

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

PETRA BARROS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE GLICOSILAÇÃO E β 1-INTEGRINA EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS: VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO NA PROGRESSÃO
TUMORAL E STATUS LINFONODAL.**

Recife

2014

PETRA BARROS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE GLICOSILAÇÃO E β 1-INTEGRINA EM CARCINOMAS
MAMÁRIOS: VALOR DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO NA PROGRESSÃO
TUMORAL E STATUS LINFONODAL.**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco como requisito para obtenção
do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão - UFPE

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva – FMRP/USP

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Petra Barros dos

Avaliação de glicosilação e beta1-integrina em carcinomas mamários: valor diagnóstico e prognóstico na progressão tumoral e status linfonodal/ Petra Barros dos Santos– Recife: O Autor, 2014.

113 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientador: Alfredo Ribeiro Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia e anexo

1. Mamas- câncer 2. Metástase 3. Histoquímica I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Silva, Alfredo Ribeiro (coorientador) III. Título

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-067

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Barros, Petra.

Título: Avaliação de glicosilação e β 1-Integrina em Carcinomas Mamários: Valor

Diagnóstico e Prognóstico na Progressão Tumoral e Status Linfonodal.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 27/02/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Instituição: Universidade de Pernambuco

Assinatura:_____

Prof. Dr. Moacyr Barreto de Melo Rêgo

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

Profa. Dra. Michelly Pereira

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

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

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. 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

*"A consciência do dever cumprido
derrama na nossa alma doce alegria."
(George Herbert)*

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem a fé que nele deposito nada seria possível.

Agradeço aos meus pais “ANA MARIA BARROS DOS SANTOS e DACIER BARROS E SILVA”, pessoas a quem mais amo neste mundo, pois me proporcionaram o melhor que puderam para a construção da minha vida pessoal e acadêmica.

Ao THIAGO ALBERTO DE LIMA MORAIS, meu marido, pelo seu amor, carinho, paciência e estímulo para finalizar este trabalho.

Agradeço a minha irmã BRUNA DACIER BARROS que esteve sempre comigo nas horas de dificuldade.

Aos meus amigos GABRIELA SOUTO e MOACYR BARRETO pela sinceridade e vontade de ajudar no que foi preciso.

Aos colegas do Laboratório e a toda família BmC (Grupo Biomarcadores no Câncer).

Agradeço à JULIANA ZANETTI, amiga que ganhei em Ribeirão Preto - SP, pela dedicação, pela ajuda, pelos ensinamentos enquanto juntas trabalhamos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO, responsável pela concretização deste projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. ALFREDO RIBEIRO SILVA, por ter me aceitado como sua aluna na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP-RP) e também por toda a atenção e conselhos nas horas de dúvidas.

A todos os funcionários do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo auxílio e apoio dispensados.

À DEISY MARA, técnica no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por viabilizar a realização deste trabalho com a concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão do Auxílio à Mobilidade Discente.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT), em especial, à Profa. Dra. Suely Lins Galdino (*in memoriam*), pela atenção e ajuda que sempre disponibilizou. E também ao secretário Paulo Germano pela disponibilidade e prazer de ajudar sempre.

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha realização acreditando sempre, dando-me força e torcendo para que todos os meus projetos continuem a ser realizados.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Subtipos histológicos de Carcinoma Ductal <i>in situ</i> .	25
Figura 2. Aspecto histológico do Carcinoma Ductal Invasivo de Mama	28
Figura 3. Ilustrações de Carcinoma Ductal Invasivo de Mama.	29
Figura 4. Representação de O-glicosilação e N-glicosilação em proteínas.	33
Figura 5. Desenho esquemático da Família das Integrinas.	38
Figura 6. Integrinas e suas interações com as células tumorais e células-associadas ao tumor.	40
Figura 7. Confecção de um bloco de TMA com <i>Manual Tissue Arrayer I</i>	44
Figura anexo 1. Amostras de tumores em TMA corados pela técnica de H&E para confirmação dos casos	106
Figura anexo 2. Imunohistoquímica de células neoplásicas de CDI positivas para os marcadores HER-2, Ki67 e MUC1.	107
Figura anexo 3. Teste de Qui-quadrado entre os casos de CDI e CDIS para a presença de ácidos siálicos α 2,6-ligados.	108
Figura anexo 4. Impacto da presença e ausência de ácidos siálicos α 2,6-ligados no acometimento de linfonodos das pacientes com CDI.	108
Figura anexo 5 Comprovante (email) de submissão do artigo na revista International Journal of Clinical and Experimental Pathology.	112

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama	28
Tabela 2. Anticorpos e suas respectivas diluições utilizadas neste trabalho	47
Tabela anexo 1. Correlação entre a expressão de β 1-Integrina e MGAT-5 com fatores clínico-histopatológicos de significado prognóstico em carcinoma ductal <i>in situ</i> de mama.	109
Tabela anexo 2. Correlação entre a expressão de β 1-Integrina e MGAT-5 com fatores clínico-histopatológicos de significado prognóstico em carcinoma ductal invasivo de mama	110

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

Bcl-2	Célula-B de linfoma 2 (do inglês: <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BR	Grada Histológica de Bloom & Richardson
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês: <i>bovine serum albumin</i>)
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>is Situ</i>
CISH	Hibridiza <i>in Situ</i> Cromógena (do inglês: <i>chromogen in situ hybridization</i>)
DAB	Diaminobenzidina
DFS	Sobrevida Livre de Doena (do inglês: <i>Disease free survival</i>)
EC	Estadiamento Clínico
EGFR	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (do inglês: <i>Epidermal growth factor receptor 1</i>)
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (do inglês: <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>)
FLIP	Proteína inibitória a FLICE (do inglês: <i>FLICE-inhibitory protein</i>)
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GFs	Fatores de Crescimento (do inglês: <i>growth factors</i>)
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GnT	Glicosaminiltransferase
<i>gnt-5</i>	β 1,6-N-acetilglicosaminiltransferase V (gene)
HER-2	Fator de Crescimento Epidermal Humano 2 (do inglês: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
H&E	Hematoxilina e Eosina
IMD	Morte mediada por Integrina (do inglês: <i>Integrin Mediated-Death</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITGB1	Beta 1 Integrina (Proteína)
LN	Linfonodos
L-PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
MAL-II	Lectina de <i>Maackia amurensis</i> tipo II
MFS	Tempo Livre de Metástases (do inglês: <i>Metastasis free survival</i>)
MEC	Matriz extracelular
MGAT-5	Mannosil (α 1,6-)-glicoproteína β 1,6-N-acetilglicosaminiltransferase (Proteína)
MUC1	Mucina 1 (do inglês: <i>Mucin 1</i>)
NF-kB	Fator de transcri nuclear kappa B (do inglês: <i>Nuclear transcription factor kappa B</i>)
PBS	Tampo fosfato de sódio (do inglês: <i>phosphate buffer solution</i>)
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
RH	Receptores Hormonais

SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
ST	Sialiltransferase (Enzima)
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris (do inglês: <i>Tris Buffered saline</i>)
TMA	Microarranjos de Tecidos (do inglês: <i>Tissue Microarray</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês: <i>Vascular endothelial growth factor</i>)

RESUMO

dos-Santos, P.B. Avaliação de glicosilação e β 1-Integrina em Carcinomas Mamários: Valor Diagnóstico e Prognóstico na Progressão Tumoral e Status Linfonodal. 2014. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de mama invasivo é associado a uma alta capacidade de promover metástase. A progressão do câncer de um estágio pré-maligno para o maligno, metástase e como as células do tumor podem interagir e se adaptar rapidamente com o microambiente tumoral é foco de investigação. As integrinas, glicoproteínas transmembrana, estão envolvidas nos processos de invasão e metástase assim como na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular. Particularmente a β 1-integrina está envolvida na proliferação e diferenciação de células no desenvolvimento de tecidos epiteliais. O aumento da sialilação (mediado por sialiltransferases; STs) e da ramificação β 1,6 de oligossacarídeos (mediado pela enzima β 1,6-N-acetilglicosaminiltransferase (MGAT5)) tem sido associada com uma variedade de mudanças estruturais nos carboidratos de superfície celular e diretamente envolvidas na carcinogênese. Esta tese objetivou investigar a associação entre a expressão da β 1-integrina na sobrevivência e metástase de 225 pacientes diagnosticados com carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) utilizando técnica de microarranjos de tecidos (*tissue microarrays* - TMAs) e comparar com 67 pacientes diagnosticados com carcinoma ductal *in situ* (CDIS); avaliar a expressão da MGAT-5, assim como, a presença de ácidos siálicos (SA) α 2,3 e α 2,6 ligados. Os dados foram relacionados com marcadores imunohistoquímicos clássicos (RE, RP, Ki-67, HER-2 e P53), VEGF, MUC1 e com dados clínicohistopatológicos de cada paciente. O perfil de carboidratos das células neoplásicas foi avaliado empregando técnica de histoquímica com lectinas MAL-II (Lectina de *Maackia amurensis*, específica para o SA- α 2,3), SNA (Lectina de *Sambucus nigra*, específica para o SA- α 2,6) e L-Pha (Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, específica para β 1,6-N-acetilglicosamina). Os resultados demonstraram que a β 1-integrina foi superexpressa em 32,8% dos casos de CDI e foi associada com a expressão de MGAT-5 ($p=0.0001$), HER-2 ($p = 0.019$), VEGF ($p = 0.011$), assim como todas as lectinas utilizadas no trabalho e teve uma associação significativa com a ocorrência de metástase e morte ($p=0.001$, $p=0.05$, respectivamente). A análise de sobrevivência mostrou que a superexpressão desta proteína tem valor prognóstico ($p= 0.002$) na sobrevivência específica (número de meses após diagnóstico até a ocorrência da morte pela doença). Não houve associação quanto à expressão de β 1-integrina e MGAT-5 ($p= 0.559$, $p=0.07$; respectivamente) entre os casos de CDI e CDIS. A presença de SA- α 2,6 nos glicoconjugados das células neoplásicas verificada através da marcação com a lectina SNA, foi diferenciada entre os casos de CDI e CDIS ($p=0.034$, mais expressa em CDI) assim como na sobrevida específica das pacientes, tempo livre da doença e acometimento de linfonodos ($p=0.026$, $p=0.041$, $p=0.048$; respectivamente). SNA também se mostrou uma sonda eficiente, sendo sua marcação uma variável independente (*Cox regression*) associada com a baixa

sobrevida das pacientes que expressam o SA- α 2,6-ligado ($p=0.004$). Nossos resultados suportam o princípio de que a superexpressão da β 1-integrina está associada com a agressividade do tumor além de poder ser considerada como alvo terapêutico e que a histoquímica com lectinas usando SNA se mostra uma ferramenta importante no auxílio do prognóstico da doença.

Palavras-chave: Carcinoma Ductal Invasivo, Carcinoma Ductal *in situ*, β 1-integrina, SNA, MGAT5, Prognóstico.

ABSTRACT

dos-Santos, P.B. Evaluation of β 1Integrin and glycosylation in Breast Carcinoma: Prognostic and Diagnostic Value on Tumor Progression and Lymph node status. 2014. Thesis (Ph.D.). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The invasive breast cancer is associated with a high ability to promote metastasis. The progression of a premalignant to a malignant stage, metastasis and how tumor cells can interact and adapt quickly to the tumor microenvironment is the focus of many research. Integrins, transmembrane glycoproteins are involved in invasion and metastasis process, as well as in cell- cell and cell-extracellular matrix adhesion. Particularly β 1 integrin is involved in the proliferation and differentiation of cells of the epithelial tissues development. Increased sialylation (mediated by sialyltransferases; STs) and the β 1,6 branching oligosaccharides (mediated by the enzyme β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase, MGAT5) has been associated with a variety of structural changes in cell surface carbohydrates and directly involved on carcinogenesis. This thesis aimed to investigate the association between β 1 integrin expression on survival and metastasis of 225 patients diagnosed with invasive ductal breast carcinoma (IDC) using tissue microarrays (TMAs) and compare with 67 patients diagnosed with ductal carcinoma in situ (DCIS); Evaluate the expression of MGAT5 expression, as well, the presence of α 2,3 and α 2,6-linked sialic acid (SA) were also evaluated. All data were related to classical immunohistochemical markers (ER, PR, Ki-67, HER-2 and p53), VEGF and MUC1 and the clinicopathologic features for each patient. The carbohydrate profile of neoplastic cells was evaluated using lectin histochemistry technique with MAL-II lectin (*Maackia amurensis* lectin, specific to α 2,3-linked SA), SNA (*Sambucus nigra* lectin, specific for α 2,6-linked SA) and PHA-L (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating, specific for β 1,6-*N*-acetylglucosamine). Results showed that the β 1 integrin was overexpressed in 32.8% of the IDC cases and was related to the expression of MGAT5 ($p=0.0001$), HER-2 ($p=0.019$), VEGF ($p=0.011$) as well all lectins used in this work and had a significant association with the occurrence of metastasis and death ($p=0.001$, $p=0.05$, respectively). Survival analysis showed that overexpression of this protein has prognostic value ($p=0.002$) in specific survival (number of months from diagnosis until the occurrence of death by breast cancer). No association was found for β 1 integrin and MGAT5 expression ($p=0.559$, $p=0.07$, respectively) between DCIS and IDC cases. The presence of α 2,6-linked SA in cancer cells glycoconjugates, observed by SNA staining, was different between DCIS and IDC cases ($p=0.034$) as well the specific survival of patients, the disease free survival and lymph nodes committed ($p=0.026$, $p=0.041$, $p=0.048$, respectively). SNA also proved to be a efficient probe, it's staining showed as an variable independent (*Cox Regression*) related with patients low survival that express the α 2,6-linked SA ($p=0.004$). Our results support the principle that overexpression of β 1 integrin is associated with tumor aggressiveness and it can be

considered as a therapeutic target and lectin histochemistry technique, using SNA, shows as an important tool to aid the prognosis.

Keywords: Invasive Ductal Carcinoma, Ductal *in situ* Carcinoma, β 1integrin, SNA, MGAT5, Prognosis.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1. Câncer de Mama	23
3.1.1. Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>	24
3.1.2. Carcinoma Ductal Invasivo	26
3.1.3. Fatores Prognósticos e Preditivos em Câncer de Mama	29
3.1.4. Biomarcadores no Câncer de Mama	31
3.2. Glicosilação no Câncer	32
3.2.1. MGAT5	34
3.2.2. Ácidos Siálicos	35
3.3. Integrinas	36
3.3.1. Integrinas no Câncer	38
3.3.2. β 1-integrina	41
3.4. Lectinas	42
3.5. TMA (Microarranjos de Tecidos, do inglês: <i>Tissue Microarray</i>)	43
4. METODOLOGIA	45
5. RESULTADOS	51
5.1. β 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study.	52
5.2. A Clinicopathological and Immunohistochemical Investigation Reveals SNA Lectin as a Prognostic Carbohydrate-Dependent Probe for Invasive Ductal Cancinoma of the Breast.	61
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÕES	91
8. PERSPECTIVAS	92
9. REFERÊNCIAS	93
10. ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças geneticamente complexo, caracterizado pelo acúmulo de diversas alterações moleculares (WEIGELT et al., 2010). Excedido somente pelas doenças cardiovasculares, é o segundo maior causador de mortes no mundo. De acordo com a Sociedade Americana do Câncer (2013), estima-se atualmente que 7,6 milhões de pessoas morram por ano no mundo. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2014, apontam para a ocorrência de mais de 520.000 novos casos de câncer e sendo os mais comuns o melanoma, pulmão, próstata, mama e colo do útero (INCA, 2014).

O câncer de mama faz parte de um grupo de doenças bastante diverso em termos de apresentação, morfologia e perfil molecular, além de ser heterogêneo quanto à resposta terapêutica e curso clínico (BLOWS et al., 2010). No Brasil são esperados para 2014, 57.120 novos casos de câncer de mama com aproximadamente 13.350 mortes (INCA, 2014).

Um dos principais focos de estudo sobre o câncer da mama está na identificação das alterações moleculares associadas com as diferentes fases de progressão da doença. De acordo com BOMBONATI e SGROI (2011) o atual modelo de progressão do câncer de mama propõe um processo linear com multipassos que se inicia como atipia epitelial plana, avança para uma hiperplasia ductal atípica, evolui para carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e culmina na fase potencialmente letal de carcinoma ductal invasivo (CDI). Este último está associado a uma alta taxa de mortalidade devido à invasão de tecidos adjacentes, comprometimento de linfonodos e, ainda, metástase. O CDI é o tipo histológico mais comum entre os tumores de mama invasivos, sendo responsável por cerca de 60-80% dos casos (WEIGELT et al., 2005).

Tradicionalmente, como ocorre em diversos tumores sólidos, a invasão linfática ou sanguínea peritumoral é o fator que mais se relaciona com a presença de metástase linfonodal. As neoplasias mamárias tem correlação mais estreita com o tamanho tumoral e/ou o grau histológico na previsão do comprometimento metastático axilar (RICCI e JUNQUEIRA, 2008). Após a invasão dos linfonodos, os sítios mais comuns de metástase, no caso do câncer de mama, são os ossos, seguido de pulmão, fígado e cérebro (WEIGELT et al., 2005).

Nos últimos anos, com a evolução do diagnóstico, o número de pacientes diagnosticados com carcinoma ductal *in situ* (tumores não invasivos) aumentou

consideravelmente e abriu novos caminhos na pesquisa e novos dilemas na rotina de diagnóstico e clínica. Há muitos tipos morfológicos de CDIS com diferentes comportamentos, e uma das grandes preocupações no meio científico é poder prever uma possível progressão do CDIS para o CDI, o que poderá possibilitar condutas terapêuticas mais adequadas.

Estudos indicam que a habilidade da célula cancerosa em migrar e invadir tecidos vizinhos depende de modificações nas moléculas glicosiladas presentes na matriz extracelular (JANIK et al., 2010). Essas moléculas são caracterizadas pela união dos diversos tipos de carboidratos a proteínas ou lipídios, por meio das ligações glicosídicas. As enzimas que sintetizam essas ligações (glicosiltransferases) estão diretamente associadas com o comportamento de algumas transformações malignas, através da expressão alterada qualitativa ou quantitativa ou também a disponibilidade de substratos acessíveis às mesmas (ROSETE et al., 2008).

Integrinas são uma família de receptores transmembrana, heterodiméricos, compostos por duas subunidades α e β ligadas de forma não covalente (HYNES, 2002). Estas moléculas podem mediar sinais intra e extracelulares envolvidos na organização de células, tecidos e órgãos durante o seu desenvolvimento e influenciam direta ou indiretamente muitos aspectos do comportamento celular, tais como, adesão, proliferação, migração e diferenciação (ELLIS e TANENTZAPF, 2010). Hoje a glicosilação alterada de proteínas, assim como, das integrinas tem sido frequentemente associadas com a transformação maligna, progressão do câncer e metástase (JANIK et al., 2010).

O aumento da sialilação (mediado por sialiltransferases; STs) e da ramificação β 1,6 de oligossacarídeos (mediado pela enzima β 1,6-*N*-acetilglicosaminiltransferase, MGAT5) tem sido associada com uma variedade de mudanças estruturais nos carboidratos de superfície celular, e diretamente envolvidas na carcinogênese (MEANY e CHAN, 2011). As STs medeiam a transferência de ácido siálico nas porções terminais dos carboidratos de forma específica em cada célula ou tecido, podendo gerar antígenos associados a tumores como os sialil-Tn, sialil-Lewis X e sialil-Lewis A (FREIRE et al., 2002). A superexpressão da enzima MGAT-5 aumenta a ramificação da β -1,6-*N*-acetilglicosamina em *N*-glicanos e, devido a este aumento, a célula já não é capaz de aderir às subunidades de receptores importantes (por exemplo as integrinas), o que leva a modificações nas suas propriedades de adesão, favorecendo as células alcançarem a

corrente sanguínea ou linfática, o que pode desencadear o mecanismo de metástase (GUO et al., 2008).

No câncer de mama, sabe-se que a $\beta 1$ -integrina participa no controle da proliferação e adesão celular. Também há evidências que o receptor $\beta 1$ -integrina pode ser glicosilado por diferentes glicosiltransferases e por sua vez ser responsável pela regulação de várias vias de sinalização que culminam em metástases. Além disso, o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea e há uma grande dificuldade no diagnóstico dos tumores mamários, sendo assim, a identificação de novos marcadores tumorais, com potencial para alvos terapêuticos, é um passo para aperfeiçoar o diagnóstico e atingir maior eficiência na tomada da decisão terapêutica.

Neste trabalho buscou-se investigar o papel da expressão de $\beta 1$ -integrina em carcinomas mamários diagnosticados com carcinoma ductal invasivo e carcinoma ductal in situ e observou-se que a expressão dessa proteína está diretamente ligada com a diminuição da sobrevida global das pacientes com CDI, porém não houve associação estatística entre a expressão dessa proteína em CDIS. O trabalho foi publicado na revista *Diagnostic Pathology* e encontra-se nesta tese. No segundo artigo desta tese, publicado na revista *International Journal of Experimental e Clinical Pathology*, buscou-se avaliar a associação entre a expressão diferencial do ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligado (evidenciado pela lectina SNA) entre os casos de CDI e CDIS e pode-se observar que a expressão desse carboidrato está associado a baixa sobrevida global e tempo livre da doença de pacientes com CDI, assim como há uma associação entre a maior expressão do carboidrato em pacientes com CDI e menor expressão em pacientes com CDIS.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de glicosilação e expressão de β 1-integrina em células de tumores mamários diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma ductal *in situ* (CDIS) de mama, correlacionando os resultados obtidos com os dados clínicos e histopatológicos das pacientes, marcadores de rotina laboratorial assim como o perfil sacarídico das células neoplásicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil sacarídico de glicoconjugados de superfície celular para β 1,6-*N*-acetilglicosamina e ácidos siálicos α 2,3 e α 2,6-ligados (L-Pha, MAL-II, SNA)
- Avaliar o perfil imunohistoquímico para β 1-integrina e demais marcadores comparando os resultados com os marcadores de rotina laboratorial: Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona, p53, HER-2 e Ki-67; marcador para angiogênese (VEGF) e MUC1.
- Correlacionar os dados histoquímicos e imunohistoquímicos com os dados clínicos e histopatológicos de cada paciente;
- Correlacionar os achados de β 1-integrina e MGAT-5;
- Comparar os resultados dos marcadores propostos, entre os casos de CDI e CDIS, para avaliar um possível padrão de evolução e progressão da doença;
- Avaliar os marcadores utilizados com os parâmetros de Sobrevida (Sobrevida Global, Sobrevida Livre da Doença e Tempo livre de Metástases)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo mais frequente entre as mulheres, atrás apenas dos casos de câncer de pele do tipo não melanoma (WHO, 2014). Em países desenvolvidos um aumento da incidência do câncer de mama é acompanhado de uma redução da mortalidade, o que está intimamente associado à oferta de diagnóstico precoce e de tratamentos adequados. O Brasil classifica-se entre os países com a maior incidência de novos casos no mundo, sendo a estimativa para o ano de 2014, 57.120, em número absoluto. As taxas de mortalidade ainda são bastante elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados, o que ilustra a importância de pesquisas direcionadas a diagnósticos cada vez mais precoces, assim como prognósticos mais confiáveis (BLOWS et al., 2010; INCA, 2014).

Alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento do câncer de mama tais como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação (acima dos 30 anos), anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. Esses últimos sugerem que há uma associação entre o período de exposição aos hormônios estrógeno e progesterona (importantes reguladores do desenvolvimento e proliferação do tecido mamário), com o risco de desenvolvimento do câncer de mama (CLARK, 2005). A idade é um fator bastante relevante já que o risco de desenvolver a doença aumenta após os 40 anos. Quanto à etnia, mulheres brancas têm uma maior tendência a desenvolver câncer de mama quando comparadas às mulheres afrodescendentes (Sociedade Americana do Câncer, 2013).

Quanto aos fatores moleculares, o desenvolvimento do câncer, de uma forma geral, é resultado de alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam nas células e que mudam tanto a morfologia quanto a função das mesmas, sendo bastante comum encontrar problemas na checagem do ciclo celular, autossuficiência nos fatores de crescimento, amplificação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Um exemplo reside em mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer*) que aumenta em até 80% o risco de desenvolver câncer de mama (VAN DE VIJVER et al., 2002).

Os tumores malignos próprios da mama, isto é, os adenocarcinomas, são divididos em *in situ* e invasores e estes subdivididos em ductais e lobulares. Cada um destes subgrupos tem seus subtipos, cada qual com suas características histopatológicas próprias que influenciam o comportamento clínico (EISENBERG e KOIFMAN, 2001).

3.1.1 Carcinoma Ductal *in situ*

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) representa um grupo heterogêneo de doenças caracterizado pela proliferação de células epiteliais malignas confinadas no ducto mamário. A história natural é pouco conhecida, as lesões, em sua maioria não palpáveis, são identificadas como microcalcificações e podem se manifestar como agrupadas, tumores ou secreção papilar (FISHER et al, 2001; SALLES et al., 2006; INCA, 2014).

