊGO et al. (2013). Ambas galectinas são freqüentemente envolvidas com a proteção contra a morte por parte célula neoplásica e suas expressões podem estar relacionadas a um microambiente mais permissivo ao desenvolvimento do tumor.

A possibilidade de utilização de biomarcadores diferentes daqueles da rotina clínica contribuíram para o estabelecimento de um perfil onde a agressividade da progressão tumoral foi evidenciada. Assim a imunoavaliação de Gal-1, Gal-3, MUC1, BRCA1 e BRCA2 possibilitaram inferir aspectos morfológicos e moleculares do carcinoma de mama mucinoso misto (com componente invasiva – CDI) auxiliando o diagnóstico apresentado pelos biomarcadores de rotina clínica (PR, ER, HER-2).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAE, S.Y.; CHOI, M.; CHO, D.H.; LEE, J.E.; NAM, S.J.; YANG, J. Mucinous Carcinoma of the Breast in Comparison with Invasive Ductal Carcinoma:

Clinicopathologic Characteristics and Prognosis. J Breast Cancer. v.14, n.4, p.308-313, 2011.

BARKLEY, C.R., LIGIBEL, J.A. et al. Mucinous breast carcinoma: a large contemporary series. Am J Surg, v.196, p.549-551, 2008.

DO, S.; KIM, K.; KIM, D.; CHAE, S.W.; PARK, Y.L.; PARK, C.H.; SOHN, J.H. Associations between the Expression of Mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) and Clinicopathologic Parameters of Human Breast Ductal Carcinomas. J Breast Cancer, v.16, n.2, p.152-158, 2013.

HARBECKA, N.; THOMSEN, C.; GNANTZ, M. St. GALLEN. 2013 Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. Breast Care, v.8, p.102–109, 2013.

HITTELET, A.; LEGENDRE, H.; NAGY, N.; BRONCKART, Y.; PECTOR, J.C.; SALMON, I.; YEATON, P.; GABIUS, H.J.; KISS, R.; CAMBY, I. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. Int J Cancer, v.20, n.103, p.370-379, 2013.

KUFE, D. W.; MUC1-C Oncoprotein as a Target in Breast Cancer; Activation of Signaling Pathways and Therapeutic Approaches. Oncogene, v.28, n.32, p.1073–1081, 2013.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. Oncologist, v.9, n.4, p.361-377, 2004.

PARK, S.; KOO, J.; KIM, J.; YANG, W. I.; PARK, B.; LEE, K. S. Clinicopathological Characteristics of Mucinous Carcinoma of the Breast in Korea: Comparison with Invasive Ductal Carcinoma-Not Otherwise Specified. J Korean Med Sci, v.25, p.361-368, 2010.

RÊGO, M.J.B.M.; Cavalcanti, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C.; Sobral A.P.V. Histochemical localization of carbohydrates in morphological stages of developing human minor

salivary glands: a comparative study with cytoskeletal markers. *Inter J Morphol*, v.29, p.604-613, 2011.

RÊGO, M.J.B.M.; MELO, G.S.V.; SANTOS, C.A.S.; CHAMMAS, R.; BELTRÃO, E. I.C. Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma *in situ*. *Med Molec Morphol*, v.46, n.2, p. 92-96, 2013.

WEISSENBACHER, T.; KUHN, C.; MAYR, D.; PAVLIK, R.; FRIESE, K.; SCHOLZ, C.; JESCHKE, U.; DITSCH, N.; DIAN, D. Expression of Mucin-1, Galectin-1 and Galectin-3 in Human Leiomyosarcoma in Comparison to Leiomyoma and Myometrium *Anticanc Res*, v.31, p.451-458, 2011.

YU, L.; ANDREWS, N.; ZHAO, Q.; MCKEAN, D.; WILLIAMS, J. F.; CONNOR, L. J.; GERASIMENKO, O. V.; HILKENS, J.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; RHODES, J. Galectin-3 Interaction with Thomsen-Friedenreich Disaccharide on Cancer-associated MUC1 Causes Increased Cancer Cell Endothelial Adhesion. *J Biolog Chem*, v.282, n.1, p.773–781, 2007.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- em tumores diagnosticados como carcinoma ductal invasivo, HIF-1 α apresentou correlação estatística direta com a invasão linfonodal ($p=0,036$) e BRCA2 correlação inversa com o receptor de progesterona ($p=0,02$) sendo capazes de serem correlacionados com parâmetros clínico-histopatológicos da rotina diagnóstica e que seua positividade auxilia na caracterização do carcinoma ductal invasivo;

- em tumor de carcinoma mucinoso (sem componente invasivo - CDI) a histoquímica com as lectinas Con A e HPA foi positiva bem como a imunohistoquímica para Gal-1 e Gal-3. Gal-3 também foi positiva para o estroma associado às células tumorais e o endotélio vascular. Os resultados mostraram que mesmo sendo de bom prognóstico e sem componente invasivo, o carcinoma mucinoso estudado apresentou características glicobiológicas de tumor agressivo;

- em carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) bilateral a imunohistoquímica para BRCA1 e BRCA 2 foi positiva bem como para RE, RP e HER-2. Os resultados possibilitam a caracterização dos tumores como Luminal B de prognóstico reservado. BRCA1 e BRCA2 aliados aos marcadores de rotina clínica (RP, RE, HER-2 e Ki-67) possibilitaram um melhor entendimento e correlação dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tendo importância terapêutica, epidemiológica e preditiva;

- em carcinoma mucinoso com componente invasivo (CDI) a imunohistoquímica foi positiva para BRCA1 no componente mucinoso, para BRCA2 nas células de CDI, para MUC1 e Gal-3 no citoplasma e membrana apical das células do carcinoma mucinoso e apenas na membrana apical das células de CDI, para Gal-1 nas células estromais associadas ao tumor. Os resultados possibilitaram inferir aspectos morfológicos e moleculares do carcinoma de mama mucinoso misto (com componente invasiva – CDI) auxiliando o diagnóstico apresentado pelos biomarcadores de rotina clínica (PR, ER, HER-2).

8 PERSPECTIVAS

Ampliando os conhecimentos e influência do microambiente hipóxico do câncer de mama serão realizados estudos para caracterizar o perfil de glicosiltransferases (MGAT3, MGAT5, ST6GAL1, ST3GAL1, ST6GALNAC1) no ambiente hipóxico do câncer de mama *in vitro* e *ex vivo* quanto ao seu valor diagnóstico e prognóstico através do silenciamento e superexpressão dessas enzimas para identificação como possíveis alvos terapêuticos e a alteração da localização intracelular das mesmas correlacionando com alterações funcionais.