A incidência do número de casos de CDIS vem crescendo a cada ano em todo o mundo (WHO, 2013). Por serem difíceis de serem identificados, até mesmo através da ultrassonografia, a mamografia têm sido fundamental na descoberta de novos casos de CDIS. Quando descoberto inicialmente têm bom prognóstico e sem recidiva, porém 25% a 50% das pacientes têm recorrência tumoral, sendo que 50% destas recorrências aparecem na forma de carcinoma invasivo, o que ilustra a importância do acompanhamento das pacientes mesmo depois da cirurgia de retirada desse tumor (PAGE e ANDERSON, 1987; FENTIMAN, 1998; FISHER et al, 2001).

O estadiamento clínico da doença é realizado através do índice de Van Nuys que leva em consideração tamanho do tumor (em mm), margens cirúrgicas livres de neoplasia (em mm) e classificação histopatológica do grau do tumor - alto, intermediário e baixo. O CDIS pode estar morfológicamente classificado como em comedo, cribriforme, sólido, papilar e micropapilar e por ser uma lesão heterogênea sob o ponto de vista histológico, podem conter vários padrões arquiteturais em um mesmo caso (ABREU e KOIFMAN, 2002), a Figura 1 ilustra alguns tipos de CDIS.

Do total de casos de CDIS, 30 a 60% destes se apresentam de forma multifocal o que está intimamente ligado à extensão da lesão. Esse aspecto pode explicar a ocorrência de recidiva entre 4 a 5 anos depois do período do diagnóstico (SCHWARTZ et al., 1992; DAWSON, 1996). De acordo com BIANCHI & VEZZOSI (2008) o comedo carcinoma é o tipo mais provável de se apresentar de forma multifocal e ter

áreas de microinvasão, enquanto que as variantes cribriforme e sólido são menos susceptíveis a serem multifocal.

O diagnóstico histopatológico preciso do CDIS tem sido o maior problema entre os patologistas. Este influencia diretamente na conduta terapêutica, que vai desde ressecção ampla, associada ou não à radioterapia, até mastectomia com abordagem axilar (TAVASSOLI e MAN, 1995; SALLES et al., 2006). O treinamento no reconhecimento dos padrões morfológicos, do espectro de lesões proliferativas epiteliais mamárias, ainda é o principal instrumento do patologista no diagnóstico dessas lesões (ELLIS et al., 1998; SALLES et al., 2006).

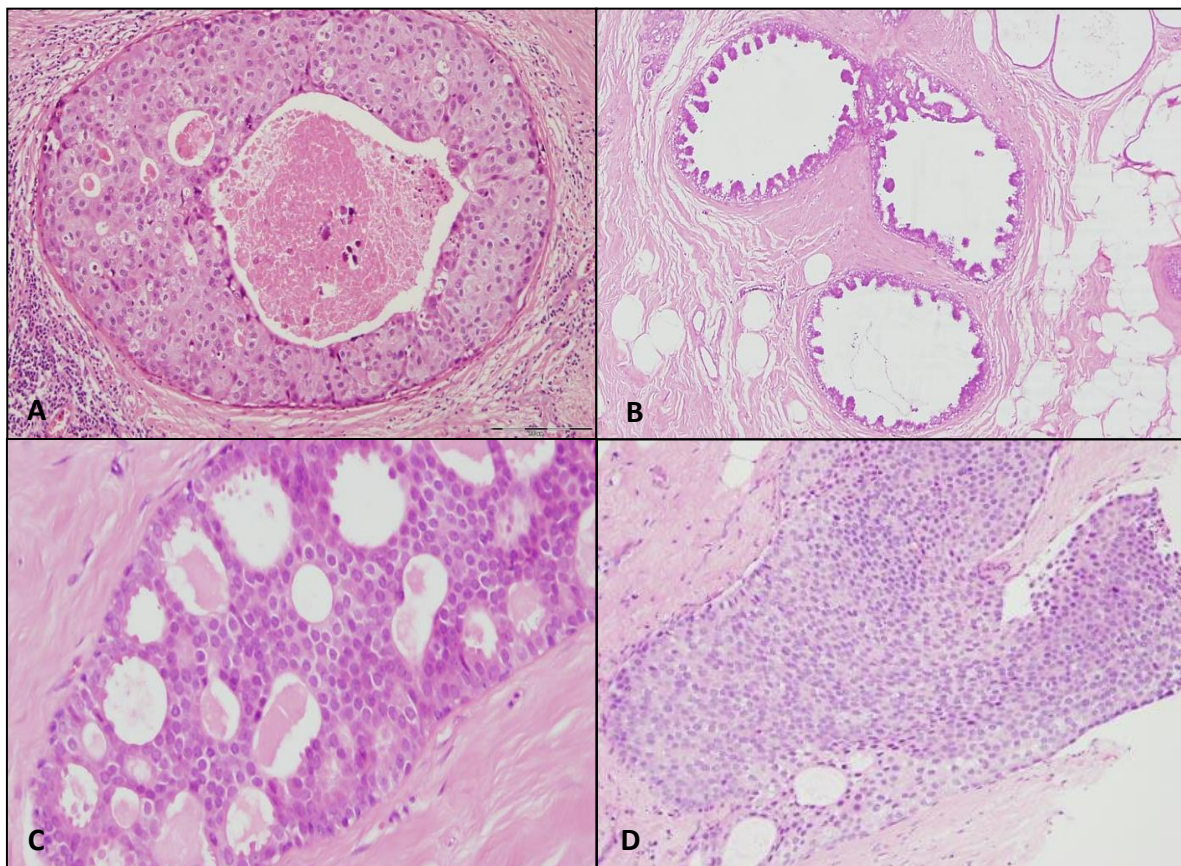


Figura 1: Subtipos histológicos de Carcinoma Ductal *in situ*. A: Comedo. B: Micropapilar. C: Cribriforme. D: Sólido. Fonte: <http://www.breastpathology.info>

3.1.2 Carcinoma Ductal Invasivo

A grande maioria dos tumores invasivos é derivada das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário (células cuboides luminais secretoras e células

mioepiteliais e/ou basais) e as interações do microambiente e esses tipos celulares, podem modificar as propriedades de proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e a capacidade de invasão celular (POLYAK e KALLURI, 2010). Os tumores invasivos caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de apresentações clínicas diferentes com diversas variações de respostas ao tratamento (CIRQUEIRA et al., 2011).

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo mais comum e corresponde cerca de 60-80% dos casos (WEIGELT et al., 2005). De acordo com BOMBONATI e SGROI (2011) o atual modelo de progressão do câncer de mama propõe um processo linear com multipassos que inicia como atipia epitelial plana, avança para uma hiperplasia ductal atípica, evolui para o CDIS e culmina na fase potencialmente letal de CDI.

Enquanto que no CDIS as células não invadem a parede do ducto, no carcinoma invasivo elas ultrapassam a membrana basal e atingem o tecido adjacente numa área rica em vasos sanguíneos e linfáticos, de tal modo que as células adquirem a capacidade de invadir outros vasos e se disseminar pelo organismo, podendo em determinadas situações acarretar em metástases à distância (Figura 2). Os ossos, pulmão, fígado e cérebro são os sítios mais comuns de metástases, enquanto que a invasão dos linfonodos axilares caracteriza a metástase regional (CIRQUEIRA et al., 2011). Nas neoplasias mamárias, a invasão linfática ou sanguínea peritumoral, tem correlação mais estreita com o tamanho tumoral e/ou o grau histológico (RICCI & JUNQUEIRA, 2008).

A classificação clínica da doença é baseada na Classificação Internacional de Tumores - TNM (tamanho; presença de linfonodos e presença de metástases). O tamanho pode ser classificado em T1, T2, T3 e T4, quando 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). A presença de linfonodos é classificada em N0 (ausência de linfonodos acometidos), N1, N2 e N3 (presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais) e por último a presença de metástases é classificada em M0 ou M1 quando há presença ou ausência (respectivamente) de metástases à distância. A classificação patológica (pTNM) é semelhante a classificação clínica e exige a remoção por biópsia do(s) tumor(es). pT no qual o tamanho do componente invasor é considerado, pN, quando os linfonodos são retirados sendo pN1 quando há acometimento de 1 a 3 linfonodos, pN2 de 4 a 9 linfonodos e pN3 mais de 10

linfonodos acometidos. A investigação histopatológica de metástase à distância (pM) exige o exame microscópico (SOBIN E WITTEKIND, 2002)

A classificação de Scarff-Bloom-Richardson também é bastante utilizada, baseada na diferenciação as células tumorais, sendo as estruturas tubulares, glandulares e papilares do tumor, assim 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 são tumores pouco diferenciados, sem características de normalidade e que tendem a crescer e se disseminar de modo mais agressivo (ELSTON e ELLIS, 1991).

Quanto ao nível molecular os carcinomas de mama foram subdivididos em cinco grupos (Tabela 1). Conforme estabelecido pelo Consenso de Saint Gallen em 2011, recomenda-se a adoção do painel de fatores preditivos, RE (Receptor de estrógeno), RP (Receptor de progesterona) e HER-2 (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano) para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão gênica (BHARGAVA et al., 2008; GNANT et al., 2011). Esses perfis moleculares são utilizados na rotina médica para uma melhor conduta terapêutica, uma vez que, os subtipos exibem prognósticos e respostas diferentes aos determinados tratamentos. Outras proteínas como as citoqueratinas (CKs) e receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR) são utilizadas para diferenciar os subtipos (ABD El-REHIM et al., 2004), assim como o Ki-67 que é utilizado para diferenciar o subtipo luminal A, quando a expressão de Ki-67 é $<14\%$ nas células; e o subtipo luminal B, quando a expressão de Ki-67 é $\geq 14\%$ nas células neoplásicas (CIRQUEIRA et al., 2011). A Figura 3 apresenta exemplos de CDI e padrões de marcação imunohistoquímicas para os marcadores clássicos utilizados na rotina laboratorial.

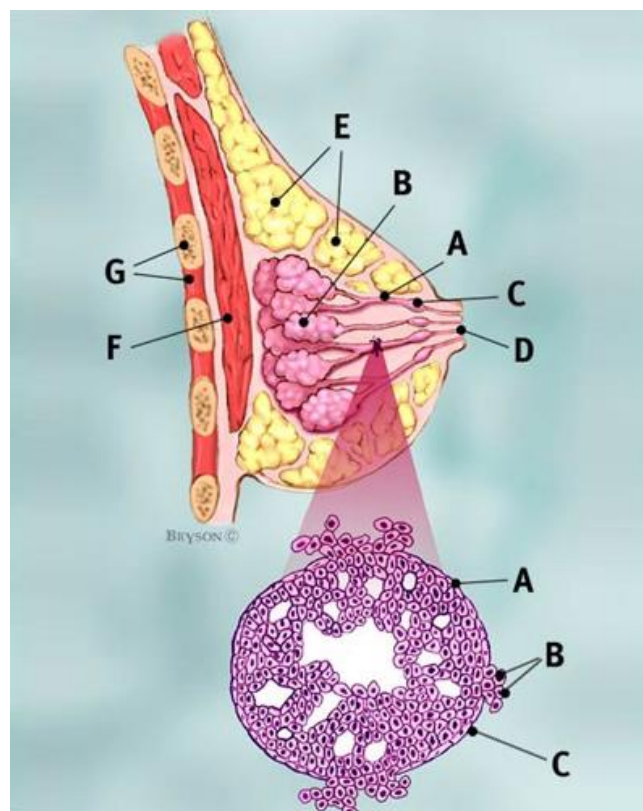


Figura 2: Aspecto histológico do Carcinoma Ductal Invasivo de Mama. Esquema de uma mama normal com destaque de uma seção transversal do ducto com carcinoma ductal invasivo. **A** – Ductos, **B** – Lóbulos, **C** – Armazenamento do leite materno nos ductos, **D** – Mamilos, **E** - Gordura, **F** – Músculo Peitoral, **G** – Costelas. **No destaque: A** – Células normais do ducto, **B** – Células invasivas rompendo a membrana, **C** – Membrana Basal. Fonte: <http://www.breastcancer.org/> 21 jan 2014

Tabela 1: Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama.

Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcacão
	Classificação com índice de Ki-67 de 14%
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 < 14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥ 14%
	RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão do HER2	RE-, RP-, HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

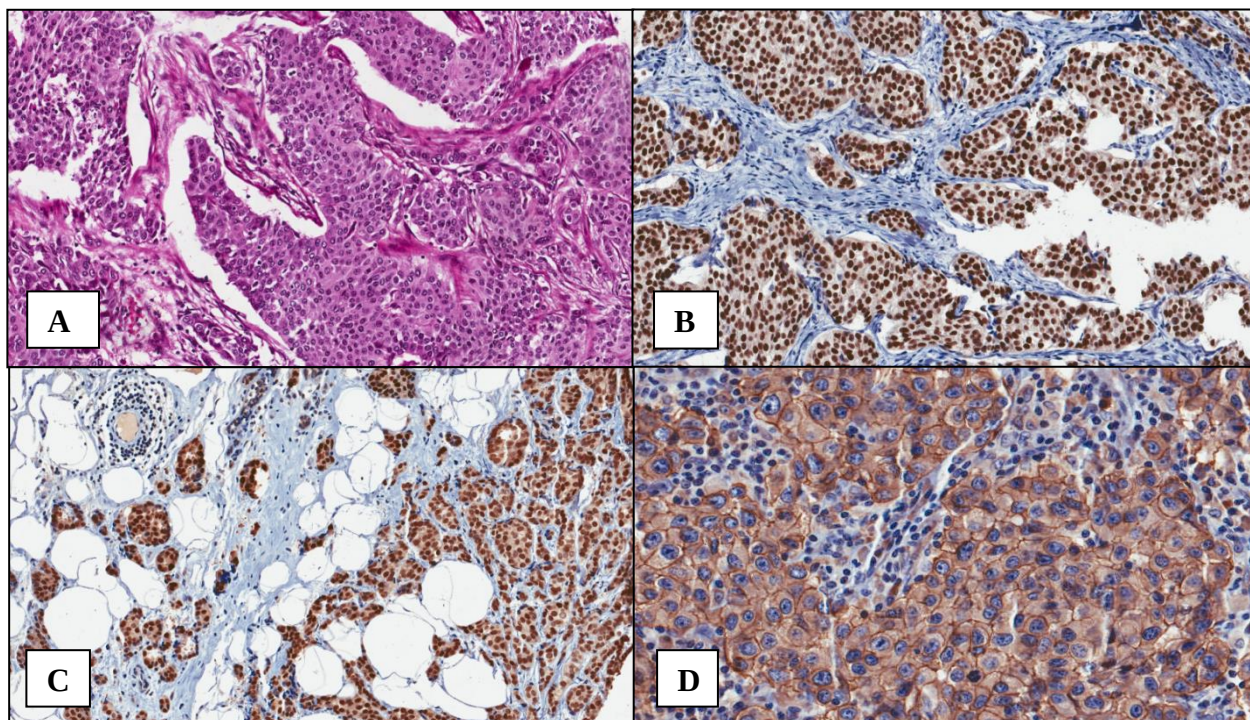


Figura 3: Visualização de células neoplásicas de Carcinoma Ductal Invasivo de mama. Coloração de Hematoxilina & Eosina (A) imunomarcção nuclear para Receptor de Estrógeno (B); nuclear para Receptor de Progesterona (C) e intensa 3+ de membrana para HER-2 (D). Fonte: autor.

3.1.3 Fatores Prognósticos e Preditivos no Câncer de Mama

Um fator prognóstico pode ser definido como um parâmetro possível de ser mensurado no momento do diagnóstico e que serviria como preditor da sobrevida ou do tempo livre de doença (DHINGRA & HORTOBAGYI, 1996). São as características específicas de cada indivíduo e de seu tumor, e são de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos, assim como na previsão da evolução clínica da doença (GOBBI, ROCHA & NUNES, 2008). Neste contexto, os fatores prognósticos devem ser distinguidos dos fatores preditivos, ou seja, um fator prognóstico pode ser definido como uma variável mensurável que se correlaciona com a história natural da doença. Em contraste, um fator preditivo é aquele que está associado com a resposta a um dado tratamento. Alguns fatores, como o status receptor estrógeno/progesterona (RE/RP) e amplificação e/ou superexpressão de HER-2, são ambos prognósticos e preditivos. Fatores prognósticos e preditivos são frequentemente discutidos em conjunto e ambos desempenham um papel no desenvolvimento prognóstico e de um plano de tratamento.

De acordo com FITZGIBBONS et al., (2000) os fatores prognósticos para o câncer de mama podem ser divididos em três categorias. Na primeira são agrupados os estadiamento TMN (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e metástases), o grau histológico, o índice mitótico e o status para receptores hormonais. Na segunda são agrupados os fatores moleculares específicos/reguladores do crescimento (amplificadores de oncogenes como o HER-2, e supressores como o p53). E na terceira categoria são incluídos análise de ploidia do DNA, densidade de microvasos, receptor de fator de crescimento epidermal, fator de transformação do crescimento α , bcl-2, pS2 e catepsina D). Ainda de acordo com os autores, na terceira categoria, pode-se incluir as novas moléculas alvo de estudos científicos, aquelas que possam prever metástases, nesse caso pode-se incluir a β 1-integrina, MGAT-5, etc.

Pode-se perceber que os fatores prognósticos contemplam um amplo universo de condições de risco, incluindo desde variáveis como a idade da paciente no momento do diagnóstico (o pior prognóstico está reservado ao grupo de mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos e àquelas com mais de 75 anos de idade), até complexas alterações genéticas mais recentemente identificadas, nesse aspecto os marcadores biológicos podem direcionar para tratamentos específicos e individualizados (ABREU e KOIFMAN, 2002). Por exemplo, de acordo com BLOWS et al. (2010) mulheres com RE positivo possuem maiores índices de sobrevida e melhor resposta a tratamentos hormonais que aquelas como receptores hormonais (RH) negativos.

A aplicação do conhecimento sobre os fatores prognósticos pode influir favoravelmente na condução do processo terapêutico. Portanto, os fatores apresentados como de terceira geração ainda se apresentam como grandes promessas, estando hoje a sua utilização restrita aos estudos experimentais, que buscam vencer esse grande desafio que é o desenvolvimento de novos alvos moleculares para as drogas antitumorais, assim como biomarcadores que auxiliem a uma individualização da conduta terapêutica (ABREU e KOIFMAN, 2002).

3.1.4 Biomarcadores no Câncer de Mama

Biomarcadores ou marcadores biológicos são entidades que podem ser mensuradas experimentalmente e indicam a ocorrência de uma determinada função normal, ou patológica, de um organismo ou uma resposta a um agente farmacológico (WHO,1993). Os marcadores tumorais são macromoléculas encontradas no tecido

neoplásico, no sangue ou em outros líquidos biológicos de pacientes, que podem variar desde proteínas, genes ou outras biomoléculas até complexos multimoleculares como os perfis de expressão gênica. Podem ser identificados por meio bioquímico e imunohistoquímicos na corrente sanguínea ou nos tecidos e alterações de suas concentrações estão relacionadas com o crescimento de células neoplásicas (EISENBERG & KOIFMAN, 2001; LUDWIG & WEINSTEIN, 2005).

Os biomarcadores podem ser usados na prática clínica para o diagnóstico ou para identificar riscos de ocorrência de uma doença. Podem ainda ser utilizados para estratificar doentes e identificar a gravidade ou progressão de uma determinada doença, prever um prognóstico (no caso do câncer aqueles que se relacionem com as medidas de progressão, recorrência e metástases) ou ainda monitorar um determinado tratamento e os efeitos secundários (AMORIM, 2003; LUDWIG & WEINSTEIN, 2005).

De acordo com WÜNSCH-FILHO e GATTÁS (2001) os biomarcadores têm sido categorizados em três tipos principais: de exposição, de suscetibilidade e de resposta (ou efeito). Os biomarcadores de exposição (Ex. tabaco, álcool, dieta, hábitos de vida) correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos. Os de suscetibilidade indicam indivíduos mais ou menos propensos a desenvolver câncer quando expostos a substâncias cancerígenas. A maior parte das substâncias potencialmente carcinogênicas requer ativação metabólica no organismo antes de se tornarem efetivamente cancerígenas e as diferenças genéticas entre os indivíduos podem determinar o metabolismo dessas substâncias no organismo. Os biomarcadores de resposta (efeito) indicam alterações presentes em tumores; são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença (oncogenes e supressores de tumor).

Ainda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1993) para que uma substância química, seu metabólito ou uma alteração biológica sejam validados e/ou propostos como biomarcador, é desejável que o mesmo apresente as seguintes características: A quantificação do indicador deve: refletir a interação (qualitativa ou quantitativa) do sistema biológico com a substância química; ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação; ser reproduzível qualitativamente e quantitativamente. Estar contido em um meio biológico acessível de análise, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a coleta e o procedimento analítico, e de preferência não ser invasivo. A medição analítica tem que apresentar exatidão e precisão adequadas. Deve-se ainda, conhecer os valores normais do indicador na população não exposta ao agente químico de interesse, assim como as

variações intra e interindivíduos. No caso dos marcadores tumorais o ideal é que apresente cinco usos potenciais: (I) rastreamento populacional ou *screening*, (II) diagnóstico, (III) seleção de tratamento, (IV) determinação de prognóstico e (V) monitoramento terapêutico. Ademais, ele pode ser utilizado de forma investigativa para o desenvolvimento de medicamentos e para classificar e identificar coortes em ensaios clínicos.

No câncer de mama alguns marcadores já são estabelecidos na rotina clínica e auxiliam na tomada de decisão (Ex. RE/RP, HER-2, Ki-67, P53, entre outros). Outros marcadores alvo de estudos (Ex. β 1-integrina, MGAT-5, ácidos siálicos α 2,6-ligados) são importantes na identificação de indivíduos com alto risco de desenvolver uma doença, ou progredir para um estágio mais letal da doença, o que permitirá uma atuação terapêutica imediata ou poderá evitar ou retardar as manifestações mais graves da patologia. A utilização de biomarcadores no câncer de mama irá permitir a individualização de alguns tratamentos e permitir o desenvolvimento da medicina personalizada (LUDWIG & WEINSTEIN, 2005).

3.2 Glicosilação no Câncer

Glicosilação é um evento bioquímico estrutural pós-traducional comum nas proteínas (SPIRO, 2004). Glicoconjugados caracterizam-se pela ligação dos diversos tipos de carboidratos a proteínas ou lipídios, por meio de ligações glicosídicas e que conferem a essas moléculas diferentes propriedades funcionais e estruturais (ROSETE et al., 2008). Constituem uma classe de inúmeras biomoléculas que incluem glicoproteínas, glicoesfingolipídeos e proteoglicanos e que estão envolvidos em diversas condições fisiológicas e patológicas, tais como: interações patógeno-hospedeiro, diferenciação, tráfego e sinalização celular, migração, invasão tumoral e metástase (REIS et al., 2010).

A biossíntese desses glicoconjugados é catalisada pelas glicosiltransferases, uma família de mais de 100 enzimas que são responsáveis por transferir um resíduo de açúcar de um nucleotídeo difosfato (ex. GDP-fucose) para um lipídeo, aminoácido ou carboidrato. Assim as glicosiltransferases são classificadas de acordo com o açúcar que transferem como N-acetilglicosaminiltransferase para N-acetilglicosamina;

fucosiltransferase para fucose; sialiltransferase para ácido siálico e etc. (DALL'OLIO, 2000).

Existem dois tipos de glicosilação, a *N*-glicosilação e a *O*-glicosilação e podem estar presentes na mesma proteína de uma mesma célula. A do tipo *N* caracteriza-se pela união da *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) a um resíduo de asparagina presente na sequência peptídica. A *O*-glicosilação se dá através da união da *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a uma serina ou treonina presente na sequência peptídica (HANISCH, 2001; FREIRE et al., 2002; WANG, 2005) – Figura 4.

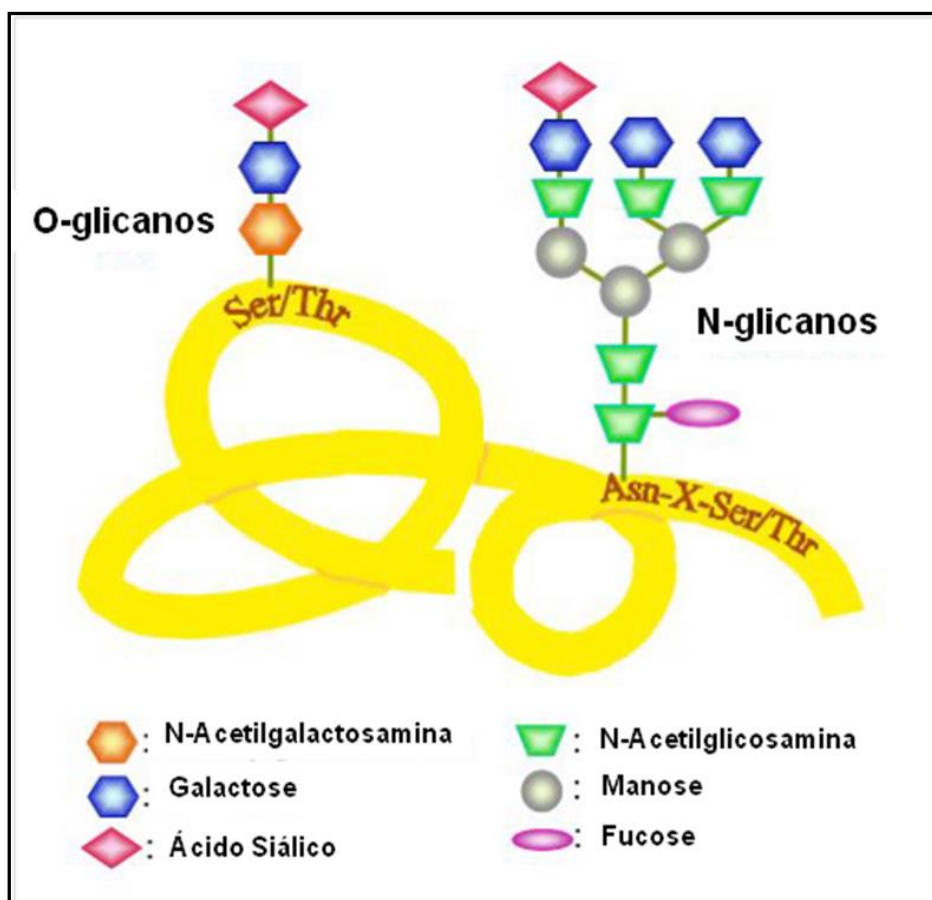


Figura 4: Representação de O-glicosilação e N-glicosilação em proteínas. O-glicosilação e N-glicosilação. Fonte: WANG, 2005.

Os *N*-glicanos têm um papel funcional na adesão celular e quando presentes nas células neoplásicas estão frequentemente associadas com invasão e metástase (ZHAO et al., 2008a). As mucinas fazem parte das glicoproteínas mais frequentemente O-glicosiladas, uma vez que possuem uma grande quantidade de serina e treonina em sua

composição, são bastante expressas nos carcinomas humanos e contribuíram para o achado de grande parte dos antígenos associados a tumores (REIS et al., 2011).

Estudos indicam que a habilidade da célula neoplásica em migrar e invadir tecidos vizinhos depende de modificações nas moléculas glicosiladas presentes na matriz extracelular (MEC). Muitas proteínas quando glicosiladas de maneira incorreta assumem uma forma truncada em que muitos receptores não conseguem interagir com essas moléculas. Assim, as glicosiltransferases estão diretamente associadas com o comportamento de algumas transformações malignas, através da expressão alterada qualitativa ou quantitativa ou, também, disponibilidade de substratos acessíveis às mesmas (ROSETE et al., 2008).

3.2.1 MGAT5

As ramificações na estrutura dos glicanos podem ser sintetizadas por diversas glicosiltransferases (Fucosiltransferases, Sialiltransferases, Galactosiltransferases, N-acetilglicosaminiltransferases). Dentro destas, pelo menos seis tipos de N-acetilglicosaminiltransferases (GnTs) existem nas células de mamíferos. Uma das principais, chave na *N*-glicosilação, é a enzima MGAT-5 – manosideo acetilglicosaminiltransferase 5 – (codificada pelo gene *gnt-v* - β 1,6-*N*-acetilglicosaminiltransferase V), responsável por aumentar a ramificação de *N*-acetilglicosaminas, através da ligação β -1,6 em *N*-glicanos (TANIGUCHI et al., 1996; TANIGUCHI e KOREKANE, 2011).

Uma das principais consequências dessa ramificação é a incapacidade da célula aderir a subunidades de receptores celulares importantes (como por exemplo β 1-integrina; EGFR), o que leva a modificações nas suas propriedades de adesão (GUO et al., 2008; ZHAO et al., 2008b). Vários modelos experimentais de tumor já relacionaram a superexpressão de *gnt-v* com invasão e o potencial metastático (FERNANDES et al., 1991; PIERCE et al., 1997; MURATA et al., 2000; ZHAO et al., 2008b). GRANOVSKY et al. (2000) utilizaram o modelo de tumor de mama e metástase (induzidos pelo oncogene Poliomavírus T), e viram que nos ratos *knockdown* para *gnt-v* (*gnt-v*^{-/-}) o crescimento do tumor era menor que nos ratos não transgênicos. Outro trabalho importante foi realizado por LI et al. (2008), que utilizaram células de câncer de mama da linhagem MA782 e viram que bloqueando a expressão de *gnt-v* o crescimento do tumor era suprimido tanto *in vitro* (utilizando sh-RNA) quanto *in vivo* (utilizando ratos) havendo também a ativação das células T CD4 e macrófagos.

No entanto, de acordo com HUANG et al., (2013) MGAT5 tem demonstrado uma função distinta em diferentes tipos de tumores. Os autores descobriram que a regulação negativa de *gnt-v* diminui a proliferação e o potencial metastático/ invasor de células da linhagem BGC823 de câncer gástrico. DOSAKA-AKITA et al. (2004), usaram 217 biópsias de NSCLCs (câncer de pulmão de células não pequenas, do inglês: *non-small-cell lung cancer*) para analisar a atividade de *gnt-v* através de histoquímica com L-PHA e após análise de sobrevivência concluíram que a baixa expressão de *gnt-v* está associada a menor sobrevida e prognóstico em NSCLCs.

SAITO et al. (2002) utilizando linhagens celulares de carcinoma de cólon, verificaram que a enzima MGAT-5 pode induzir angiogênese por uma via sem ligação com a glicosilação. Os autores observaram que a secreção de um tipo de MGAT-5 (secretada pelas células neoplásicas) pode agir como um cofator de FGF-2 (Fator de Crescimento de Fibroblasto do tipo 2) crucial na angiogênese. Assim, a inibição da expressão ou secreção de MGAT-5 representa uma nova estratégia para a potencial inibição do processo de angiogênese no tumor.

3.2.2 Ácidos Siálicos

Os ácidos siálicos (SAs) estão envolvidos em processos biológicos diferentes daquelas normalmente atribuídos a carboidratos como armazenadores de energia ou como componentes de blocos estruturais. O ácido siálico mais abundante existente nos eucariotos é o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), precursor de outros tipos de SAs. O envolvimento dessas moléculas em processos biológicos incluem as funções de mediadores na adesão célula-célula, célula-matriz, na comunicação intercelular, reconhecimento durante a tumorigênese, diferenciação e progressão, assim como receptores para bactérias e vírus (de-FÁTIMA et al., 2005).

As sialiltransferases (STs) medeiam a transferência de ácido siálico nas porções terminais dos carboidratos de forma específica em cada célula ou tecido. O Neu5Ac pode estar ligado a um resíduo de galactose (Gal) por uma ligação $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$; a um resíduo de GalNAc ou GlcNAc por uma ligação $\alpha 2,6$; ou ainda a outro ácido siálico por uma ligação $\alpha 2,8$ (HARDUIN-LEPERS et al., 2001), podendo gerar antígenos associados a tumores como por exemplo os sialil-Tn (STn), sialil-Lewis X (SL^x) e sialil-Lewis A (SL^a) (FREIRE et al., 2002).

Durante a tumorigênese, a atividade das sialiltransferases pode estar alterada e, como consequência, a superfície das células neoplásicas superexpressarem glicanos sialilados (HAKOMORI, 2002). Esta sialilação aberrante pode mediar eventos fisiopatológicos durante as etapas da progressão do tumor, incluindo invasão e metástases. Isto ocorre principalmente porque as estruturas sialiladas não permitem as interações célula-célula pela repulsão de cargas não específicas. Por outro lado, a adição de ácidos siálicos pode mascarar a estrutura subjacente do açúcar, evitando assim o reconhecimento por outras moléculas de ligação específicas de glicanos (DIMITROFF et al., 1999; FUSTER e ESKO, 2005; VIDEIRA et al., 2009).

VIDEIRA et al. (2009) utilizando linhagens de células para câncer de bexiga viram que o aumento da sialilação do antígeno T é maior pela enzima ST6GAL-I e que isso acarreta na iniciação da transformação do tumor. Em câncer de mama, uma das ST mais expressas é a ST3Gal I, que catalisa a transferência de um SA α 2,3-ligado no terminal galactose (Gal- β 3GlcNAc ou Gal- β 1-4GlcNAc) e essa enzima tem correlação com o tamanho do tumor e acometimento de linfonodos (SWINDALL & BELLIS, 2011). Ainda, o aumento da sialilação em α 2,6 de *N*-glicanos, pela enzima ST6GAL-I é visto em cânceres de colon, mama, leucemia mieloide aguda, cérebro (HEDLUND et al., 2008) e ainda está relacionado com o comprometimento de linfonodos e metástase a distância, diminuição do tempo de sobrevida livre da doença em pacientes com câncer de colo retal e gástrico (PATANI, JIANG & MOKBEL, 2008).

3.3 Integrinas

Integrinas foram inicialmente descritas em 1980 como “Receptores de adesão” e somente em 1986 o termo “Integrinas” foi designado para descrever um complexo de proteínas envolvidas nas ligações transmembranas entre a matriz extracelular (fibronectina) e o citoesqueleto (actina). Outros homólogos e proteínas estruturalmente relacionadas foram descobertas formando assim uma família de receptores de superfície celular (STEFANIDAKIS & KOIVUNEN, 2006). Essas moléculas estão presentes em todos os Metazoa, porém nenhum homólogo foi encontrado nos procariotos, plantas ou fungos (WHITTAKER e HYNES, 2002).

Integrinas, família de receptores transmembrânicos, são heterodímeros, compostos por duas subunidades, α e β , ligadas de forma não covalente. Possuem um grande domínio extracelular e um domínio transmembrana, seguido de um pequeno domínio citoplasmático. Nos mamíferos são 18 subunidades α e oito subunidades β e estas se combinam para formar 24 heterodímeros distintos (Figura 5). No entanto, variantes dessas subunidades já foram encontradas, geradas por *splicing* alternativo dos genes que codificam essas integrinas, e o número pode chegar a 100 tipos diferentes (MELKER e SONNENBERG, 1999; HYNES, 2002).

A “Família das Integrinas” está subdividida em quatro grandes subgrupos baseado na especificidade do ligante e na expressão celular: Subgrupo $\beta 1$ (CD29) ou antígenos tardios (VLA, do inglês: *very late antigens*); $\beta 2$ (CD18) ou integrinas específicas de leucócitos; $\beta 3$ (CD61) ou citoadesinas; e $\beta 7$ (STEFANIDAKIS & KOIVUNEN, 2006). Estas moléculas medeiam sinais intra e extracelulares envolvidos na organização de células, tecidos e órgãos durante o seu desenvolvimento e influenciam direta ou indiretamente muitos aspectos do comportamento celular, tais como, adesão, proliferação, migração e diferenciação (ELLIS e TANENTZAPF, 2010).

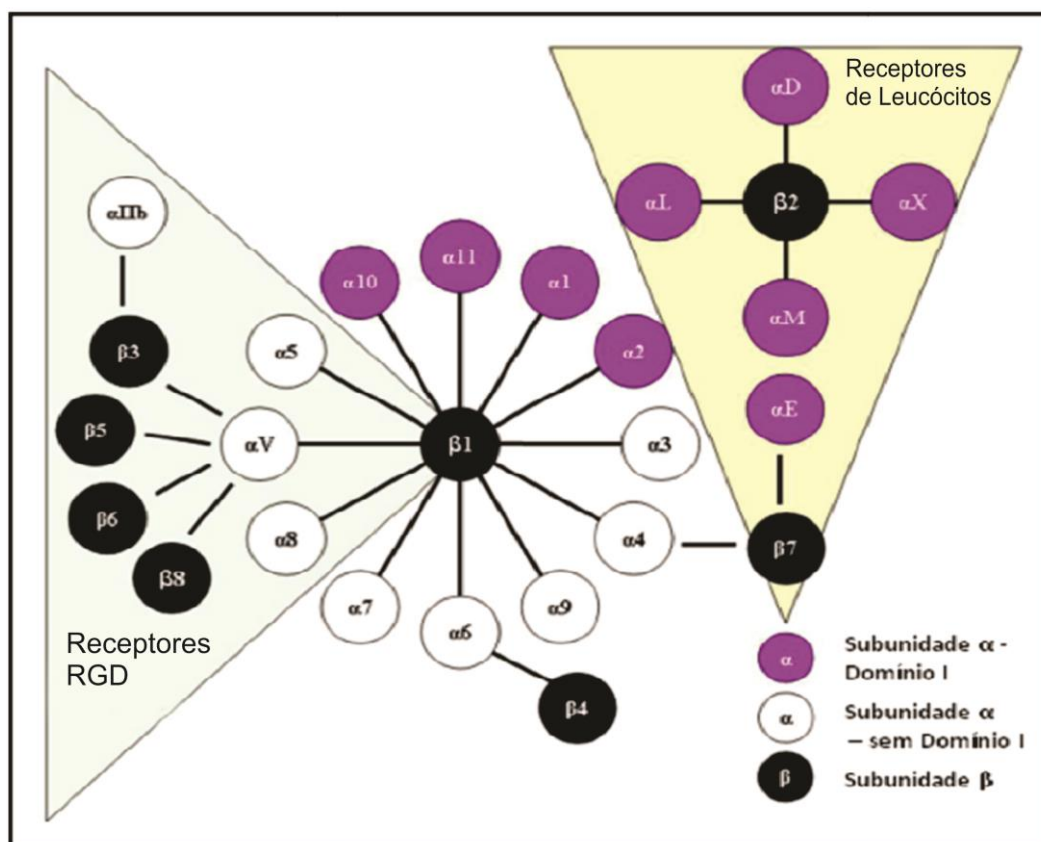


Figura 5: Desenho esquemático da Família das Integrinas: Oito subunidades β podem se associar com 18 subunidades α para formar 24 heterodímeros distintos. Nove das 18 α possuem o domínio I e estão representadas em roxo, as que não possuem o domínio I estão representadas em branco. As subunidades β estão representadas em preto. As integrinas que reconhecem motivos RGD estão no triângulo azul claro e as integrinas específicas de leucócitos estão no triângulo amarelo. Obs.: O domínio I desempenha um papel fundamental na ligação da integrina com seu ligante; RGD, Arginina-Glicina-Ácido Aspártico. **Fonte:** STEFANIDAKIS & KOIVUNEN, 2006.

3.3.1 Integrinas no Câncer

Os eventos que precedem a progressão do tumor são caracterizados pelo aumento na proliferação celular, insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, potencial replicativo, sinais para angiogênese, assim como capacidade de escapar da apoptose ou morte celular programada (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). As proteinases que degradam componentes da MEC e que são capazes de processar

substratos que não pertencem a MEC (ex. fatores de crescimento e seus receptores, citocinas, moléculas de adesão e mediadores de apoptose) têm sido consideradas importantes em todos os estágios da tumorigênese (COUSSENS e WERB, 2001). A participação conjunta de integrinas e outras moléculas é fundamental para a invasão das células tumorais para os tecidos vizinhos de conexão, intravasão na corrente sanguínea (e extravasão da mesma) e metastizar órgãos distantes (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2000; STEFANIDAKIS & KOIVUNEN, 2006; ELLIS e TANENTZAPF, 2010).

As integrinas podem estar na forma ligadas ou não-ligadas a MEC e assim influenciar diretamente os mecanismos de sobrevivência e apoptose. Integrinas ligadas a MEC medeiam sinais de sobrevivência, através do aumento de NF- κ B ou ativação da via PI3K-AKT, diminuição da atividade de p53, ativação e aumento da expressão de moléculas pró-sobrevivência como BCL-2 e FLIP. Já as integrinas não-ligadas a MEC sinalizam para a clivagem da Caspase 8 desencadeando a apoptose através da morte mediada por integrinas (IMD, do inglês: *Integrin-Mediated Death*). As células tumorais resistentes a IMD ganham a habilidade de metastizar. O balanço entre essas formas (ligadas e não-ligadas) garante a integridade dos órgãos e tecidos e previne as células viverem em ambientes não adequados (DESGROSELLIER e CHERESH, 2010).

Além de estarem presentes nas células tumorais, quando ligadas a células hospedeiras do tumor (células endoteliais, perivasculares, fibroblastos, células inflamatórias) influenciam o potencial maligno do tumor mediando processos como angiogênese, linfagiogênese, desmoplasia e inflamação. Na camada bilipídica das células, integrinas medeiam sinais intracelulares, ativando receptores de citocinas e receptores de fatores de crescimento (GFRs), assim, o *crosstalk* entre integrinas, fatores de crescimento, oncogenes, células do tumor e associadas, são cruciais para o desenvolvimento e progressão do tumor – Figura 6 (DESGROSELLIER e CHERESH, 2010).

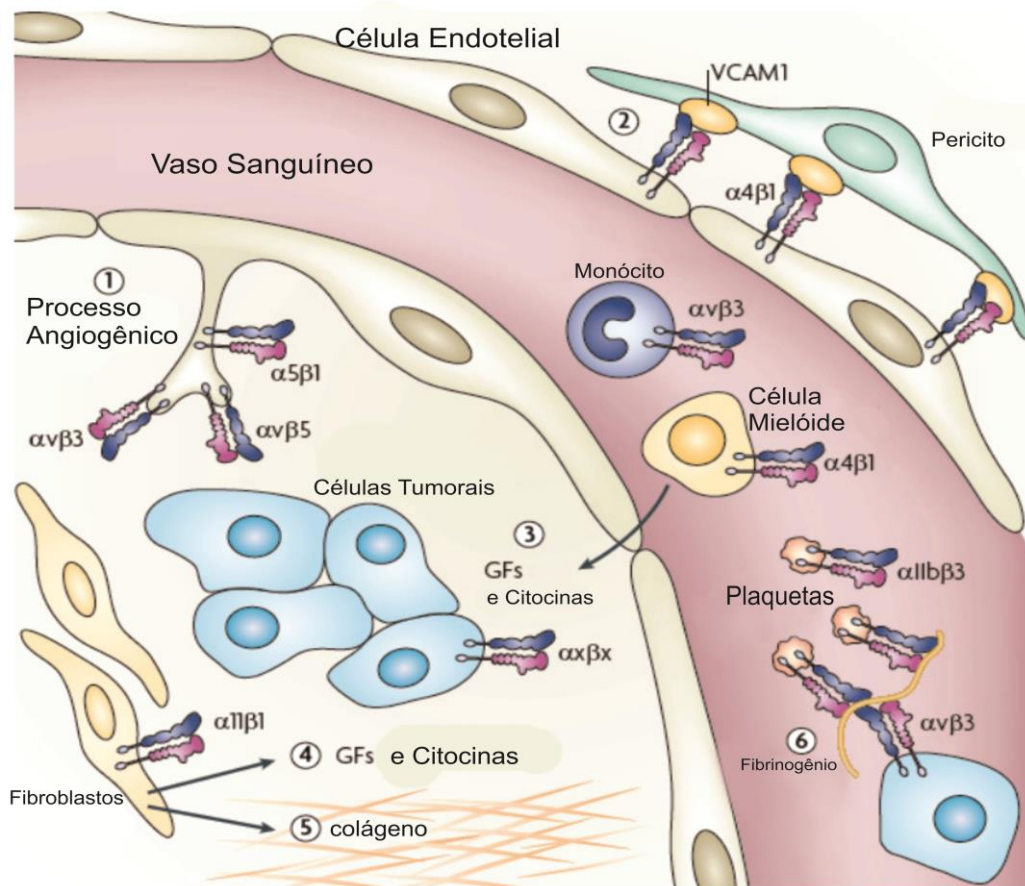


Figura 6: Integrinas e suas interações com as células tumorais e células-associadas ao tumor. 1. Nas células endoteliais integrinas regulam a migração, proliferação e sobrevivência necessárias para a angiogênese. 2. Pericitos e células musculares se associam com o endotélio em desenvolvimento para promover a formação/estabilização de novos vasos - sinalização mediada por $\alpha 4 \beta 1$. 3. Os monócitos e as células mielóides contribuem para a progressão do tumor. Integrinas nessas células induzem a secreção de citocinas e fatores de crescimento (GFs) – estimulam a angiogênese e a migração de células tumorais. 4. Infiltração de fibroblastos no tumor primário (desmoplasia) contribui para a progressão do tumor através de secreção aumentada de fatores de crescimento. 5. Os fibroblastos depositam grandes quantidades de colágeno que podem resultar na resistência à terapia em alguns tumores. 6. A expressão de $\alpha IIb \beta 3$ nas plaquetas interage com as $\alpha 5 \beta 3$ das células tumorais (através de uma ponte de fibrinogênio) o que facilita a disseminação metastática. **Fonte:** DESGROSELLIER e CHERESH, 2010.

Estudos recentes mostram que alguns oncogenes e receptores de crescimentos recrutam integrinas específicas para iniciação do tumor e sua progressão. Integrinas $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha v \beta 6$, são geralmente expressas em níveis basais no epitélio normal, porém estão altamente reguladas em alguns tumores.

3.3.2 β 1-Integrina

O receptor β 1-integrina, assim como todos os outros receptores β , exceto o β 4, consiste em um grande domínio extracelular, um único trecho transmembrana e um curto domínio intracelular citoplasmático. Embora desprovida de uma atividade enzimática intrínseca, o domínio citoplasmático regula sinais bidirecionais de dentro da célula regulando a conformação e afinidade ao ligante do domínio extra-celular (então chamado de sinalização de dentro pra fora, do inglês: *inside-out signaling*), assim como medeia a transdução de sinais e as interações com o citoesqueleto (a sinalização de fora para dentro, do inglês: *outside-in signaling*) (Shibue & Weinberg, 2009).

O receptor β 1-integrina pode heterodimerizar com uma das 12 subunidades α e mediar adesão e migração celular através da interação com muitos ligantes da MEC, como: colágeno, laminina, fibronectina, talina, etc. (HYNES, 2002; BELLIS, 2004). Estas proteínas são expressas em quase todos os tipos celulares desempenhando múltiplas funções, por exemplo, a α 4 β 1 participa da adesão e migração de neutrófilos e leucócitos (STEFANIDAKIS & KOIVUNEN, 2006); Os receptores α 1 β 1, α 2 β 1, α 4 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α 9 β 1 são cruciais na angiogênese (AVRAAMIDES GARMY-SUSINI & VARNER, 2008).

Além da alteração nos níveis de expressão de β 1-integrinas causar distúrbios no ambiente celular, sabe-se que a glicosilação alterada dessas moléculas tem sido frequentemente associada com a transformação maligna e progressão do tumor (JANIK et al., 2010). A mudança da estrutura de carboidratos nessas integrinas afeta as interações célula-célula e célula-matriz favorecendo o processo de metástase (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Evidências sugerem que a β 1-integrina é um substrato para a MGAT-5 (BELLIS, 2004). A superexpressão de *gnt-v* em vários tipos de células faz com que a β 1-integrina adquira níveis mais elevados de poli-lactosaminas β 1-6 ligadas, e, mais importante, a aquisição de tais estruturas está associada a uma profunda alteração na atividade dos heterodímeros que contêm β 1-integrina (SEALES et al., 2005). De acordo com GUO et al. (2002), o receptor da fibronectina, a integrina α 5 β 1, contém 26 sítios possíveis de glicosilação, sendo 14 na α 5-integrina e 12 em β 1-integrina. Esses mesmos autores, através de experimentos *in vitro*, viram que após indução da expressão de *gnt-v*, os níveis de ramificações de carboidratos β 1,6-ligados é bem maior no receptor β 1-

integrina (e não na $\alpha 5$ -integrina), o que altera as funções de adesão (diminui) e migração celular (aumenta), principalmente por não conseguir mais aderir a fibronectina.

Ao contrário da atividade pro- metastática, KREN et al. (2007), viram que algumas integrinas também podem agir como supressores de tumor, os autores utilizando ratos Rip1Tag2 para carcinogênese das células B pancreáticas, viram que os níveis de expressão de $\alpha 2\beta 1$ diminuem nas células tumorais o que aumenta o potencial de disseminação do tumor (a baixa expressão dessa integrina é prejudicial).

Alguns anticorpos alvo de $\beta 1$ integrinas (especialmente a $\alpha 5\beta 1$) já foram desenvolvidos e se mostram promissores na terapia anti-câncer. Esses anticorpos monoclonais já vêm se mostrando eficazes em diminuir o tamanho do tumor em estudos pré-clínicos. Um anticorpo para inibição de $\beta 1$ (o AIIB2) afetou o crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* em cultura de células de câncer de mama (PARK et al., 2008). O anticorpo monoclonal Volociximab, bloqueia a função da integrina $\alpha 5\beta 1$, já foi testado em estudos clínicos de fase I e fase II em pacientes com tumores sólidos e foi bem tolerado (KUWADA, 2007).

3.4 Lectinas

O estudo sobre as lectinas começou em 1888 quando Herrmann Stillmark descreveu as propriedades de aglutinação da ricina, extraída da planta *Ricinus communis* (BIES et al., 2004; SHARON e LIS, 2004). O termo lectina é derivado do latim *legere* que significa “escolher” ou “selecionar” e abrange todas as proteínas carboidratos-específicas de origem não imune e que tem a capacidade de aglutinar hemácias. Foram inicialmente descritas em plantas, mas sua ocorrência é ubíqua, as lectinas são encontradas em eucariotos (inferiores e superiores) e procariotos, bem como em vírus (SHARON e LIS, 2004).

A especificidade de ligação entre lectinas e seus carboidratos específicos pode ser comparada com a especificidade antígeno-anticorpo ou enzima-substrato (MINKO, 2004). Essas moléculas se ligam não só a oligossacarídeos presentes na superfície celular, mas também a glicanos livres na célula incluindo monossacarídeos, porém nesses casos, as interações são mais fracas (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011). Devido a essas propriedades de ligação com carboidratos essas proteínas têm

sido empregadas em uma gama de investigações científicas na área médica e biomédica, como na identificação de grupos sanguíneos, na caracterização de micro-organismos, na estimulação mitogênica de células imunes e no auxílio de diagnósticos histopatológicos, para o mapeamento dos estágios de diferenciação e desdiferenciação, nível de malignidade e capacidade de metástases (BELTRÃO et al., 2003; HITTELET et al., 2003; SOBRAL et al., 2010; VIEIRA-DE-MELLO et al., 2013).

Com o passar do tempo, a disponibilidade de um número cada vez maior de lectinas com diferentes especificidades para carboidratos resultou em uma crescente utilização dessas versáteis proteínas como instrumentos de pesquisas biomédicas (SHINAGAWA & ANDRESON, 2000). A lectina de *Sambucus nigra* (SNA) e de *Maackia amurensis* (MAL-II) reconhece especificamente o carboidrato ácido siálico em ligações α 2,6 e α 2,3, respectivamente (ZHAO et al., 2006). A lectina de *Phaseolus vulgaris* (L-Pha) reconhece a β -1,6-*N*-acetilglicosamina, produto da enzima MGAT-5 (SELL e da-COSTA, 2000; LI et al., 2008), já a lectina WGA (Aglutinina de *Triticum vulgaris*, do inglês *Wheat germ agglutinin*) se liga ao ácido siálico e preferencialmente a dímeros e trímeros do açúcar GlcNAc (SHARON E LIS, 2004).

Atualmente o estudo das glicoproteínas, assim como as implicações decorrentes de modificações sofridas durante o processo de glicosilação (aberrante ou diminuída) representa uma fonte promissora de investigação de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos. A influência do glicocódigo nestes glicoconjugados tem sido relacionada a estágios de doenças e sua detecção pelas lectinas pode fornecer informações úteis para o diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos (CHANDRASEKARAN et al., 2006; VIEIRA-DE-MELLO et al., 2013).

3.5 TMA (Microarranjos de Tecidos, do inglês: *Tissue Microarray*)

Microarranjos de tecidos (do inglês, *tissue microarrays*) são ferramentas relativamente recentes em Anatomia Patológica. Essa técnica foi primeiramente desenvolvida por BATTIFORA et al. em 1986 e foi chamada de *multi-tissue tumor block* (MTTB), porém as amostras de tecidos eram processadas juntas em um mesmo bloco de parafina de modo aleatório e não ordenado. KONONEN et al. (1998)

aprimoraram a técnica e dessa vez cilindros dos blocos de parafina doadores eram retirados e recolocados em um novo bloco (bloco receptor), com tamanhos e formas regulares (normalmente variando entre 0,6 a 2,0 mm de diâmetro) e de forma ordenada, com coordenadas X e Y pré-estabelecidas (Figura 7).

Essa técnica pode ser empregada nas reações de Imunohistoquímica, FISH (hibridização *in situ* fluorescente) ou CISH (hibridização *in situ* cromógena) e permite a análise de um grande número de amostras em apenas uma lâmina, com a vantagem de serem processadas em um mesmo momento e com condições idênticas permitindo ainda os estudos em duplicata ou triplicata, anteriormente inviáveis (ANDRADE et al., 2007). Pode ser utilizada para avaliação de centenas ou milhares de casos, para estudos populacionais de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, avaliação da sensibilidade e da especificidade dos novos anticorpos de imunohistoquímica ou novas sondas de FISH/CISH, etc.

A maior preocupação dos críticos na utilização do TMA é a representação da lesão, considerando a pequena área da amostra estudada (ANDRADE et al., 2007). Porém, a fidelidade dos resultados em relação ao uso dos cortes convencionais foi estudada para validação do método por vários autores (SAPINO. et al. 2006; SCHRAML et al. 1999). SAPINO et al. (2006) demonstraram que a metodologia TMA é aplicável à rotina da pesquisa de fatores prognósticos do câncer de mama através da amostragem de quatro áreas, incluindo regiões centrais e periféricas do tumor, os autores obtiveram alta concordância nos resultados com os cortes convencionais.

Hoje a técnica de TMA é bem aceita na literatura principalmente pela representatividade eficiente através da utilização de diferentes áreas dos tumores e distintos níveis de corte, possibilidade de repetição dos experimentos, estudo de grande número de amostras simultaneamente, grande economia de tempo e custos e uniformização das reações (SINGH & SAL, 2010).

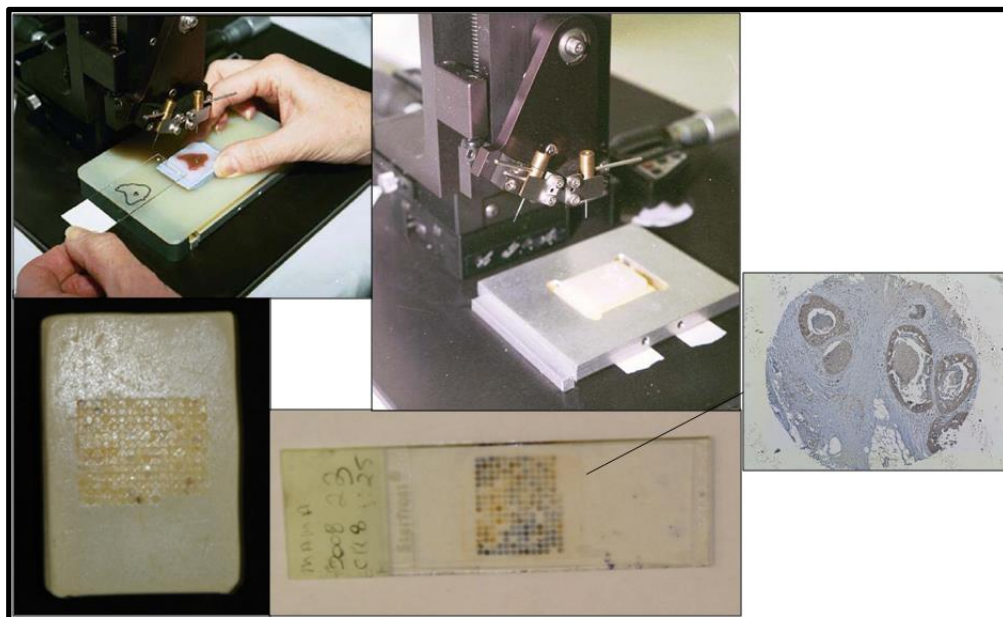


Figura 7. Confeção de um bloco de TMA com *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). No destaque um cilindro de TMA após técnica de IHQ.
 Fonte: fotos cedidas pelo Laboratório de Patologia Mamária da FMRP/USP.

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelos comitês de ética locais (Ribeirão Preto - Processo HCRP nº 242/2011; Recife – SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE No 195/09).

Do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC/FMRP/USP) foram selecionados 300 pacientes com carcinoma ductal invasivo (CDI) diagnosticados entre 1994 a 2005 e 150 casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) diagnosticados entre 2005 a 2011. Dos prontuários médicos foram obtidas as seguintes informações: idade, status menstrual (pré- ou pós-menopausa), tamanho do tumor no momento do diagnóstico, acometimento de linfonodos, estadiamento patológico, recorrência, metástase e óbito. Selecionou-se apenas uma biópsia por paciente e, para cada caso, todas as lâminas coradas com H&E (Hematoxilina e Eosina) foram revisadas para confirmar o diagnóstico de CDI e CDIS e selecionar a área do bloco de parafina mais representativa para confecção dos TMAs. Os blocos cujos tecidos apresentavam artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequados foram excluídos.

4.2 Microarranjos teciduais (TMA, do inglês “tissue microarray”)

A seleção dos fragmentos foi realizada através da análise de lâminas coradas com H&E. A partir dos blocos de parafina correspondentes aos fragmentos mais representativos de cada lesão de CDI, foram retirados cilindros de 1 mm de diâmetro e ordenados dentro de um bloco de parafina receptor utilizando o equipamento *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Silver Spring, EUA). A partir de cada bloco de TMA foram feitos cortes histológicos de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo convencional (Microm HM315, Walldorf, Alemanha) utilizando o *paraffin tape-transfer system* (Instrumedics, Saint Louis, EUA). Um corte foi corado com H&E para confirmar a presença de tumor em microscópio de luz convencional. Após a confirmação, os cortes foram colocados em lâminas de vidro revestidas com poli-lisina a 8% para a realização do método imunohistoquímico. A confecção dos blocos de TMA

foi feita no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo, SP, Brasil).

A confecção dos blocos de CDIS se deu da mesma forma, porém foram retirados cilindros de 2,1 mm de diâmetro. A confecção foi realizada no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

4.3 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada utilizando o kit MACH 4 Universal HRP *Polymer Detection* (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em etanol seriado (70-100%). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 e colocados em panela a vapor (*steamer*) por 40 minutos. As amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente, incubadas com solução a 2% de albumina de soro bovino (BSA), seguida de lavagem com TBS (Solução salina tamponada com tris) e incubadas a 4°C por 16h (*overnight*) com o anticorpo primário. Os cortes foram incubados com a solução de bloqueio pós-anticorpo primário (fornecido pelo kit) por 30 minutos e, então, incubados com o polímero (fornecido no kit) por 30 minutos, ambas a 25°C. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e contra-corada com hematoxilina. Os cortes foram desidratados em etanol e xilol e as lâminas foram cobertas por lamínula com Permount (Fischer, Fairlawn, NJ).

Os anticorpos utilizados neste estudo, suas diluições e respectivas marcas estão descritos na Tabela 2. Todas as reações foram feitas com um controle negativo (suprimindo-se o anticorpo primário com uso de tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4 - PBS) e com controles positivos, conforme especificação dos fabricantes. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foram examinadas todas as lâminas e foram consideradas células positivas aquelas coradas de marrom escuro reação com DAB. Os cilindros de tecido nos TMAs com menos de 50% da área representativa do tumor foram desconsiderados da análise.

Tabela 2. Anticorpos e suas respectivas diluições utilizadas neste trabalho.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
β 1-integrina	4B7R	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EUA.
MGAT-5	Poli	1:50	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA.
HER-2	RTJ1	1:50	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
P-53	DO-7	1:50	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
Ki-67	MM1	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
RE	6F11	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
RP	16	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
VEGF	CB11	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
MUC1	695	1:50	Biocare Medical, Concord, California, USA

4.4 Histoquímica com Lectinas

As lectinas utilizadas no estudo foram: L-PHA (Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), MAL-II (Lectina de *Maackia Amurensis*) e SNA (Lectina de *Sambucus nigra*) todas conjugadas a biotina (Vector Laboratories Inc., EUA). Os cortes de tecidos foram desparafinizados em xilol, reidratados em etanol seriado (70-100%), incubados em uma solução 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 30 minutos a 25 °C e tratados com solução de tripsina 0,1% por 15 min a 37°C. Para L-PHA, após a tripsina foi feito tratamento com neuraminidase de *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) a 0,1U/ml por 1h a 37°C. Após os tratamentos de tripsina e/ou neuraminidase, os cortes foram incubados com BSA 2% por 30 min a 25 °C. Lavagens com PBS 10mM, pH 7,4, foram realizadas entre cada reagente. Logo após, os tecidos foram incubados com as lectinas (20µg/mL) por 16h (*overnight*) a 4°C. Após lavagem com PBS as lâminas foram incubadas com o polímero streptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) por 45 min a 25°C. A reação foi revelada com DAB e contracorada com hematoxilina. Os cortes foram desidratados em etanol seriado e xilol e as lâminas cobertas por lamínula com Permount (Fischer, Fairlawn, NJ).

4.5 Cut Off

Para o *cut off* que definiria os casos positivos e negativos para a $\beta 1$ -integrina (marcação de membrana e/ou citoplasma), foi adotado o critério estabelecido por YAO et al. (2007). $\beta 1$ -integrina foi pontuada com base no percentual de células positivas ($0 \leq 10\%$; *score* 1+ = 10-25%; *score* 2+ = 25-50%; *score* 3+ $\geq 50\%$). Para análise estatística foi utilizado o mesmo método estabelecido por PETRICEVIC et al. (2012), onde os resultados foram apresentados como positivos (coloração positiva forte 3+ e coloração moderadamente positiva 2+) ou negativo (coloração positiva fraca 1+ e negativo 0) para as células tumorais marcadas.

O número de células neoplásicas positivas foi quantificado para cada marcador de rotina laboratorial. A avaliação de VEGF foi seguida de acordo com GIATROMANOLAKI et al. (2006) tendo em conta o grau de coloração positiva onde se dividiu os casos em médio/baixa reatividade (0-69% das células positivas) e alta reatividade (70 – 100% das células tumorais positivas). MUC1 (marcação de membrana) foi avaliada segundo ZANETTI et al. (2011) onde negativo (0- 5% das células marcadas), fracamente positivo ou 1+ (5-10% de células marcadas), positivo ou 2+ (de 10- 50% das células marcadas) e fortemente positivos ou 3+ ($>50\%$ das células marcadas). Para a análise estatística, agrupou-se os casos em negativos (0 e 1+) e positivos (2+ e 3+).

O *cut off* utilizado para MGAT-5 foi o estabelecido por DOSAKA-AKITA et al. (2004) que estabelece a expressão alta ou baixa de acordo com $\geq 50\%$ ou $<50\%$ das células tumorais positivas, respectivamente.

Para o Ki67 (marcação nuclear), foram considerados positivos os casos com mais de 14% das células marcadas indicando células com um alto índice proliferativo (FOUNTZILAS et al., 2012). Para Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona (marcação nuclear) foram considerados positivos os casos em que mais de 1% das células tumorais foram marcadas (ASCO/CAP ER/PR *guidelines*, HAMMOND et al., 2010). O P53 foi avaliado segundo ERCAN et al. (2012) onde somente era considerado positivo se mais de 5% das células apresentassem os núcleos corados.

A expressão de HER-2 foi quantificada de acordo com as orientações da ASCO/CAP HER2 *guidelines* (WOLF et al., 2007), onde: coloração intensa de membrana em $>30\%$ de células tumorais foi considerada positiva (3+); moderada (2+)

quando coloração de membrana em $\geq 10\%$ ou coloração forte em $\leq 30\%$ das células tumorais, enquadrada como equívoca (seguido para CISH); fraco (1+) quando havia coloração de membrana fraca ou quase imperceptível e negativo (0) na ausência de marcação.

Para as lectinas utilizadas neste trabalho, foi utilizado o *cut-off* de DOSAKA-AKITA et al., 2004, que define como negativo uma marcação $< 10\%$ das células tumorais; moderada entre 10% a 30% e alta uma expressão em $> 30\%$ das células neoplásicas marcadas.

4.6 Híbridização *in situ* Cromógena – CISH

Seções de 3 μm foram feitas dos blocos de parafina dos casos HER-2 2+. O kit ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha) foi utilizado para a detecção do gene humano HER-2 e as regiões alfa satélites do cromossomo 17 (CEN 17). O protocolo foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante e os dados interpretados quando dois sinais verdes (HER-2) e dois vermelhos (CEN 17) foram esperados no núcleo normal interfásico. O HER-2 foi considerado amplificado quando o índice de HER-2/CEN 17 ≥ 2 para 60 células (OLIVEIRA-COSTA et al., 2010). Somente as biópsias que através da imunohistoquímica foram consideradas +2 e que também foram amplificadas pelo CISH foram consideradas positivas.

4.7 Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando o SPSS v19.0 software (SPSS Inc., Woking, UK). A relação entre a expressão de $\beta 1$ -integrina e demais marcadores estudados com marcadores imunohistoquímicos e dados clínicos e histopatológicos de cada paciente foram testados com tabelas cruzadas aplicando-se o teste de qui-quadrado (quando houve três ou mais variáveis) ou o teste exato de Fisher (para duas variáveis). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p = < 0,05$. Para a recorrência e óbito foram utilizadas curvas de sobrevida segundo o método de Kaplan-Meier com Log-Rank. O risco relativo associado com a superexpressão de cada um dos marcadores foi avaliado pelo teste de regressão múltipla de Cox. Para observar a independência do valor prognóstico da imunoexpressão de $\beta 1$ -integrina utilizamos o modelo *Cox proportional hazards*. A análise multivariada de sobrevivência foi realizada

com todos os parâmetros que foram significantes na análise univariada usando o modelo de *Cox regression*.

5 RESULTADOS

5.1 β 1 INTEGRIN PREDICTS SURVIVAL IN BREAST CANCER: A CLINICOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Artigo publicado na revista *Diagnostic Pathology* em 16 de Agosto de 2012.

Acesso em: <http://www.diagnosticpathology.org/content/7/1/104>



RESEARCH

Open Access

Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study

Petra Barros dos Santos^{1*}, Juliana S Zanetti², Alfredo Ribeiro-Silva² and Eduardo IC Beltrão^{1,3}

Abstract

Background: The main focus of several studies concerned with cancer progression and metastasis is to analyze the mechanisms that allow cancer cells to interact and quickly adapt with their environment. Integrins, a family of transmembrane glycoproteins, play a major role in invasive and metastatic processes. Integrins are involved in cell adhesion in both cell-extracellular matrix and cell-cell interactions, and particularly, $\beta 1$ integrin is involved in proliferation and differentiation of cells in the development of epithelial tissues. This work aimed to investigate the putative role of $\beta 1$ integrin expression on survival and metastasis in patients with breast invasive ductal carcinoma (IDC). In addition, we compared the expression of $\beta 1$ integrin in patients with ductal carcinoma in situ (DCIS).

Methods: Through tissue microarray (TMA) slides containing 225 samples of IDC and 67 samples of DCIS, $\beta 1$ integrin expression was related with several immunohistochemical markers and clinicopathologic features of prognostic significance.

Results: $\beta 1$ integrin was overexpressed in 32.8% of IDC. In IDC, $\beta 1$ integrin was related with HER-2 ($p = 0.019$) and VEGF ($p = 0.011$) expression and it had a significant relationship with metastasis and death ($p = 0.001$ and $p = 0.05$, respectively). Kaplan-Meier survival analysis showed that the overexpression of this protein is very significant ($p = 0.002$) in specific survival (number of months between diagnosis and death caused by the disease). There were no correlation between IDC and DCIS ($p = 0.559$) regarding $\beta 1$ integrin expression.

Conclusions: Considering that the expression of $\beta 1$ integrin in breast cancer remains controversial, specially its relation with survival of patients, our findings provide further evidence that $\beta 1$ integrin can be a marker of poor prognosis in breast cancer.

Virtual slides: The virtual slide(s) for this article can be found here: <http://www.diagnosticpathology.diagnomx.eu/vs/6652215267393871>

Keywords: $\beta 1$ integrin, Tissue microarray, Immunohistochemistry, Prognosis

Background

Integrins are a family of transmembrane receptors. They are heterodimers composed by two subunits, α and β , which are non-covalently linked and depend of divalent cations [1]. A total of 18 α and 8 β subunits have been identified. These subunits combine to form 24 distinct heterodimers, however splice variants have

been identified for some subunits and the number can reach at least 100 types [2,3]. These molecules can mediate intra and extracellular signals involved in the organization of cells, tissues and organs during development. Moreover they can directly or indirectly influence on many aspects of cell behavior, such adhesion, migration and proliferation. They also play a significant role in signal transduction events, such as gene expression and regulation of cell apoptosis [4,5].

Invasive breast carcinoma is associated with a high mortality rate due to invasion to the lymph nodes, adjacent tissues and also due to metastasis. Invasive ductal

* Correspondence: petrabarros@yahoo.com

¹Department of Pathology, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



carcinoma (IDC) is the most common histological type, accounting for approximately 40–75% of all cases. IDC has a relatively poor prognosis with 35–50% 10-year survival rate [6,7]. Traditionally, as also verified in several other solid tumors, peritumoral lymphatic and blood invasion are the main factor related to the presence of lymph node metastasis and, in breast cancer, they are more closely related to tumor size and histological grade and it is known that integrins are closely related to these processes [8,9].

$\beta 1$ integrin is the mainly expressed integrin in normal cells and in tumor-associated cells, in which they control various developmental processes including angiogenesis, tumor progression and metastasis [10]. These integrins typically mediate adhesion of epithelial cells to the basement membrane. They may also contribute to cell survival of tumor cells by interacting with others molecules. $\beta 1$ integrin usually activate cytokine receptors or growth factors receptors (FGRs) and as a result, the tumor growth and invasion probably depends on the crosstalk with certain integrins, FGRs and/or oncogenes in tumor cells and tumor-associated cells [11]. Based on these observations, $\beta 1$ integrin has become a target of interest for immunotherapy in several types of cancers, including breast cancer [12]. In recent years, several $\beta 1$ integrins antagonists have been studied [13,14].

Over the last years, the study of ductal carcinoma in situ (DCIS) associated with invasive carcinoma has helped to understand the mechanisms involved in disease progression from DCIS to IDC [15]. Many studies have been reported conflicting results about the role of integrins in cancer cells and also in the patients' survival, and how these integrins may contribute to metastasis [16,17]. We aimed to evaluate the $\beta 1$ integrin expression in IDC and its relationship with several biomarkers and clinicopathologic features of prognostic significance. In addition, we compared the pattern of $\beta 1$ integrin expression in IDC and DCIS.

Methods

Casuistic

This study was approved by the local Research Ethics Committee. Formalin-fixed, paraffin-embedded samples of IDC and DCIS from 300 and 100 patients, respectively, diagnosed from 1994 to 2010, were randomly chosen from the archives of Department of Pathology-Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University. The clinical data of these patients were retrieved from medical files, and included age, menopausal status, tumor size, metastasis to regional lymph nodes, recurrence, distant metastasis and death. Disease-specific survival, metastasis-free survival and disease-free survival were defined by Zanetti and colleagues [18].

For DCIS patients the following information was retrieved from clinical and pathological records: age, menstrual status, hormone receptors status (ER and PR), nuclear grade (low, intermediary and high), tumor size and if the tumor was multifocal or not.

Tissue microarray (TMA)

All hematoxylin and eosin stained slides were reviewed by an experienced breast pathologist (ARS). Three tissue microarrays (TMA) paraffin blocks were constructed from the IDC cases (100 cases per TMA) and five TMA paraffin blocks were constructed containing 24 DCIS cases per TMA. For the construction of the IDC and DCIS TMAs, core biopsies of 1-mm diameter were punched from the selected regions of each donor paraffin blocks and arrayed into the TMA receptor block. One section of each was stained with hematoxylin and eosin to confirm the presence of the tumor by light microscopy. The three IDC's TMAs contained a total of 300 samples; however, 75 cases had to be excluded because of insufficient amount of tumor in the core. In that way, the study was performed in the 225 remaining cases that had high quality tissue spot that could be read for $\beta 1$ integrin and the others markers. DCIS's TMAs contained a total of 100 samples but only 67 had enough tumor tissue at the core, which were included in the analysis.

Immunohistochemistry

Sections (3 μ m) were obtained from the TMAs paraffin blocks and immunohistochemical reactions were performed with the Mach 4 Universal Polymer Detection kit (Biocare Medical, CA, USA) following protocols that were described elsewhere [18,19]. $\beta 1$ integrin was detected using clone 4B7R (1:100) and VEGF with clone A-20 (1:100), both from Santa Cruz, Palo Alto, USA. The other antibodies are from Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK: p53 (1:50, clone DO-7), ER (1:100, clone 6 F11), PR (1:100, clone 16), HER-2 (1:100, clone CB11) and Ki67 (1:100, clone MM1). Normal liver samples were used as positive control for $\beta 1$ integrin. IDC cases previously known to be positive for Ki67, ER, PR, p53, HER-2 were used as positive controls for each reaction. Negative controls were prepared omitting the primary antibody.

Immunohistochemistry evaluation

$\beta 1$ integrin cut-off was based according to Yao and colleagues [20] in which sample was scored based on the intensity of signal (0, 1+, 2+ 3+) and the percentage of positive cells (0 $\leq$ 10%, 1 = 10–25%, 2 = 25–50%, 3 $\geq$ 50%). For statistical analysis we used the same method established by Petricevic and colleagues [21] where the results were presented as a positive (strong positive staining 3+

and moderately positive staining 2+) or a negative (weak positive 1+ and negative staining 0) for tumor cells.

HER-2 was evaluated according to the ASCO/CAP HER2 guideline [22] and cases as 2+ were submitted to chromogenic in situ hybridization (CISH) [23]. Only HER-2 2+ cases in immunohistochemistry amplified on CISH were considered positive for statistical purposes. VEGF immunoscore, according to Giatromanolaki and colleagues [24], was divided into two groups regarding the extent of positive staining: low/medium reactivity (0–69% positive cells) and high reactivity (70–100% positive cells).

For ER and PR we follow the recommendations of the ASCO/CAP ER/PR guidelines (2010) [25]. Ki67 was evaluated following Fountzilas and colleagues [26] and cases were considered highly proliferative when more than 14% of neoplastic cells nuclei were positive. p53 were considered positive if more than 5% of the neoplastic cells showed nuclear staining [27].

Chromogenic in situ hybridization (CISH)

Sections (3 μ m) were cut from paraffin blocks of HER-2 cases with 2+ immunohistochemistry positivity. ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe kit (Zytovision, Bremerhaven, Germany) was used for the detection of the human HER-2 gene and alpha-satellites of chromosome 17 (CEN 17). Procedures were according to manufacturer's instructions where two green (HER-2) and two red (CEN 17) signals were expected in a normal interphase nucleus. HER-2 was considered amplified when the HER-2/CEN 17 ratio was ≥ 2 for 60 cells [28]. Only 2+ biopsies by immunohistochemistry in which HER-2 was also amplified on CISH were considered positive.

Statistical methods

Data analysis was performed with SPSS v19.0 (SPSS Inc., Woking, UK) with $p < 0.05$ for significance. Relation between $\beta 1$ integrin, VEGF, HER-2 and the routine laboratory markers and clinicopathologic features were analyzed by Fisher exact test (two variables) or Chi-square tests (three or more variables), and all tests were two-tailed. Univariable survival analysis (disease-specific survival, disease-free survival and metastasis-free survival) were made with the log rank test and all results were displayed in Kaplan–Meier. A Cox Proportional Hazards Model was performed to observe the independent prognostic value of immunoexpression of $\beta 1$ integrin.

Results

Relationship between the expression of $\beta 1$ integrin with clinicopathological features and biological markers

IDC cases with less than 50% of representative tumor area by hematoxylin eosin staining were excluded. Two hundred twenty five cases of IDC were then analyzed.

The average age of patients included in this study was 55 years old (range 25–85 years).

There was no significant relation between the expression of $\beta 1$ integrin with biomarkers such ER and PR. These results are shown in Table 1. $\beta 1$ integrin positive tumors did not correlate with tumor size, pathologic stage, age, menstrual status, lymph node status and tumor grade but presented a close relation with death and metastasis ($p = 0.001$ and $p = 0.05$, respectively) as well as with HER-2 ($p = 0.019$) and VEGF ($p = 0.011$).

Survival analysis

Chi-square test for $\beta 1$ integrin and correlation for death and metastasis showed that 35 patients died and that 34 out of these had $\beta 1$ integrin superexpression and that 36 patients developed metastasis and that 26 out of them had $\beta 1$ integrin superexpression. The Kaplan–Meier test was used to estimate the survival time of patients that

expressed or not $\beta 1$ integrin during the research time (maximum 164 months). Our results indicate that the expression of $\beta 1$ integrin has an impact in disease-specific survival (number of months from diagnosis to the time of death due to breast cancer) with $p = 0.002$ (Figure 1). For metastasis-free survival (Figure 2) and disease-free survival (Figure 3) no significant relation was observed ($p = 0.061$ and $p = 0.252$, respectively).

A Cox Proportional Hazards Model was performed to observe the independent prognostic value of $\beta 1$ integrin expression with several prognostic factors such menopausal status, clinical stage, Bloom–Richardson, recurrence, but no correlation was found; data not shown.

IDC x DCIS

The expression of $\beta 1$ integrin was also evaluated in 67 patients with DCIS. The average age of patients included in this study was 51 years old (range 23–84 years). Forty-two cases were presented as multifocal and the architectural pattern was mostly solid, comedo and cribriforme, and in our casuistic, 42 cases was associated with invasive carcinoma. Representative samples of IDC and DCIS are shown in Figure 4. There was no significant relation between the expression of the $\beta 1$ integrin in DCIS with clinical and pathological factors of prognostic significance. Twenty-two patients were positive for $\beta 1$ integrin where 10 were pre-menopausal and 12 were post-menopausal. Nineteen presented high nuclear grade and only three patients had low nuclear grade.

The relation between the expression of biomarkers, such as ER and PR, and $\beta 1$ integrin in IDC and DCIS were not significant (Table 2).

Discussion

According to Kononen and colleagues [29] tissue microarrays (TMAs) were developed to allow high throughput

analysis of protein expression in tumors tissues and many authors agree that they can be used to validate biomarkers [30-32]. Here, $\beta 1$ integrin expression and its relationship with survival of patients with IDC were analyzed in a tissue microarray.

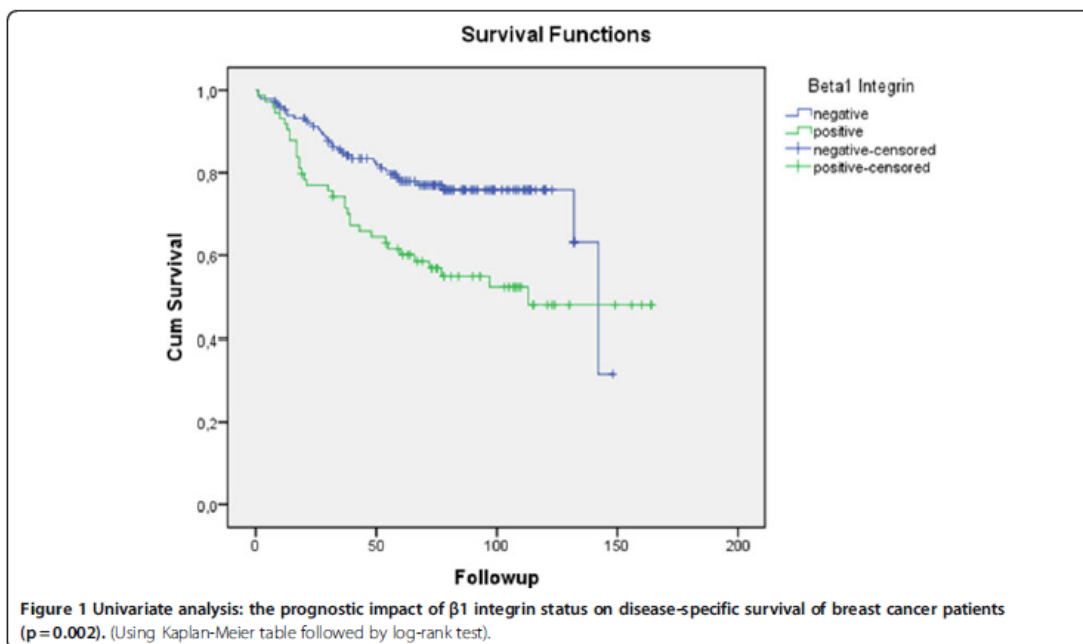
During the last years a number of reports have linked integrins to tumorigenicity ranging from local tumor growth to metastasis [33] and it is well documented that integrins contribute to migration and invasion of cancer

cells [34]. $\beta 1$ integrin is the most widely expressed integrin in cells and has been suggested to play a role in predicting the clinical course and prognosis of several types of cancers [20]. However, Brakebusch and colleagues [35] argue that it is not surprising that some studies link tumorigenicity to $\beta 1$ integrin in the form of down- or up-regulated expression. For example, according to Guo and colleagues [36] $\beta 1$ integrin is the most abundantly expressed integrin in Non-small-cell lung carcinoma and

Table 1 Relationship between $\beta 1$ integrin expression with clinicopathologic features and classical immunohistochemical markers in breast cancer, including VEGF

Clinicopathologic Features and Immunohistochemical Markers		$\beta 1$ Integrin ⁻		$\beta 1$ Integrin ⁺		P-value
		n (151)	(%)	n (74)	(%)	
Age (years)	<50	65	43.0	27	36.5	0.213 ^a
	>50	86	67.0	47	63.5	
Menstrual Status	Pre-menopausal	54	35.8	24	32.4	0.367 ^a
	Post-menopausal	97	64.2	50	67.6	
Size (mm)	<20	49	32.5	19	25.7	0.442 ^b
	20-50	55	36.4	33	44.6	
	>50	47	31.1	22	29.7	
Tumoral Grade	I	57	37.7	25	33.8	0.845 ^b
	II	71	47.0	37	50.0	
	III	23	15.2	12	16.2	
Lymph node Status	Negative	75	49.7	33	44.6	0.283 ^a
	Positive	76	50.3	41	55.4	
Clinical Stage	I	22	14.6	10	13.5	0.677 ^b
	II	72	47.7	30	40.5	
	III	49	32.5	30	40.5	
	IV	8	5.3	4	5.4	
Death	No	116	76.8	40	54.1	0.001 ^a
	Yes	35	23.2	34	45.9	
Metastasis	No	115	76.2	48	64.9	0.05 ^a
	Yes	36	23.8	26	35.1	
ER	Negative	48	31.8	21	28.4	0.359 ^a
	Positive	103	68.2	53	71.6	
PR	Negative	64	42.4	33	44.6	0.431 ^a
	Positive	87	57.6	41	55.4	
p53	Negative	114	75.5	51	68.9	0.187 ^a
	Positive	37	24.5	23	31.1	
Ki-67	Negative	107	70.9	54	73.0	0.435 ^a
	Positive	44	29.1	20	27.0	
HER2	Negative	126	83.4	52	70.3	0.019 ^a
	Positive	25	16.6	22	29.7	
VEGF	Negative	114	75.5	66	89.2	0.011 ^a
	Positive	37	24.5	8	10.8	

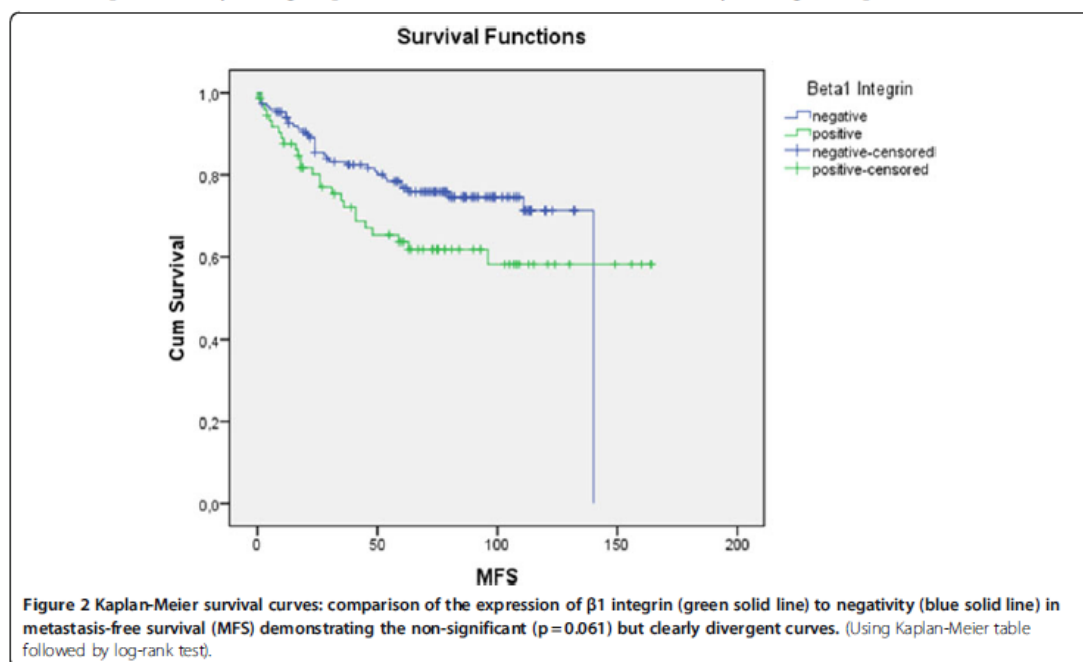
^aFisher's exact test; ^bChi-square test.



other authors [37] founded that its expression has been associated with lymph node metastasis in the same type of cancer. Although Kren and colleagues [38] noted that the low expression of $\beta 1$ integrin promoted tumor cells

dissemination in a mouse model of pancreatic β cell carcinogenesis.

In regard to breast cancer, some studies have reported that decreased $\beta 1$ integrin expression was associated



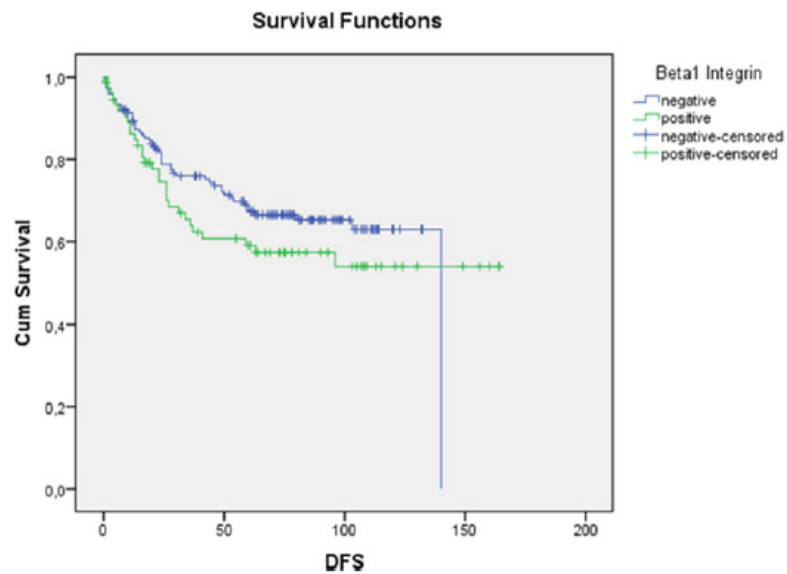


Figure 3 Lack of significant difference ($p=0.252$) in the curves for presence (green solid line) or absence (blue solid line) of expression for $\beta 1$ subunit in disease free-survival (DFS). (Using Kaplan-Meier table followed by log-rank test).

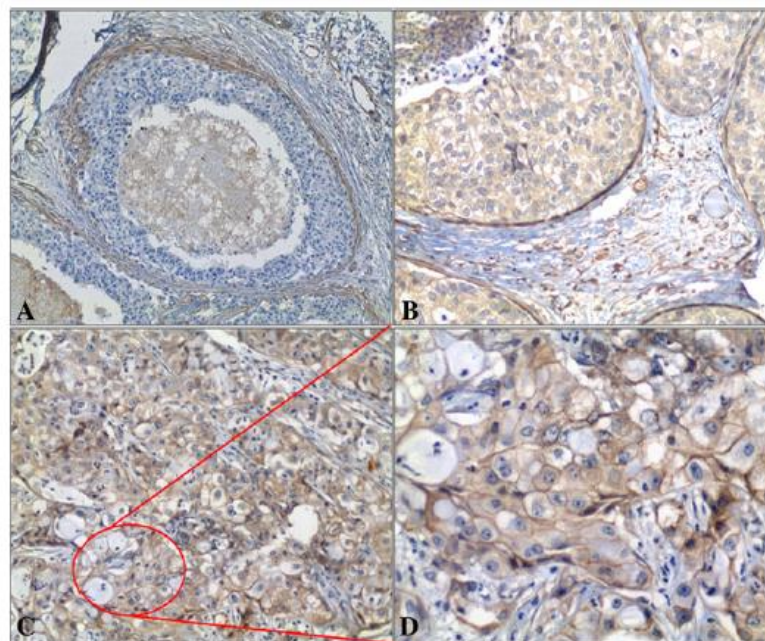


Figure 4 Immunohistochemistry for $\beta 1$ integrin in Invasive and In situ Breast Carcinoma. DCIS: (A) negative (100x) and (B) positive (200x); IDC: (C) positive (200x) and (D) detail with 400x of the circled area. $\beta 1$ integrin can be found both in cytoplasm and plasma membrane. (SP method, high power microscopic view).

Table 2 Frequency of $\beta 1$ integrin ($\beta 1$), Progesterone Receptor (PR) and Estrogen Receptor (ER) expression in breast carcinomas

Markers		Group		P-value
		IDC	DCIS	
		n (%)	n (%)	
$\beta 1$	Negative	151 (67,1)	45 (67,2)	1,000 ^a
	Positive	74 (32,9)	22 (32,8)	
PR	Negative	87 (38,7)	20 (29,9)	0,198 ^b
	Positive	138 (61,3)	47 (70,1)	
ER	Negative	76 (33,8)	17 (25,4)	0,233 ^b
	Positive	149 (66,2)	50 (74,6)	

with characteristics of more aggressive disease [39,40], while others observed that the high expression of $\beta 1$ integrin is associated with decrease survival [20]. Berry and colleagues [41] and Petricevic and co-workers [21] verified no significant correlation with $\beta 1$ integrin expression and survival of patients with breast carcinoma. Then, it is possible to realize that there are controversies in the studies concerning the expression of this protein as well as its relation with survival rate in patients with breast cancer.

We choose the same score used by Yao and colleagues [20] based on the level of signal and percentage of tumor cells expressing the signal. Here, we provide evidences that

$\beta 1$ integrin high expression (2+ and 3+) can be predictive of response and has impact on specific-free survival in patients with breast cancer. Ours findings did not relate $\beta 1$ integrin with metastasis free survival. Some authors suggested that $\beta 1$ integrin is important but not essential for metastasis [35]. All these findings are in accordance with previous reports in different types of cancer [42-44], including previous studies that showed that $\beta 1$ integrin inhibition induces apoptosis in breast cancer cells [45].

The basement membranes are reservoirs for growth factors [46] and it is well known that specific integrins can activate specific FGRs [11]. For example, Hayashida and colleagues [47] founded that $\beta 1$ integrin are dependently linked with TGF- $\beta 1$, and that knocking $\beta 1$ integrin down enhances the cell collagen production trough TGF- $\beta 1$. Nowadays, it is well known that the interaction between FGRs and integrins can regulate cell survival and proliferation and supporting tumor growth [48,49].

Some studies linked $\beta 1$ integrin with members of the FGR family including VEGF [50]. This can promote angiogenesis through up-regulation and/or activation of integrins [51]. Other study demonstrated that VEGF activity is dependent on $\beta 1$ integrin function. In this study the authors founded that the knockout of $\beta 1$ integrin in embryonic stem cells, neither the proliferation of the endothelial cells nor sprouting of blood vessels occurred,

suggesting that VEGF had no effect in $\beta 1$ -null embryoid bodies [52]. More interestingly Lee and colleagues [51] with *in vitro* studies, with human brain microvascular endothelial cells, showed that blocking $\beta 1$ integrin, all processes of angiogenesis was inhibited (adhesion, migration, and capillary morphogenesis) and they also suggested that the $\alpha 6 \beta 1$ integrin is closely related to the metastasis of breast cancer cells to the brain.

Studies have demonstrated that some oncogenes require specific integrins for tumorigenicity. Integrins are not oncogenic molecules, but some of them can cooperate with oncogene to initiate growth, invasion and progression of the cancer [11]. In a transgenic mouse model of human breast cancer some authors founded that $\beta 1$ integrin mediates the initiation of mammary tumorigenesis that is driven by the polyoma middle T oncoprotein [53].

Recent data suggest a relationship between HER-2 and $\beta 1$ integrin. Shimizu and colleagues [54], in a study with breast cancer cell line, suggested that the $\alpha 6 \beta 1$ integrin inhibits HER-2 signals by proteolytic cleavage of the cytoplasmic domain of HER-2 and this could also contribute to the regulation of tumor growth. Other authors [55] demonstrated that even under adverse conditions such as hypoxia and chemotherapeutic treatments there is a strong regulation between HER-2 signaling stimulating the expression of the integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ which promotes tumor cell survival.

In the present study, we found a relationship between low expression of $\beta 1$ integrin and negativity for HER-2 demonstrating some evidence that this subgroup of patients might have a less aggressive phenotype. Besides, we showed that patients who had high $\beta 1$ integrin expression showed the poor prognostic.

Angiogenesis is induced by VEGF through its interaction with receptors expressed primarily on the vascular endothelial cell membrane [18] and is well known that tumors depend largely on effective angiogenesis [35]. The amplification of the proto-oncogene HER-2 is observed in approximately 15–30% of all breast cancer samples and has been correlated with a shorter survival [23,56]. An important aspect of the involvement of $\beta 1$ integrin in angiogenesis and tumorigenicity is the potential implication for tumor treatment [57]. This study shows that $\beta 1$ integrin expression on tumor cells actually promote tumor progression and acts as a tumor enhancer. In addition, our results indicate that both expression of the $\beta 1$ integrin and its association with HER-2 and VEGF may be useful in targeted therapies for patients with breast cancer.

One of the main focuses concerning breast cancer has been the identification of the molecular alterations associated with the different stages of the progression disease. According to Bombonati and Sgroi [7] the current model of human breast cancer progression proposes a

linear multi-step process which initiates as flat epithelial atypia, progresses to atypical ductal hyperplasia, evolves into DCIS and culminates in the potentially lethal stage of IDC. In our study we do not found association with the expression of $\beta 1$ integrin in IDC and DCIS. 67,1% of the IDC cases were negative for $\beta 1$ integrin and 67,2% were negative in DCIS cases, with no significant relation probably due to the limited number of cases.

Conclusions

Subgroups of patients with negativity for $\beta 1$ integrin and HER-2 might have a less aggressive phenotype. Taken together with the differential expression of VEGF these findings may be useful in targeted therapies for patients with breast cancer. Although there was no association between $\beta 1$ integrin expression in IDC and DCIS the relationship in these types of cancer needs to be better understood, and further studies are needed to clarify the molecular basis involved in this process.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PBS: participated in conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, carry out all of the experiments; JSZ: participated in analysis and interpretation of data, carry out part of the experiments; ARS: participated in study design and coordination, and revising it critically for important intellectual content. EICB: help in material support for obtained and funding, and supervised study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) for financial support, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brazil) for scholarships and financial support; and Deisy Mara da Silva for technical assistance.

This research is in accordance with Declaration of Helsinki, and was approved by the local ethics committee.

Author details

¹Department of Pathology, Laboratory of Immunopathology, Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil. ²Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. ³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil.

Received: 28 May 2012 Accepted: 10 August 2012

Published: 16 August 2012

References

- Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002, **110**(6):673-687.
- Melker AA, Sonnenberg A: Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 1999, **21**(6):499-509.
- Glicrease MZ: Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett* 2007, **247**(1):1-25.
- Seftor REB: Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha (v)beta3 integrin expression. *Am J Pathol* 1998, **153**(5):1347-1351.
- Ellis SJ, Tanentzapf G: Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interactions. *Cell Tissue Res* 2010, **339**(1):121-130.
- Tavassoli FA, Devilee P: World health organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press; 2003.
- Bombonati A, Sgroi DC: The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol* 2011, **223**(2):307-317.
- Mizejewski G: Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999, **222**(2):124-138.
- Weigelt B, Peterse JL, Van't Veer LJ: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(8):591-602.
- Li N, Zhang Y, Naylor MJ, Schatzmann F, Maurer F, Wintermantel T, Schuetz G, Mueller U, Streuli CH, Hynes NE: Beta integrins regulate mammary proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J* 2005, **24**(11):1942-1953.
- Desgrosellier JS, Cheresch DA: Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(1):9-22.
- Park CC, Zhang HJ, Yao ES, Park CJ, Bissell MJ: Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 2008, **68**(11):4398-4405.
- Bhaskar V, Zhang D, Fox M, Seto P, Wong MH, Wales PE, Powers D, Chao DT, Dubridge RB, Ramakrishnan V: A function blocking anti-mouse integrin alpha5beta1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl Med* 2007, **5**(61):1-11.
- Ricart AD, Tolcher AW, Liu G, Hohen K, Schwartz G, Albertini M, Weiss G, Yazji S, Ng C, Wilding G: Volockimab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin Cancer Res* 2008, **14**(23):7924-7929.
- Van Diest PJ: Ductal carcinoma in situ in breast carcinogenesis. *J Pathol* 1999, **187**(4):383-384.
- Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A, Boyd KL, O'Rear LD, Nashabi A, Li Z, Dupont WD, Zijlstra A, Zutter MM: The $\alpha 5 \beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest* 2011, **121**(1):226-237.
- Kolstinen P, Ahonen M, Kähäri VM, Heino J: alphaV integrin promotes *in vitro* and *in vivo* survival of cells in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2004, **112**(1):61-70.
- Zanetti JS, Soave DF, Oliveira-Costa JP, da Silveira GG, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A: The role of tumor hypoxia in MUC1-positive breast carcinomas. *Virchows Arch* 2011, **459**(4):367-375.
- Ribeiro-Silva A, Moutinho MA H, Moura B, Vale FR, Zucoloto S: Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. *Histol Histopathol* 2006, **21**(4):373-382.
- Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C: Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* 2007, **67**(2):659-664.
- Petricovic B, Vrbancic D, Jakic-Razumovic J, Brdic I, Rabic D, Badovinac T, Ozimec E, Ball V: Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Med Oncol* 2012, **29**:486-494.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists: American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007, **131**:18-43.
- Oliveira-Costa JP, Zanetti J, Oliveira LR, Soares FA, Ramalho LZ, Silva Ramalho F, Garcia SB, Ribeiro-Silva A: Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. *Hum Pathol* 2010, **41**(11):1624-1630.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL: Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001, **61**(21):7992-7998.

25. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al: American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010, **28**(16):2784-2795.
26. Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Batistatou A, Kotoula V, Trihila H, Malamou-Mitsi V, Millaras S, Chrisafi S, Papadopoulos S, Sotiropoulos M, Filippidis T, Gogas H, Koletsis T, Bafaloukos D, Televantou D, Kalođeris KT, Pectasides D, Skarlos DV, Kourtas A, Dimopoulos MA: Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* 2012, **7**(6):e37946.
27. Ercan C, van Diest PJ, van der Ende B, Hinrichs J, Bult P, Buerger H, van der Wall E, Derksen PW: p53 mutations in classic and pleomorphic invasive lobular carcinoma of the breast. *Cell Oncol* 2012, **35**:111-118.
28. O'Connell JT, Zhi-Ming S, Ehud D, Basbaum CB, Barsky SH: Altered mucin expression is a field change that accompanies mucinous (colloid) breast carcinoma histogenesis. *Hum Pathol* 1998, **29**(12):1517-1523.
29. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärilund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998, **4**(7):844-847.
30. Zhang DH, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES-C: Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol* 2003, **16**(1):79-85.
31. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M: Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol* 2008, **19**(1):19-25.
32. Lawson MH, Cummings NM, Rassl DM, Vowler SL, Wickens M, Howat WJ, Brenton JD, Murphy G, Rintoul RC: Bcl-2 and β 1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2010, **103**(11):1710-1715.
33. Varner JA, Cheresi DA: Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**(5):724-730.
34. Guo W, Pylyayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller WJ, Inghirami G, Giaccotti FG: Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* 2006, **126**(3):489-502.
35. Brakebusch C, Hirsch E, Potocnik A, Fässler R: Genetic analysis of β 1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* 1997, **110**(23):2895-2904.
36. Guo L, Zhang F, Cai Y, Liu T: Expression profiling of integrins in lung cancer cells. *Pathol Res Pract* 2009, **205**(12):847-853.
37. Dingemans AM, van den Boogaart V, Vosse BA, van Suylen RJ, Griffioen AW, Thijssen VL: Integrin expression profiling identifies integrin α 5 and β 1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2010, **9**(152):1-9.
38. Kren A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fässler R, Cavallaro U, Christofori G: Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of β 1-integrin function. *EMBO J* 2007, **26**(12):2832-2842.
39. Gonzalez MA, Pinder SE, Wencyk PM, Bell JA, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JF, Blamey RW, Ellis IO: An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, α - and β /gamma-catenins, and α 2- and β 1- integrins in invasive breast cancer. *J Pathol* 1999, **187**(5):523-529.
40. Lanzafame S, Emmanuele C, Torrisi A: Correlation of α 2 β 1 integrin expression with histological type and hormonal receptor status in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1996, **192**(10):1031-1038.
41. Berry MG, Gul GP, Wells CA, Carpenter R: Integrin expression and survival in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004, **30**(5):484-489.
42. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M: Significance of integrin α 5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000, **6**(1):96-101.
43. Ahmed N, Riley C, Rice G, Quinn M: Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2005, **22**(5):391-402.
44. Bottger TC, Maschek H, Lobo M, Gottwohl RG, Brenner W, Junginger T: Prognostic value of immunohistochemical expression of β 1 integrin in pancreatic carcinoma. *Oncology* 1999, **56**(4):308-313.
45. Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ: β 1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and *in vivo*. *Cancer Res* 2006, **66**(3):1526-1535.
46. Adams JC, Watt FM: Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993, **117**(4):1183-1198.
47. Hayashida T, Jones JC, Lee CK, Schnaper HW: Loss of β 1-integrin enhances TGF- β 1-induced collagen expression in epithelial cells via increased α 5 β 1-integrin and Rac1 activity. *J Biol Chem* 2010, **285**(40):39741-39751.
48. Walker JL, Fournier AK, Assoian RK: Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, **16**(4-5):395-405.
49. Klein EA, Yung Y, Castagnino P, Kothapalli D, Assoian RK: Cell adhesion, cellular tension, and cell cycle control. *Methods Enzymol* 2007, **426**:155-175.
50. Morello V, Cabodi S, Sigismund S, Camacho-Leal MP, Repetto D, Volante M, Papotti M, Turco E, Deffilippi P: β 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. *Oncogene* 2011, **30**(39):4087-4096.
51. Lee TH, Seng S, Li H, Kennel SJ, Avraham HK, Avraham S: Integrin regulation by vascular endothelial growth factor in human brain microvascular endothelial cells: role of α 5 β 1 integrin in angiogenesis. *J Biol Chem* 2006, **281**(52):40450-40460.
52. Bloch W, Forsberg E, Lentini S, Brakebusch C, Martin K, Krell HW, Weidle UH, Addicks K, Fässler R: β 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* 1997, **139**(1):265-278.
53. White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ: Targeted disruption of β 1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* 2004, **6**(2):159-170.
54. Shimizu H, Seiki T, Asada M, Yoshimatsu K, Koyama N: α 5 β 1 integrin induces proteasome-mediated cleavage of erbB2 in breast cancer cells. *Oncogene* 2003, **22**(6):831-839.
55. Spangenberg C, Lausch EU, Trost TM, Prawitt D, May A, Keppler R, Fees SA, Reutzel D, Bell C, Schmitt S, Schiffer IB, Weber A, Brenner W, Hermes M, Sahin U, Türeci O, Koelbl H, Hengstler JG, Zabel BU: ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the α 5 β 1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. *Cancer Res* 2006, **66**(7):3715-3725.
56. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL: HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990, **50**(14):4332-4337.
57. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, **86**(3):353-364.

doi:10.1186/1746-1596-7-104

Cite this article as: dos Santos et al.: β 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagnostic Pathology* 2012 **7**:104.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.2 LECTIN HISTOCHEMISTRY REVEALS SNA AS A PROGNOSTIC CARBOHYDRATE-DEPENDENT PROBE FOR INVASIVE DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST: A CLINICOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL AUXILIARY TOOL

Artigo enviado para Publicação na Revista:

International Journal of Clinical and Experimental Pathology

Lectin Histochemistry Reveals SNA as a Prognostic Carbohydrate-Dependent Probe for Invasive Ductal Carcinoma of the Breast: a Clinicopathological and Immunohistochemical Auxiliary Tool

dos-Santos P.B.¹; Zanetti J.S.²; Vieira-de-Mello G.S.¹; Rêgo M.B.J.^{1,3}; Ribeiro-Silva A.²; Beltrão E.I.C.^{1,3}.

1. Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

2. Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

3. Department of Biochemistry, Biology Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

Running title: SNA lectin predicts survival in breast cancer

Address correspondence to: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

UFPE – LIKA. Av. Professor Moraes Rêgo s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. Phone: + 55 81 21012504. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

Declaration of conflict of interest: None.

ABSTRACT

Increased sialylation and β 1,6-branched oligosaccharides has been associated with a variety of structural changes in cell surface carbohydrates, most notably in tumorigenesis. Lectins are defined as proteins that preferentially recognize and bind carbohydrate complexes protruding from glycolipids and glycoproteins. This interaction with carbohydrates can be as specific as the interaction between antigen and antibody. Due to this type of interaction lectins have been used as experimental auxiliary tools in histopathological diagnosis of cancer. This study was designed to evaluate the differential expression of sialic acids and β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5) in invasive (IDC) and in situ (DCIS) ductal carcinoma of the breast and its possible application as prognostic biomarkers. Sambucus nigra agglutinin (SNA) and Maackia amurensis agglutinin (MAL-II) were used to recognize sialic acids on the cell surface of a tissue microarray of 225 breast carcinomas with a follow-up of 160 months, at least. A possible transition between pre-malign and malign lesions was evaluated using DCIS samples. Biopsies were analyzed regarding the expression of MUC1, p53, Ki-67, estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and MGAT5. Phytohemagglutinin-L (PHA-L) was used as MGAT5 comparative probe. α 2,6-linked sialic acids residues recognized by SNA was overexpressed in 33.3% of IDC samples and it was related with Ki-67 expression ($p=0.042$), PR ($p=0.029$), lymphnodes status ($p=0.017$) and death ($p=0.011$). Regarding survival analysis SNA was the only lectin able to correlate with specific-disease survival and disease-free survival ($p=0.024$ and $p=0.041$, respectively), besides, it presents itself as an independent variable by Cox Regression analysis ($p=0.004$). Comparing IDC and DCIS cases, only SNA showed different staining pattern ($p=0.034$). The presence of sialic acids on tumor cell surface can be an indicative of poor prognosis and our study provides further evidence that SNA lectin can be used as a prognostic probe in IDC and DCIS patients.

Keywords: Sialic Acids, Lectins Histochemistry, MAL-II, SNA, Prognosis.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide [1]. In Brazil the estimative rate for 2014 is 57.120 of new breast cancer cases with more than 12.000 deaths [2] while in the USA about 300.000 cases of breast cancer is expect to be newly diagnosed in the same year [1]. This high mortality rate is probably because the disease is still diagnosed in advanced stages. Even with great advances in diagnosing and treatment methods, both clinical and scientific problems remain unsolved [3].

Aberrant and deregulated protein glycosylation is a well-established event in the process of oncogenesis and cancer progression [4, 5]. Such post-translational changes can affect many cellular processes such as cell-cell and cell-matrix recognition, adhesion, motility, control of membrane permeability and molecular recognition [6, 7].

The glycode in glycoconjugates (glycoproteins or glycolipids) is orchestrated by glycosyltransferases and glycosidases, responsible for the synthesis and the breakdown of glycoconjugates, respectively, being their aberrant expression often related to the regulation of biological tumors behaviors [6-8]. These enzymes show to be useful cancer biomarkers for predicting clinical outcome in cancer [9].

One of the most common carbohydrates that participate of carcinogenesis, invasion and metastasis is the sialic acid [8]. Tumor cells relationships with themselves and with surrounding tissue are related to aberrant expression of terminal sialic acids; in particular α 2,3 and α 2,6-linked sialic acids [8; 10]. Tumorigenesis-involved proteins can present overexpression of sialic acids residues as Integrins α 5, α v and β 1 [11, 12], epidermal growth factor receptor (EGFR), Lamp-1, MUC1 and N-Cadherin [13] and they may contribute directly with altered growth control, adhesion, epithelial-mesenchymal transition and metastasis [14].

β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5; or GnT-V commonly used to refer the gene) catalyzes β 1,6 branching of *N*-acetylglucosamine residues (GlcNAc) on asparagine *N*-linked oligosaccharides (*N*-glycan) of cell proteins [15]. MGAT5 and β 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans are tumor-associated glycoproteins commonly increased in malign ones, and their higher levels were already correlated with disease

progression in colorectal cancer [16] and lymph node metastasis in breast cancer [17]. *N*-acetylglucosamine residues can be recognized by a variety of lectins and according to Cummings et al., [18], *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating (PHA-L) binds specifically to mature MGAT5 products (β 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans) and, therefore, it has been used as a probe for MGAT5-modified glycans.

Kuzmanov, Kosanam and Diamandis [4] presented a series of technical and biological obstacles to reflect the status of a glycoprotein biomarker and there is only a very limited set of tools capable of performing this task, and lectins are one of these useful tools. These oligomeric proteins have saccharide-binding sites that can recognize and bind specific saccharides in glycoconjugate as those in cancer cells which often display altered surface glycoproteins [19]. Lectin histochemistry has been used to investigate the cell surface carbohydrates in normal and transformed tissues [Beltrão, Sobral, Ferreira 20-22]. Its application was documented, for example, by Dosaka-Akita et al. [23] who used PHA-L to evaluate β 1,6-branches on *N*-glycans of glycoproteins. *N*-glycans of glycoproteins in non-small cell lung carcinoma; López-Morales et al. [24], applied *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), which interacts with α 2,3-linked sialic acid, and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), specific for α 2,6-linked sialic acid, to examine the expression and distribution of sialic acid in different stages of cervical neoplasia.

Increased sialylation and β 1,6-branched oligosaccharides has been associated with a variety of structural changes in cell surface carbohydrates, including tumorigenesis. This study was designed to evaluate the differential expression of sialic acids and β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase V in invasive (IDC) and *in situ* (DCIS) ductal carcinoma of the breast and its possible application as prognostic biomarkers. A possible transition between pre-malign and malignant lesions was evaluated using DCIS samples.

MATERIALS AND METHODS

Patients' files

Formalin-fixed paraffin embedded samples of invasive ductal carcinomas (IDC, n=225 - sizes ranging between 5-180 mm (mean 35mm) were randomly chosen from the Biopsies Bank of the Department of Pathology of Ribeirão Preto Medical School at

University of São Paulo, Brazil. The average age of patients included in this study was 55 years old (range 25–85 years). Lectin histochemistry with SNA and MAL-II (specific to α 2,6- and α 2,3-linked sialic acid residues) and PHA-L (specific to β 1,6-N-acetylglucosamine) and immunohistochemistry (ER, PR, Ki67, P53, HER-2, MUC1 and β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase) were performed. In ductal carcinoma in situ samples (DCIS, n=67 - age ranging from 24 to 83 year-old, mean=51 year-old) SNA, MAL-II and PHA-L stainings as well as MGAT5, ER, PR, HER-2 were evaluated for comparing with IDC samples. Clinic histopathology data (age, menopausal status, tumor size, regional lymph nodes metastasis, recurrence, distant metastasis and death) were used for patient's characterization. Patients were selected based on their histopathologic diagnosis and reviewed by a breast Pathologist (ARS) to confirm the diagnosis. As exclusion criteria the patients who received any oncology treatment before the diagnostic biopsy procedure were excluded of the study. The protocol used in this study was in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki (1975) and it was previously approved by the Ethic Committee.

Tissue Microarray – TMA

Core biopsies (diameter, 1 mm) were punched from representative regions of each formalin-fixed and paraffin-embedded samples (IDC= 225 and DCIS=67) and were arrayed into a new paraffin block using a Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Tissue sections (3 μ m-thick) were cut from the TMA paraffin block using a paraffin tape-transfer system (Instrumedics, Saint Louis, USA) and placed in glass slides.

Immunohistochemistry

It was performed using the Biocare Medical Mach 4 Universal Polymer Detection (Concord, California, USA) according to Ribeiro-Silva et al. [25] and dos-Santos et al. [26]. The dilution and clone specification of the primary antibodies used in this study are presented in Table 1. Antibody recognition reaction was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) followed by hematoxylin counterstaining. Normal liver samples were used as positive control for MGAT5. IDC cases previously known to be positive for Ki67, ER, PR, p53, HER-2 were used as positive controls for each reaction. Negative controls were prepared omitting the primary antibody.

Lectin Histochemistry

Sambucus nigra agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAL-II) and Phytohemagglutinin-L (PHA-L) conjugated to biotin were used in this study. These lectins recognize α 2,6-linked sialic acid, α 2,3-linked sialic acid and β 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans, respectively. Tissue sections (3 μ m-thick) were deparaffinized in xylene, rehydrated in ethanol, incubated with a 0.3% hydrogen peroxide-methanol solution for 30 minutes at 25°C and treated with a 0.1% trypsin solution for 15 min at 37°C. For PHA-L, after trypsin treatment, sections were also treated with a neuroaminidase solution (0.1 U/mL) from *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 1 hour at 37°C. After trypsin and/or neuraminidase treatment slices were incubated with 2% BSA (bovine serum albumin) solution and then incubated, separately, with the lectins solutions (20 μ g/mL) overnight at 4°C. Slices were then incubated with streptavidin-peroxidase polymer (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 45 min at 25°C. A 100mM phosphate buffer solution (PBS), supplemented with 150mM NaCl, pH 7.4 was used for washes between each protocol steps and solution preparation when not indicated elsewhere. Lectin staining was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) followed by hematoxylin counterstaining. Lectins staining negative controls were carried out replacing lectin by PBS. Table 1 presents the concentration and source specifications of the lectins used in this study.

Table 1: Immune and lectin histochemistry reagents.

Antibody*/ Lectin**	Dilution/ Concentration	Clone/ Source	Manufacturer
MGAT5	1:50	Polyclonal	Sigma-Aldrich, USA
MUC1	1:50	695	Biocare Medical Concord, CA, USA
Ki67	1:100	MMI	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
ER	1:100	6F11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
PR	1:100	16	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
p53	1:50	DO-7	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
HER-2	1:100	CB11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
MAL-II	20 μ g/mL	<i>Maackia amurensis</i>	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
SNA	20 μ g/mL	<i>Sambucus nigra</i>	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
PHA-L	20 μ g/mL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vector Labs, Burlingame, CA, USA

*ER: estrogen receptor; *PR: progesterone receptor; *Human Epidermal growth factor Receptor 2; **MAL-II: *Maackia amurensis* agglutinin; **SNA: *Sambucus nigra* agglutinin; **PHA-L: Phytohemagglutinin-L.

Chromogenic in situ Hybridization (CISH)

Positive (2+) immunohistochemistry HER-2 cases were also evaluated by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). The ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe kit (Zytovision, Bremerhaven, Germany) was used for the detection of the human HER-2 gene and alpha-satellites of chromosome 17. All procedures were according to the manufacturer's instructions which indicate that two green (HER-2) and two red (CEN 17) signals were expected in a normal interphase nucleus. HER-2 was considered amplified when the HER-2/CEN 17 ratio was ≥ 2 on average for 60 cells. Only cases scored as 2+ by immunohistochemistry in which the HER-2 was amplified on CISH analysis were considered positive.

Immuno- and Lectin Histochemistry evaluation

Immune stained slides were scored as positive as following: Ki67 (>14% of cancer cells [27]), ER and PR (>1% of cancer cells [28]), p53 (>5% of cancer cells [29]), MUC1 (>10% of cancer cells [30]). HER-2 was evaluated according to the ASCO/CAP HER-2 Guideline [31] as follow: IHC 3+ defined based on circumferential membrane staining that is complete, intense; IHC 2+ defined based on circumferential membrane staining that is incomplete and/or weak/moderate and within >10% of the invasive tumor cells; or complete and circumferential membrane staining that is intense and within $\leq 10\%$ of the invasive tumor cells; IHC 1+ defined by incomplete membrane staining that is faint/barely perceptible and within >10% of the invasive tumor cells; IHC 0 defined by no staining observed or membrane staining that is incomplete and is faint/barely perceptible and within $\leq 10\%$ of the invasive tumor cells. Cases as IHC 2+ were submitted to chromogenic *in situ* hybridization (CISH). Only IHC 2+ cases in immunohistochemistry amplified on CISH were considered positive for statistical purposes. According to Dosaka-Akita et al. [23] MGAT5 expression was classified as high ($\geq 50\%$ was positive) or low (<50% was negative) and lectin histochemistry staining was considered negative for <10%, moderate for 10% to 30% and intense for >30% of stained neoplastic cells. All staining score were evaluated using light microscopy.

Statistical Analyses

Statistical analysis we carried out according to dos-Santos et al. [26], where the results were presented as positive (3+: intense positive staining and 2+: moderate positive staining) or negative (1+: weak positive staining and 0: negative staining) for tumor cells. Tests were performed with PASW Statistics 19.0 software (Chicago, IL, USA). The relationships among SNA staining, immunohistochemistry and lectin histochemistry findings and clinic-pathologic features were tested with cross tables applying the χ^2 (chi-square; three or more variables) or Fisher tests (two variables), and all tests were 2-tailed. Kaplan-Meier curves, using the log-rank test, were used to estimate and compare disease-specific survival, disease-free survival (DFS) and metastasis-free survival (MFS). The independent prognostic value of α 2,6-linked sialic acids expression revealed by SNA was performed using Cox Proportional Hazards Model. Results with p-value < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Lectin Histochemistry

Lectin histochemistry staining results were analyzed by χ^2 (chi-square) test.

In IDC patients PHA-L staining presented a correlation with age (p=0.028; 54,5% who were older than 50 year-old were PHA-L negative; 84 out of 154), lymph node status (p=0.029; 62%, 44 patients with lymph nodes committed out of 71 patients PHA-L positive) and menopause status (p=0.015; 76.1% of post-menopausal patients were PHA-L positive; 54 out of 71).

MAL-II staining correlated to age (p=0.036; 68,6% of IDC patients who were older than 50 year-old were MAL-II positive; 48 out of 70) and menopause status (p=0.003; 78.6% of post-menopausal patients were MAL-II positive; 55 out of 70).

IDC patients who expressed α 2,6-linked sialic acid had a positive relation to as follow: death (p=0.011) and lymph node status (p=0.017). All of the clinicopathologic features of prognostic significance and their respective correlations with SNA staining are shown in Table 2.

IDC results showed that 33.3% were SNA positive (Figure 1A), 31.5% were PHA-L

positive (Figure 1B), 31.1% were MAL-II positive. χ^2 test analyzes for recognition of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids revealed that 116 (51,5%) of all IDC cases were simultaneously negative for MAL-II and SNA and 36 (16%) cases were simultaneously positive for these two lectins ($p=0.0001$).

Regarding DCIS cases, 51% were post-menopausal, 62.7% presented multifocal and architectural patterns as solid, comedo and cribriform. Lectin histochemistry for MAL-II, SNA and PHA-L was not correlated to any clinic-pathologic parameters (age, menstrual status, size, nuclear grade and multifocal) in DCIS samples.

Regarding the relationship between MGAT5 and PHA-L, at IDC diagnosis, 108 (48%) cases were simultaneously negative for both and 62 (27.6%) cases were simultaneously positive ($p=0.0001$). At DCIS cases 23,9% (16) cases were positive for MGAT5 (Figure 1C) and PHA-L (Figure 1D) with $p=0.013$. We also observed that 68,7% (46 cases) were negative for SNA and MAL-II ($p=0.022$)

Immunohistochemistry

In IDC biopsies 108 cases (48%) were positive for MGAT5; 82 cases (36.4%) were positive for Ki67; 138 cases (61.3%) were PR positive; 149 cases (66.2%) were ER positive; 86 cases (38.2%) were positive for MUC1 and 47 cases (20.8%) positive for HER-2.

IDC MGAT5 positive samples presented correlation with MUC1 expression ($p= 0.044$) and ER expression ($p= 0.046$) but not with Ki67 ($p= 0.299$), PR ($p=0.205$) and p53 ($p= 0.416$).

SNA staining inversely correlated with PR positive cases ($p=0.029$) and Ki-67 ($p=0.042$) and 39 cases positive to MUC1 were also SNA positive ($p=0.002$). MAL-II and PHA-L presented no correlation with the immunohistochemistry markers evaluated.

DCIS samples were MGAT5 positive in 41 cases out of 67 (61.2%), ER positive in 46 cases (68.6%); PR and HER-2 were positive in 40 cases (59.7%), each. Immunohistochemistry markers (ER, PR and HER-2) presented no correlation with MGAT5.

Analysis of the lectin histochemistry and immunohistochemistry correlation showed that 33 (49,3%) of PHA-L negative patients were HER-2 positive ($p=0.006$).

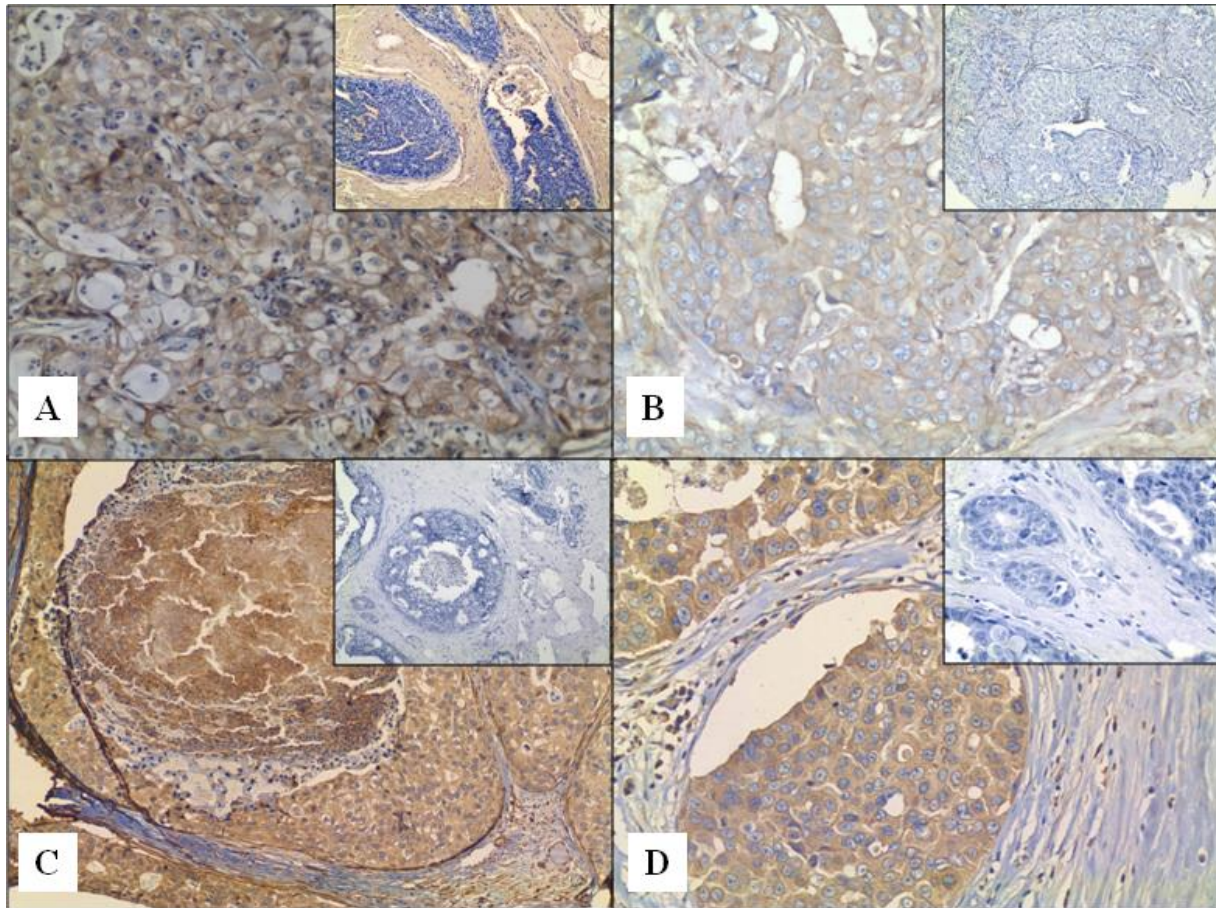


Figure 1: Immuno- and lectin histochemistry of Invasive ductal Carcinoma (IDC) and *In situ* ductal Carcinoma (DCIS) of Breast. A: SNA positivity in IDC (200x). B: PHA-L positivity in IDC (200x). Details in A and B show the negative staining for SNA and PHA-L, respectively, in IDC (observe that less than 10% of the cells were stained). C: Positive case for MGAT5 in DCIS (100x). D: Positive case for PHA-L in DCIS (200x). Details in C and D show a negative control of immune- and lectin histochemistry, respectively.

Table 2. . SNA histochemistry, clinic-histopathologic features and immunohistochemistry in IDC.

SNA (n= 225)					
	Negative (n=150)	%	Positive (n=75)	%	P
Age (years)					
<50	64	42,7	28	37,3	0.267 ^a
>50	86	57,3	47	62,7	
Menstrual Status					
Pre-menopausal	57	38,0	21	28,0	0.090 ^a
Post-menopausal	93	62,0	54	72,0	
Size (mm)					
<20	44	29,3	24	32,0	0.794 ^b
20-50	61	40,7	27	36,0	
>50	45	30,0	24	32,0	
Metastasis					
No	114	76,0	49	65,3	0.064 ^a
Yes	36	24,0	26	34,7	
Death					
No	112	74,7	44	58,7	0.011^a
Yes	38	25,3	31	41,3	
Recurrence					
No	132	88,0	64	85,3	0.357 ^a
Yes	18	12,0	11	14,7	
Tumor Grade					
I	53	35,3	29	38,7	0.775 ^b
II	72	48,0	36	48,0	
III	25	16,7	10	13,3	
Lymph node Status					
Negative	80	53,3	28	37,3	0.017^a
Positive	70	46,7	47	62,7	
Tumor Stage					
I	21	14,0	11	14,7	0.932 ^b
II	69	46,0	33	44,0	
III	53	35,3	26	34,7	
IV	7	4,7	5	6,7	
Estrogen Receptor					
Negative	56	37,3	20	26,7	0.073 ^a
Positive	94	62,7	55	73,3	
Progesterone Receptor					
Negative	65	43,3	22	29,3	0.029^a
Positive	85	56,7	53	70,7	
Ki-67					
Negative	89	59,3	54	72,0	0.042^a
Positive	61	40,7	21	28,0	
p53					
Negative	55	36,7	21	28,0	0.125 ^a
Positive	95	63,3	54	72,0	
HER-2					
Negative	121	80,7	57	76,0	0.260 ^a
Positive	29	19,3	18	24,0	
MUC1					
Negative	103	68,7	36	48,0	0.002^a
Positive	47	31,3	39	52,0	

^aFisher's exact test; ^b χ^2 test.

Survival Analysis

Disease-specific Survival or overall survival (DSS), Metastasis Free Survival (MFS) and Disease-free Survival (DFS) were defined as the number of months from diagnosis to the time of death due to breast cancer, the time from diagnosis until the appearance of distant metastasis and the time from diagnosis to the occurrence of local recurrence or metastasis, respectively.

Survival rates (DSS, MFS and DFS) were analyzed regarding their correlation to immunohistochemistry for MGAT5 in IDC but no correlation was found.

Lectin histochemistry and survival rates correlation was evaluated questioning whether the expression of carbohydrates in the tumor cells can be used as a biomarker for survival analysis in IDC, in our case sialic acid residues and β 1,6-N-acetylglucosamine.

Results showed that only SNA correlated with survival. It was observed that this lectin which recognizes α 2,6-linked sialic acids on tumor cells correlated with DSS (Figure 2A). It was observed a significant difference ($p = 0.024$) between the presence and the absence of this carbohydrate on cells surface. DSS decreased as patients overexpressed α 2,6-linked sialic acid in neoplastic cells. Correlation is also observed for DFS ($p=0.041$), (Figure 2B) but not for MFS ($p=0.106$).

In Multivariate Cox Analysis, SNA was found to be an independent variable ($p= 0.004$) able to predict the probability of survival of patients with breast cancer (Table 3 and Figure 3). In these samples the probability of survival of the patients who express this carbohydrate considerably drops with time.

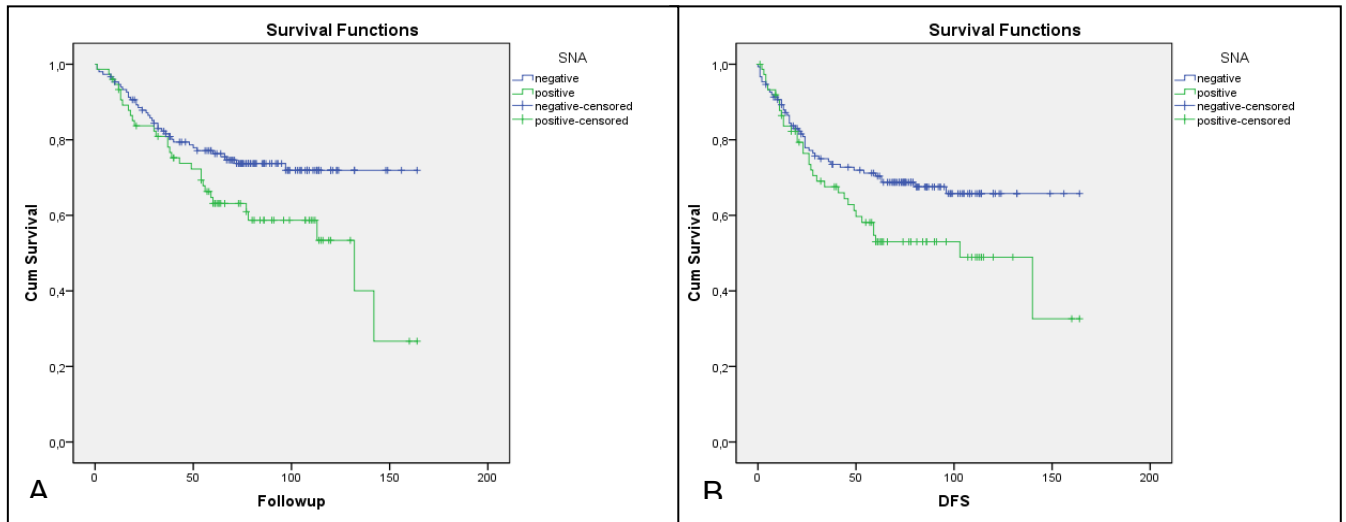


Figure 2: Univariate analysis (Kaplan Mayer table followed by log-rank test) of the prognostic impact of α 2,6-linked sialic acids status: **A:** in disease-specific survival of breast cancer patients ($p= 0.024$); **B:** in disease-free survival of breast cancer patients.

Table 3. Cox Regression Model for significant variables in the univariate analysis of overall survival.

Co-variables	p-Value	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
			Lower	Upper
Age	0.211	0.472	0.141	0.836
Size*	0.155	-	0.354	1.123
Size(1)	0.105	0.438	0.162	1.189
Size(2)	0.770	1.106	0.562	2.176
Tumor Grade**	0.037	-	0.313	1.561
Grade (1)	0.019	0.343	0.339	1.270
Grade (2)	0.382	0.699	0.066	3.721
Lymph node Status	0.211	0.657	0.148	1.678
Tumor Stage***	0.397	-	0.346	2.834
Tumor Stage(1)	0.495	0.496	0.450	2.248
Tumor Stage(2)	0.261	0.498	0.072	0.280
Tumor Stage(3)	0.986	0.991	0.381	1.422
Recurrence	0.989	1.006	0.797	2.612
Metastasis	0.000	0.142	0.759	2.814
Menopausal Status	0.810	1.158	0.351	3.826
SNA	0.004	0.012	0.001	0.244
HER-2	0.358	0.731	0.005	1.210
Ki67	0.361	0.736	0.593	2.097
ER	0.225	1.443	0.162	1.189
PR	0.256	1.462	0.562	2.176
p53	0.736	1.115	0.351	3.826

*Size (<20; 20-50; >50mm); **Tumor Grade I, II and III; *** Tumor Stage I,II,III and IV

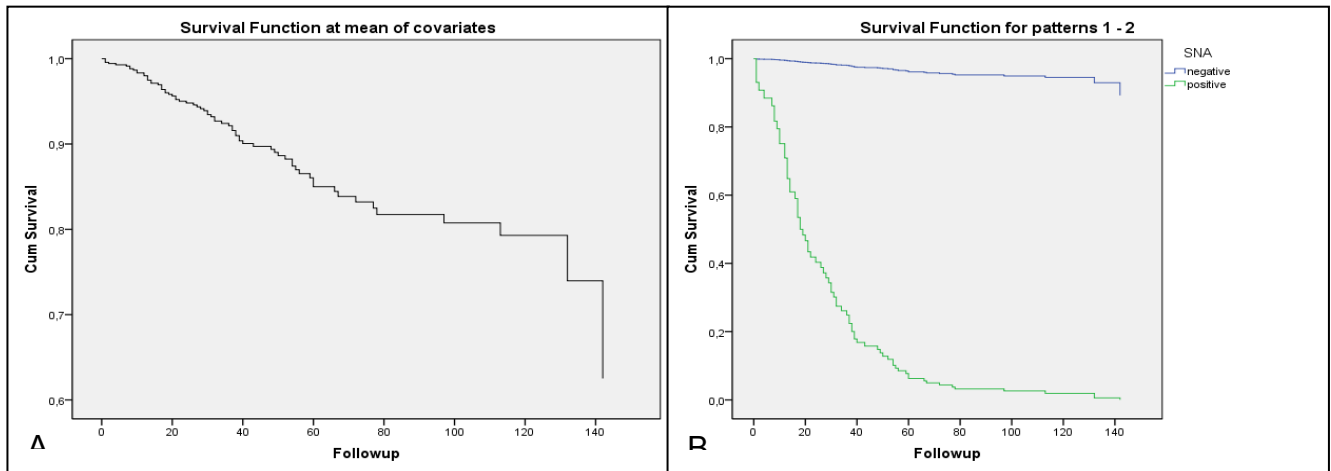


Figure 3: Cox-Regression for SNA staining ($p=0.004$). **A:** Follow up time regarding the survival of patients. **B:** Survival time of patients who overexpressed $\alpha 2,6$ sialic acids on cell surface (green curve) and lack this aberrant expression (blue curve).

DCI versus DCIS

The χ^2 (chi-square) test was performed for lectin histochemistry and immunohistochemistry findings in patients with IDC and DCIS to compare the parameters in both groups. Correlation was carried out for MGAT5, SNA, MAL-II, PHA-L, ER and PR. Results showed that, once more, only SNA staining was significant ($p = 0.034$) indicating a higher content of $\alpha 2,6$ sialic acids in IDC and a lower in DCIS.

DISCUSSION

In this study the SNA staining (evaluated by lectin histochemistry) and its relationship with several cell biomarkers, including MGAT5, MUC1 and laboratory routine markers (ER, PR, HER-2, Ki67 and p53) were analyzed in a tissue microarray (TMA) cohort of 225 patients with invasive ductal carcinoma (IDC) of breast. Our study focused on evaluates the relationship between the expression of tumor-associated carbohydrates and well-established prognostic factors in patients with IDC and compare to ductal carcinoma *in situ* (DCIS) to assay the differences between pre-malign and malign lesions. TMA was a trustful technique to access the protein expression and the results

from its application are significant and reproducible as observed by several other authors who also used this technique to validate biomarkers [26; 32].

It is known that changes in glycosylation of glycoproteins or glycolipids often cause a change in their function and such phenomenon is correlated with cancerous transformation [33, 34]. According to Cui et al. [35] the overall survival of the patients who express different levels of α 2,3-sialic acid residues considerably drops and the occurrence of changes in the glycode of these glycoconjugates of cell surface stimulating/modulating adhesion, migration and invasion of breast cancers cells. The authors used 50 primary tumor samples, 50 pair-matched lymph node metastasis tumor samples and MDA-MB-231, T-47D and MCF-7 breast cancer cell lines with different metastatic potential and they concluded that lymph node metastasis tumor samples exhibited higher levels of expression of α 2,3-sialic acid residues compared to that of primary tumors. Differently, our study was designed with a higher number of IDC samples (225) and we found that the overexpression of the α 2,6-sialic acid residues, not α 2,3, is closely related with the survival of patients with IDC of the breast, which is in accordance with others types of cancer, including breast [12; 36, 37].

Breast cancer development and progression are regulated by estrogen and its receptor (ER) along others predictive markers such as progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) [38]. Our study showed that 94 (41,8%) patients positive to ER and 85 (37,8%) patients positive to PR were negative to SNA staining with PR negatively correlating with the expression α 2,6-linked sialic acid ($p=0.029$). Semaan et al. [38] studied the glycoproteins in human breast cancer ER⁺ tissues and in ER⁻ tissues and found that some proteins were more glycosylated at the ER⁻ tissues. It is known that the loss of the hormonal receptor has been correlated with a more aggressive stage of the disease and this loss may affect the levels of sialic acids on tumor cells to be confirmed after *in vitro* and *in vivo* studies by our group.

MUC1 is usually present on the apical surface of secretory epithelia in normal cells and in malignant tissues, when cells lose their polarity, MUC1 is found both in cytoplasm and membrane, where there is an expression up to 90% of cases. This overexpression leads to the loss of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion and, therefore, promotes cancer metastasis [30; 39,40]. In our study MUC1 was correlated with α 2,6-sialic acid ($p=0.002$). Cancer cells surface MUC1 was observed to be abnormally

glycosylated presenting in its structure many linkage sites to receive sialic acids [41-43].

Lectins have been a target of research in cancer glycobiology and have been used as a probe to investigate the cellular glycode because they recognize carbohydrates in a specific way [19]. These molecules have been used in histopathology investigation for mapping stages of differentiation, levels of malignancy and metastatic ability in human brain tissue [20], breast [44-47], non-melanoma skin cancer [48] and other tissues [23; 49]

PHA-L binding profile and *GnT-V* overexpression (gene that encodes the enzyme MGAT5) has been associated with invasive/metastatic potential of cancer cells and consequent poor prognosis in several human carcinomas [13; 17; 23; 50]. However, according to Huang et al. [51] MGAT5 has been demonstrated to display a distinct function in different types of tumors; down-regulation of *GnT-V* decreased proliferation and the metastatic/invasive potential of BGC823 gastric cancer cells *in vitro*). Dosaka-Akita et al., [23] used 217 surgically resected NSCLCs to assay the activity of *GnT-V* by PHA-L histochemistry and after survival analysis concluded that *GnT-V* low expression associated with shorter survival and poor prognosis in non-small cell lung cancers. Handerson et al., [17] used a TMA with more than 400 patients with breast cancer and viewed that the abundance of β 1,6-branched oligosaccharides (via PHA-L histochemistry) was directly associated with breast carcinoma nodal metastasis. In our study MGAT5 was overexpressed in 48% of IDC samples and do not correlated with survival. It is important to highlight that studies with breast cancer [17; 52] were conducted with PHA-L histochemistry alone, not with MGAT5 immunohistochemistry combined with PHA-L histochemistry like ours. Our study is the first regarding invasive and *in situ* ductal carcinoma addressing immuno- and histochemistry with MGAT5 and PHA-L, respectively, and although the related findings with these markers and the results showed a significant biologic importance of β 1,6-branched oligosaccharides for breast cancer progression, the prognostic effect of PHA-L and MGAT5 is not strong enough to add independent information to the established clinicopathologic variables.

We also found that the overexpression of α 2,6-linked sialic acid (recognized by SNA) can be a predictor of overall survival and disease-free survival; survival of patients who express this carbohydrate considerably drops with time. These findings are in

accordance with some authors who described that the sialic acid profile on the tumor cell surface is an indicative of a poor prognosis in colon, ovarian and breast cancer [53-55]. Ferreira et al., [48] investigated the expression of α 2,6 and α 2,3-linked sialic acids on non-melanoma skin cancer using SNA and MAL-II lectins histochemistry and found that these lectins can differentiate the stages of pre-malign and malign tumors. Other study was conducted by Borzym-Kluczyk and Radziejewska [56] in renal cancer tissues using Elisa-test with SNA and MAL-II, the authors founded that secreted α 2,6 and α 2,3-linked sialic acids were significantly increased by cancerous cells when compared to normal and intermediate renal tissue. All these findings are important to show that lectins can be use as prognostic probes to recognize the differences in carbohydrates expression pattern in pre-malign and malign lesions.

It is known that high expression of sialic acids promotes a series of damages on cells, leading to a series of steps that can culminate with metastasis. MAL-II lectin strongly binds to α 2,3-linked sialic acid residues [57] but this lectin did not show correlation with any survival parameters. In our study MAL-II was positive in 70 samples (31,1%), not statistically different to SNA (75 samples; 33,3%) but it is worth to note that most patients who died or presented local recurrence or metastasis had the expression of α 2,6-linked sialic acid affecting the survival curves. Besides we observed that the α 2,6-sialylation was associated with poor prognosis in tumorigenesis as also observed by Swindall and Bellis in colon carcinoma cells [58].

In breast cancers the most expressed glycosyltransferase is ST3Gal III which catalyzes the transfer of α 2,3-linked sialic acid residues to terminal galactose (Gal) residues located on either Gal- β 3GlcNAc or Gal β 1-4GlcNAc structures. This enzyme has positive correlation with tumor size and lymph node status; moreover high ST3Gal III/ST6Gal I ratio (ST6Gal I which mediates the transfer of sialic acid with a α 2,6-linkage to terminal Gal) is correlated with a shorter overall survival and poor prognosis [58-60]. In addition, ST6GalNAc V (which mediates the transfer of sialic acid with a α 2,6-linkage to GalNAc residues) has been reported to mediate brain metastasis of breast cancer cells [61]. All these enzymes add sialic acids on the terminal portion of glycoproteins and can be altered in breast cancers, which are targets of studies in our group.

Our results showed that most of DCIS patients were SNA negative, completely different of IDC where the expression of this carbohydrate is associated with the survival of the patients. The sialic acids profile shows a relevant difference between DCIS and IDC group ($p= 0.034$), as we observed using SNA, that turned out to be lower in DCIS patients compared IDC ones. It is important to note that the comparison between IDC and DCIS tumors showed no correlation regarding MGAT5 or other marker expressed in these two groups of patients. It is known that DCIS is considered a premalignant stage of IDC with great differences comparing to normal tissues and the presence of $\alpha 2,6$ sialic acids residues in glycoconjugates of tumor cell surface can be a indicative of a worse prognostic to patients diagnosed with IDC [62].

Although DCIS being considered as a precursor lesion for IDC [62, 63], the reported incidence of accompanying DCIS in CDI is not fully understood. Our results showed a clear difference regarding SNA histochemistry profile in IDC samples and DCIS, more importantly these differences can be easily assayed by simples and efficient techniques.

CONCLUSIONS

Exploitation of difference in cell surface glycans between invasive ductal and *in situ* ductal carcinoma cells provides opportunities to discover new biomarkers to personalize diagnosis and treatment of cancer based in the fact that the combination of several biomarkers may lead to better prognosis information. Our findings showed that SNA staining pattern strongly suggests that this lectin can be used as an easy probe to access sialic acid residues profile and then assist in patient prognosis. The present study also contributes to future researches for the potential of these biomarkers as putative therapeutic target for breast carcinomas.

ACKNOWLEDGMENT

We thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) for financial support, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brazil) for scholarships and financial support; and Deisy Mara da Silva for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 2014; 64(1): 52-62.
- [2] National Institute of Cancer. Estimate 2014: incidence of cancer in Brazil. <http://www.inca.org.br>. Accessed 20 Jan 2014.
- [3] Bertucci F, Finetti P, Roche H, Le Doussal JM, Marisa L. Comparison of the prognostic value of genomic grade index, Ki67 expression and mitotic activity index in early node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2013; 24(3): 625-632.
- [4] Kuzmanov U, Kosanam H, Diamandis EP. The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. *BMC Med* 2013; 11:31.
- [5] Drake PM, Cho W, Li B, Prakobphol A, Johansen E, Anderson NL, Regnier FE, Gibson BW, Fisher SJ. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clin Chem* 2010; 56(2): 223-236.
- [6] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(16): 10231-1023.
- [7] Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(9): 1347-1353.
- [8] Varki A, Lowe JB. Biological Roles of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1897/>.
- [9] Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB Rep* 2011; 44(12): 772-781.
- [10] Chen S, Fukuda M. Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. *Methods Enzymol* 2006; 416: 371-380.
- [11] Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* 2005; 65(11): 4645-4652.
- [12] Hedlund M, Ng E, Varki A, Varki NM. Alpha 2-6-linked sialic acids on n-glycans modulate carcinoma differentiation *in vivo*. *Cancer Res* 2012; 68(2):388-394.
- [13] de Oliveira JT, de Matos AJ, Santos AL, Pinto R, Gomes J, Hespanhol V, Chammas R, Manninen A, Bernardes ES, Albuquerque Reis C, Rutteman G, Gärtner F. Sialylation regulates galectin-3/ligand interplay during mammary tumour progression--a case of targeted uncloaking. *Int J Dev Biol* 2011; 55(7-9):823-834.
- [14] Kim Y, Kim S, Kang J, Ko J. Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB Rep* 2012; 45:623-628.

- [15] Siddiqui SF, Pawelek J, Handerson T, Lin CY, Dickson RB, Rimm DL, Camp RL. Coexpression of beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V glycoprotein substrates defines aggressive breast cancers with poor outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11): 2517-2523.
- [16] Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, Hiratsuka M, Ohigashi H, Ishiguro S, Ito S, Honda H, Takemura F, Taniguchi N, Imaoka S. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1772-1777.
- [17] Handerson T, Camp R, Harigopal M, Rimm D, Pawelek J. Beta1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(8): 2969-2973.
- [18] Cummings RD, Kornfeld S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. *J Biol Chem* 1982; 257: 11230-11234.
- [19] Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14(11): 53-62.
- [20] Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCB, Carvalho LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningioma tumor. *Eur J Histochem* 2003; 47(2): 139-142.
- [21] Sobral APV, Rêgo MJBM, Cavalcanti CL, Carvalho LBJr, Beltrão EI. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Sci* 2010; 52(1): 49-54.
- [22] Ferreira AS, Vasconcelos JLA, Silva RCWC, Cavalcanti CLB, Rêgo MJBM, Beltrão EIC. Expression Patterns of α 2,3-sialyltransferase I and α 2,6-sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. *Eur J Histochem* 2013;57(1):41-5.
- [23] Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Suzuki O, Itoh T, Katoh H, Taniguchi N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase v is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2004; 1(10):1773-79.
- [24] López-Morales D, Reyes-Leyva J, Santos-López G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagn Pathol* 2010; 5(74): 1-5.
- [25] Ribeiro-Silva A, Moutinho MAH, Moura B, Vale FR, Zucoloto S. Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. *Histol Histopathol* 2006; 21(4): 373-82.
- [26] dos Santos PB, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, Beltrão EIC. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagn Pathol* 2012; 16(7): 104-115.

- [27] Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Batistatou A, Kotoula V, Trihia H, Malamou-Mitsi V, Miliaras S, Chrisafi S, Papadopoulos S, Sotiropoulou M, Filippidis T, Gogas H, Koletsa T, Bafaloukos D, Televantou D, Kalogeras KT, Pectasides D, Skarlos DV, Koutras A, Dimopoulos MA. Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* 2012; 7(6) e37946.
- [28] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badye S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FCG, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(16): 2784–2795.
- [29] Ercan C, Van Diest P, Van Der Ende B, Hinrichs J, Bult P, Buerguer H, van der Wall E, Derken PWB. p53 mutations in classic and pleomorphic invasive lobular carcinoma of the breast. *Cell Oncol* 2012; 35:111-118.
- [30] Zanetti JS, Soave DF, Oliveira-Costa JP, da-Silveira GG, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A. The role of tumor hypoxia in MUC1-positive breast carcinomas. *Virchows Arch* 2011; 459(4): 367-375.
- [31] Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013; 31(31): 3997-4013.
- [32] Lawson MH, Cummings NM, Rassl DM, Vowler SL, Wickens M, Howat WJ, Brenton JD, Murphy G, Rintoul RC. Bcl-2 and β 1-integrin predict survival in a tissue microarray of small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2010; 103(11):1710–1715.
- [33] Tian Y, Zhang H. Characterization of disease-associated N-linked glycoproteins. *Proteomics* 2013;13(3-4):504-11.
- [34] Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; 291:2364-69.
- [35] Cui H, Lin Y, Yue L, Zhao X, Liu J. Differential expression of the α 2,3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. *Oncol Rep* 2011; 25(5): 1365-1371.
- [36] Lise M, Belluco C, Perera SP, Patel R, Thomas P, Ganguly A. Clinical correlations of a2,6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients. *Hybridoma* 2000; 19:281-286.

- [37] Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface a2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002; 276: 101-110.
- [38] Semaan SM, Wang X, Marshall AG, Sang QXA. Identification of potential glycoprotein biomarkers in estrogen receptor positive (ER+) and negative (ER-) human breast cancer tissues by LC-LTQ/FT-ICR mass spectrometry . *J Cancer* 2012; 3: 269-284.
- [39] Tran DT, Ten Hagen KG. Mucin-type O-glycosylation during development. *J Biol Chem* 2013; 288(10): 6921-6929.
- [40] Hattrup CL, Gendler SJ. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8(4): 37.
- [41] Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J. A Core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal-antibody sm-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer* 1989; 43: 1072-1076.
- [42] Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: Expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh Migr* 2010; 7(2): 1-12.
- [43] Sakurai J, Hattori N, Nakajima M, Moriya T, Suzuki T, Yokoyama A, Kohno N. Differential expression of the glycosylated forms of MUC1 during lung development. *Eur J Histochem* 2007; 51(2): 95-102.
- [44]. Beltrão EIC, Correia MT, Figueredo-Silva J, Coelho LC. Binding evaluation of isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. *App Biochem Biotechnol* 1998; 74: 125-134.
- [45] Korourian S, Siegel E, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma *in situ* of the breast by lectin histochemistry. *BMC Cancer* 2008; 8:136.
- [46] Rêgo MJBM, Vieira-de-Mello GS, Santos CAS, Chammas R, Beltrão EIC. Implications on glycobiological aspects of tumor hypoxia in breast ductal carcinoma in situ. *Med Mol Morphol* 2013, 46(2): 92-96.
- [47] Vieira-de-Mello GS, Silva-Filho AF, Barros PS, Rêgo MJBM, Beltrão EIC. Lectin histochemistry reveals changes in carbohydrate expression on morphological types of breast ductal carcinoma in situ. *J Cytol Histol* 2013; 4: 1-4.
- [48] Ferreira SA, Vasconcelos JLA, Cavalcanti CLB, Rêgo MJMB, Beltrao EIC. Sialic Acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. *Med Mol Morphol* 2013, 46(4): 198-202.
- [49] Lima LR, Bezerra MF, Almeida SM, Silva LP, Beltrão EIC, Carvalho Júnior LB. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Dis Markers* 2013; 35(3):149-154.

- [50] Lee JH, Kang JG, Song KJ, Jeon SK, Oh S. N-Acetylglucosaminyltransferase V triggers overexpression of MT1-MMP and reinforces the invasive/metastatic potential of cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 431(4):658-663.
- [51] Huang B, Wu Q, Ge Y, Zhang J, Sun L, Zhang Y, Fu L, Fan J, Wang Z. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in gastric cancer correlates with metastasis and prognosis. *Int J Oncol* 2014; 44(3): 849-857.
- [52] Fernandes B, Sagman U, Auger M, Demetrio M, Dennis JW. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res* 1991; 51: 718-723.
- [53] Bresalier RS, Byrd JC, Wang L, Raz A. Colon cancer mucin: a new ligand for the beta-galactoside-binding protein galectin-3. *Cancer Res* 1996; 56(19): 4354-4357.
- [54] Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(6): 477-488.
- [55] Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 2008; 14(8): 351-360.
- [56] Borzym-Kluczyk M, Radziejewska I. Changes of the expression of Lewis blood group antigens in glycoproteins of renal cancer tissues. *Acta Biochim Pol* 2013; 60(2): 223-226.
- [57] Imberty A, Gautier C, Lescar J, Perez S, Wyns L, Loris R. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J Biol Chem* 2000; 275(23): 17541-17548.
- [58] Swindall AF, Bellis SL. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2011; 286(26): 22982-22990.
- [59] Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58(18): 4066-4070.
- [60] Hebbar M, Krzewinski-Recchi MA, Hornez L, Verdiere A, Harduin-Lepers A, Bonnetterre J, Delannoy P, Peyrat JP. Prognostic value of tumoral sialyltransferase expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 116-122.
- [61] Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 2009; 459: 1005-1009.
- [62] Cakir A, Gonul II, Uluoglu O. A comprehensive morphological study for basal-like breast carcinomas with comparison to nonbasal-like carcinomas. *Diagnos Pathol* 2012; 7(145): 1-11.

[63] Devilee P, Tavassoli FA. World Health Organization: Tumours of the breast and female genital organs. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. 2003.

6 DISCUSSÃO

A rotina clínica no câncer de mama se baseia tradicionalmente na classificação histopatológica incluindo o grau do tumor, tipo histológico, tamanho e comprometimento de linfonodos. Apesar da associação destas variáveis com o prognóstico estes sistemas continuam relativamente insuficientes em prever o comportamento da doença. Tumores aparentemente homogêneos com relação ao caráter morfológico variam em resposta a determinadas terapias e têm resultados divergentes.

O desenvolvimento da técnica de Microarranjos de Tecidos (do inglês, *tissue microarray* - TMA) forneceu uma metodologia de alto rendimento para a análise concomitante de várias proteínas sobre um grande número de amostras de tumores. Em nosso estudo, utilizamos TMAs de 225 casos de carcinoma ductal invasivo (CDI) de mama para estudar os perfis de expressão das proteínas $\beta 1$ integrina e MGAT-5 utilizando imunohistoquímica, além da expressão dos carboidratos $\beta 1,6$ -N-acetilglicosamina e ácidos sálicos através da histoquímica com lectinas. Os mesmos TMAs foram avaliados também com um painel de biomarcadores bem caracterizados na rotina laboratorial: RP e RE (marcadores hormonais), VEGF (marcador de angiogênese), HER-2 (fator de crescimento epidermal), Ki-67 (marcador de proliferação) e P-53 (marcador de ciclo celular) e MUC1 (glicoproteína).

Em nosso estudo podemos observar uma superexpressão da $\beta 1$ integrina em 32,8% das pacientes com CDI. Sabe-se que uma grande variedade desse receptor ($\beta 1$ integrina) contribui para a progressão do tumor. Em tumores sólidos provenientes de células epiteliais, a expressão de $\beta 1$ integrinas (incluindo $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$) pode estar alterada. Estas integrinas, tipicamente, medeiam a adesão das células epiteliais à membrana basal, mas podem contribuir para a proliferação, migração e sobrevivência nas células tumorais (DESGROSELLIER e CHERESH, 2010).

Com relação a expressão de MGAT5 observou-se que 48% das pacientes superexpressavam essa proteína. Estudos têm demonstrado que a transformação maligna está associada a alterações na glicosilação de proteínas (GUO et al., 2012). A enzima MGAT5 catalisa a adição de cadeias laterais de oligossacarídeos complexos em glicoproteínas, regulando a expressão e função de várias proteínas envolvidas na metástase (SIDDIQUI et al., 2005). Estudos com câncer de mama (FERNANDES et al., 1999; SIDDIQUI et al., 2005; HANDERSON et al., 2005), câncer de pulmão

(DOSAKA-AKITA et al., 2004) têm associado a expressão de MGAT5 com um mal prognóstico da doença. Porém novas pesquisas precisam ser realizadas uma vez que autores comprovaram que a expressão de MGAT5 pode ser divergente em certos tipos de tumor, a baixa e alta expressão dessa proteína pode estar ligada ao poder de malignidade de diferentes tumores.

Segundo GUO et al., (2002) a glicosilação aberrante da $\beta 1$ integrina pela enzima MGAT5 inibe a formação do receptor da fibronectina (a integrina $\alpha 5\beta 1$) resultando numa diminuição da adesão da MEC e um aumento da motilidade celular. Em nossos resultados MGAT5, por si só, não foi capaz de predizer sobrevida em nosso grupo de pacientes, porém essa enzima apresentou estreita correlação com a $\beta 1$ integrina ($p=0.0001$), logo a associação dessas proteínas pode ser útil no prognóstico dessas pacientes.

Da mesma forma foi visto uma relação significativa entre a expressão da $\beta 1$ integrina e a expressão do carboidrato ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligado ($p=0.001$). Embora a adesão mediada pelas integrinas seja baseada principalmente em interações com proteínas da MEC, sua ligação pode ser significativamente modulada pelo seu estado de glicosilação (CHAMMAS et al., 1993; GU & TANIGUCHI, 2004). A propriedade de cargas negativas dos ácidos siálicos é correlacionada com a redução da adesividade das células do tumor, favorecendo mudanças conformacionais nas integrinas. CUI et al., (2011) verificaram que a hipersialilação de $\beta 1$ integrinas pode aumentar a motilidade celular em câncer de colon e estudos já indicaram que esse aumento da sialilação pode ativar as $\beta 1$ integrinas e estimular a migração através da interação com as células hospedeiras do tumor (CUI et al., 2011). Aumento da sialilação $\alpha 2,6$ em $\beta 1$ integrina tem sido reportada em vários tipos de células transformadas (CHIRICOLO et al., 2006, SEALES et al., 2005). Nestes estudos, aumentos nos níveis de sialilação $\alpha 2,6$ foram correlacionados com maior motilidade celular e invasão *in vitro*. Nossos estudos sugerem uma ligação entre a expressão de $\beta 1$ integrina e ácidos siálicos $\alpha 2,6$ -ligados e que essa associação possivelmente contribua para a metástase do câncer de mama, o que pode servir para novas abordagens terapêuticas para os pacientes com CDI.

Avaliou-se a imunoexpressão do Ki-67, marcador de proliferação celular que identifica as células nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular (OLIVEIRA-COSTA et al., 2010). Nós analisamos a expressão nos carcinomas mamários $\beta 1$ integrina positivos e MGAT5 positivos e não encontramos relação significativa entre eles ($p=0.435$; $p=0.299$, respectivamente). De acordo com FLAMANT et al. (2010) a condição de

hipóxia, bastante comum nos tumores invasivos, reduz a proliferação celular. Contudo isto é discutível. Outros estudos mostram que seu aspecto e a sua localização na célula durante o ciclo celular não é homogênea (URRUTICOECHEA, SMITH & DOWSETT, 2005), e que talvez por causa desta heterogeneidade de localização do Ki-67, não identificamos uma relação com a $\beta 1$ integrina e MGAT5.

De acordo com DESGROSELLIER & CHERESH (2010) integrinas promovem sinalização intracelular, geralmente ativando receptores de citocinas ou receptores de fatores de crescimento (FGRs). Consequentemente, o crescimento do tumor e invasão provavelmente depende do *crosstalk* de integrinas com FGRs e/ou oncogenes em células tumorais e em células associadas ao tumor. Nossos resultados sugerem uma correlação estreita entre a $\beta 1$ integrina e HER-2, assim como com o VEGF. SHIMIZU et al. (2003) observaram que a integrina $\alpha 6\beta 1$ inibe os sinais de HER-2 através da clivagem proteolítica do domínio citoplasmático de HER-2 podendo assim contribuir para a regulação do crescimento do tumor. Já SPANGENBERG et al. (2006) demonstraram que alta regulação de $\alpha 5\beta 1$ mediada por HER-2 promove a sobrevivência da célula tumoral mesmo em condições adversas como hipóxia e tratamentos com quimioterápicos.

Sabe-se que um tumor depende de uma boa irrigação, e em muitos casos de angiogênese eficaz, para se estabelecer e segundo ZANETTI et al. (2011) a angiogênese é induzida por VEGF pela interação com receptores expressos principalmente na membrana vascular de células endoteliais. As integrinas tem um papel fundamental nessas mudanças, o VEGF estimula a proliferação e migração das células endoteliais, além de interagir diretamente com proteínas da MEC (fibrinogênio, fibronectina, entre outras). A remodelação da MEC, ocasionada por essas mudanças, fornece ligantes para as integrinas (incluindo $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$) onde sua expressão é rapidamente aumentada.

A amplificação do proto-oncogene HER-2 é observado em cerca de 15-30% de todas as amostras de câncer de mama e tem sido correlacionada, há muito tempo, com uma menor sobrevida das pacientes (BORG et al., 1990; OLIVEIRA-COSTA et al., 2010). Um importante aspecto do envolvimento da $\beta 1$ integrina na angiogênese e tumorigênese é a potencial implicação no tratamento desses tumores. Este estudo (dos-SANTOS et al., 2012) mostra que a superexpressão da $\beta 1$ integrina pode promover a progressão tumoral, além de atuar como um potencializador do tumor. Além disso, a

expressão da $\beta 1$ integrina e sua associação com HER-2 e VEGF pode ser útil em terapias específicas para pacientes com câncer de mama.

Um dos principais objetivos contemporâneos da oncologia é o de se identificar, a partir do diagnóstico inicial do câncer da mama, quais as pacientes que se apresentam com a maior probabilidade de desenvolverem metástase. Esta identificação possibilitaria um melhor manuseio terapêutico, com uma maior seletividade na aplicação dos tratamentos adjuvantes, reduzindo os sofrimentos oriundos dos efeitos colaterais impostos pela grande maioria das drogas utilizadas nos protocolos de tratamento adjuvante atualmente em uso (DUFFY & CROWN, 2013). Estudos mostram que a $\beta 1$ integrina é amplamente expressa nas células tumorais e pode realizar um papel fundamental na predição e no curso clínico da doença (YAO et al., 2007). Em nossos estudos avaliou-se 225 pacientes, num período de 164 meses, onde de um total de 69 pacientes que morreram, 34 superexpressavam essa proteína. Estes resultados demonstram que a $\beta 1$ integrina pode ser utilizada como um fator prognóstico para o câncer de mama uma vez que teve impacto na sobrevivência específica (número de meses de diagnóstico até a ocorrência da morte pela doença), além de ser um importante alvo terapêutico.

Para a proteína MGAT5 não se encontrou relação com a sobrevida ou o tempo livre da doença nos pacientes. Porém quando os resultados da histoquímica com lectinas foram analisados se observou que a presença de ácidos siálicos $\alpha 2,6$ -ligados nas células tumorais é um fator relevante na análise de sobrevivência das pacientes com câncer de mama. Sabe-se que a presença de ácidos siálicos nas células tumorais é um indicativo de mal prognóstico (BRESALIER et al, 1996;. DUBE et al, 2005; VARKI, 2008) e de acordo com SWINDALL & BELLIS (2011) a expressão elevada destes carboidratos promove uma série de danos nas células conduzindo a uma série de eventos que podem culminar com a metástase. Também de acordo com estes autores a sialilação $\alpha 2,6$ tem sido muitas vezes associado com prognóstico reservado na tumorigênese. Nossos resultados mostram que a histoquímica com a lectina SNA é confiável e reprodutível podendo ser incluída como sonda para ácidos siálicos $\alpha 2,6$ -ligados (marcador de glicoconjugados) na rotina clínica.

Uma grande preocupação dos pesquisadores que trabalham com o câncer de mama é tentar desvendar se existe uma progressão do CDIS para o CDI e quais os processos moleculares envolvidos. Além dos resultados obtidos com os casos de CDI utilizamos 67 casos de CDIS para comparar a expressão de $\beta 1$ integrina, MGAT5 e

carboidratos (β 1,6-N-acetilglicosamina e ácidos siálicos α 2,3 e α 2,6-ligados) entre esses dois tipos de tumores. Não encontramos nenhuma relação estatística em nossos resultados, porém a presença de ácidos siálicos α 2,6-ligados é, mais uma vez, um parâmetro relevante a ser estudado. As pacientes com CDIS tem uma menor quantidade de ácidos siálicos α 2,6-ligados nas células tumorais comparadas com as células tumorais invasivas do CDI o que se pressupõe que a alteração na expressão desse carboidrato precisa ser levada em consideração na rotina de diagnóstico assim como na diferenciação desses tumores.

7 CONCLUSÕES

- A técnica de microarranjos de tecidos (TMA) se revelou eficiente em validar novos biomarcadores para o câncer invasivo de mama, além de permitir uma análise de alto rendimento da expressão de proteínas em uma única lâmina;
- Em nossa casuística, β 1-integrina foi expressa em 32,8% das amostras de carcinoma ductal invasivo; MGAT5 em 48% e a marcação de SNA foi positiva em 33,3% dos casos avaliados;
- Nossos resultados indicam que o subgrupo de pacientes que apresentam baixa expressão de β 1-integrina e negatividade para HER-2 estão relacionados com o fenótipo menos agressivo da doença;
- Na análise de sobrevivência, a β 1-integrina se mostra eficiente em predizer o prognóstico da doença uma vez que há uma relação positiva da superexpressão dessa proteína com sobrevida específica das pacientes com CDI. Nossos resultados suportam o princípio de que a superexpressão da β 1-integrina está associada à agressividade do tumor além de poder ser considerada alvo terapêutico;
- MGAT5 se correlacionou com o Receptor de Estrógeno e a glicoproteína MUC1 e sua expressão não pode ser considerada um fator prognóstico nos carcinomas mamários, uma vez que não teve relação com nenhum parâmetro clínico-histopatológico e parâmetros de sobrevivência. Porém abre possibilidades de novos estudos para analisar o padrão de expressão de glicosiltransferases em tumores ER⁻/ER⁺;
- A expressão de ácidos siálicos α 2,6-ligados (evidenciado pela marcação da lectina SNA) se correlacionou com os marcadores Ki-67 e Receptor de Progesterona, além dos parâmetros clínicos para acometimento de linfonodos e morte. Na análise de sobrevivência, sua expressão está intimamente ligada com a sobrevida específica das pacientes, tempo livre da doença e acometimento de linfonodos, além de se mostrar uma variável independente (análise de Cox). Nossos resultados mostram que a histoquímica com lectinas usando SNA é uma ferramenta importante no auxílio do prognóstico da doença e pode ser utilizada como sonda para ácido siálico α 2,6-ligado nos casos de CDI;
- A única sonda capaz de predizer uma diferença no padrão de marcação entre os casos de CDIS e CDI foi a lectina SNA uma vez que a presença de ácido siálico α 2,6-ligado foi diferenciada entre os dois grupos de pacientes. Esse fator abre caminho a novas pesquisas para elucidar se o CDIS é uma lesão precursora do CDI e se a lectina SNA pode ser utilizada para predizer um padrão de evolução para a doença da forma pré-maligna para a sua forma invasiva.

8 PERSPECTIVAS

As modificações em glicoconjugados estão entre os tópicos mais estudados no câncer, o que faz com que sejam considerados como promissores biomarcadores. Muitos já foram e continuam a ser identificados, porém, as inúmeras vias de regulação e as funções gênicas específicas necessárias a essas modificações, além de difícil identificação, não estão completamente entendidas, o que gera um enorme campo para futuras pesquisas na área da glicobiologia do câncer.

A investigação do papel de monossacarídeos ou oligossacarídeos, reconhecidos a nível molecular por lectinas, é de fundamental relevância para avaliar o perfil fenotípico de glicoproteínas na tumorigênese, e mais especificamente, no caso do câncer de mama, a possível progressão de CDIS para CDI e capacidade de metástase, deste último. Glicosiltransferases (como a MGAT-5 e a ST6GalNAc V) têm sido encontradas estando diretamente envolvidas no desenvolvimento e manutenção do câncer de mama e, portanto, são proteínas importantes para a capacidade de invasão e a agressividade do tumor.

Como próximos passos dessa pesquisa, e do grupo Biomarcadores no Câncer (BmC) pretende-se estabelecer cada vez mais as lectinas como sondas do glicódigo celular, auxiliando no prognóstico não só do câncer mama como também de próstata. Além da investigação de micro-RNAs que podem estar envolvidos na regulação de genes do processo de glicosilação, citando miR-134 e miR-21 na regulação da expressão de seus respectivos alvos (*ITGB1* e *gnt-v*) nos tecidos tumorais de biópsias de pacientes com CDI.

9 REFERÊNCIAS

- ABD EL-REHIM, D. M.; PINDER, S. E.; PAISH, C. E.; BELL, J.; BLAMEY, R. W.; ROBERTSON, J. F. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 661-671, 2004.
- ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p.113-31, 2002.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Statistics**. Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 01 Fev. 2013.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures**. Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 01 Fev. 2013.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.6, p. 3-13, 2003.
- ANDRADE, V.P.; CUNHA, I.W.; SILVA, E.M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S.S. et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.
- AVRAAMIDES, C.J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, p. 604–617, 2008.
- BATTIFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 55, n. 2, p. 244-248, 1986.
- BELLIS, SL. Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1663, n. 1-2, p. 52-60, 2004.
- BELTRÃO, E.I.C.; Medeiros, P.L.; Rodrigues, O.G.; Figueredo-Silva, J.; Valença, M.M.; Coelho, L.C.; Carvalho, L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meninge tumor. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, n. 2, p. 139-142, 2003.
- BHARGAVA R, BERIWAL S, McMANUS K, DABBS DJ. CK5 Is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 5, p. 724-730, 2008.
- BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425–35, 2004.

BLOWS, F. M.; DRIVER, K. E.; SCHMIDT, M. K.; BROEKS, A., van LEEUWEN, F.E., WESSELING, J., et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, p. e1000279, 2010.

BOMBONATI, A.; SGROI, D.C. The molecular pathology of breast cancer progression. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p.307–317, 2011.

BORG, A.; TANDON, A.K.; SIGURDSSON, H.; CLARK, G.M.; FERNÖ, M.; FUQUA, S.A.; et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer Research**, v. 50, n. 14, p. 4332–4337, 1990.

BREAST CANCER ORG. What Is Breast Cancer? Disponível em: <http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc> Acesso em: 11 Ago. 2012.

BREAST PATHOLOGY INFO. Carcinoma in situ. Disponível em: <<http://www.breastpathology.info>> Acesso em: 11 Ago. 2012.

BRESALIER, R.S.; BYRD, J.C.; WANG, L.; RAZ, A. Colon cancer mucin: a new ligand for the beta-galactoside-binding protein galectin-3. **Cancer Research**, v. 56, n. 19, p. 4354-4357, 1996.

BURCHELL, J.; POULSOM, R.; HANBY, A.; WHITEHOUSE, C.; COOPER, L.; CLAUSEN, H.; et al. An alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. **Glycobiology**, v. 9, n. 12, p.1307-1311, 1999.

CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; TRAVASSOS, L.R.; BRENTANI, R.R. Functionally distinct roles for glycosylation of α and β 1 integrin chains in cell-matrix interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, p. 1795–1799, 1993.

CHANDRASEKARAN, E.V.; XUE, J.; NEELAMEGHAM, S.; MATTA, K.L. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. **Carbohydrate Research**. v. 341, n. 8, p. 983-994, 2006.

CHIRICOLO, M.; MALAGOLINI, N.; BONFIGLIOLI, S.; DALL’OLIO, F. Phenotypic changes induced by expression of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase (ST6Gal I) in the human colon cancer cell line SW948. **Glycobiology**, v. 16, p. 146–154, 2006.

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.

CLARK, R.B. Isolation and characterization of human mammary stem cells. **Cell Proliferation**, v. 38, p. 375-386, 2005.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 6, p. 23-26, 2001.

CUI, H.; LIN, Y.; YUE, L.; ZHAO, X.; LIU, J. Differential expression of the α 2,3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. **Oncology Reports**, v. 25, n. 5, p. 1365-1371, 2011.

DALL'OLIO, F. The sialyl- α 2,6-lactosaminyl-structure: biosynthesis and functional role. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 10, p. 669-676, 2000.

DAWSON, P.J. Bilateral and multifocal breast cancer. **Cancer Control Journal**, v. 3, n. 3, p. 258-266, 1996.

de-FÁTIMA, A.F.; BAPTISTELLA, L.H.B.; PILLI, R.A. Ácidos Siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 306-316, 2005.

DEMETRIOU, M.; NABI, I.R.; COPPOLINO, M.; DEDHAL, S.; DENNIS, J.W. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. **Journal of Cell Biology** v. 130, p. 383–392, 1995.

DESGROSELLIER, J.S.; CHERESH, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

DHINGRA, K.; HORTOBAGYI, G.N. Critical evaluation of prognostic factors. **Seminars in Oncology**, v. 23, p. 436-445, 1996.

DIMITROFF, C.J.; PERA, P.; DALL'OLIO, F.; MATTA, K.L.; CHANDRASEKARAN, E.V.; LAU, J.T.; et al. Cell surface N-acetylneuraminic acid α 2,3-galactoside-dependent intercellular adhesion of human colon cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 256, n. 3, p. 631-636, 1999.

DOSAKA-AKITA, H.; MIYOSHI, E.; SUZUKI, O.; ITOH, T.; KATO, H.; TANIGUCHI, N. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase v is associated

with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 1, n. 10(5), p. 1773-1779, 2004.

dos-SANTOS, P.B.; ZANETTI, J.S.; RIBEIRO-SILVA, A.; BELTRÃO, E.I. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 7, p. 104-115, 2012.

DRAKE, P.M.; CHO, W.; LI, B.; PRAKOBPHOL, A.; JOHANSEN, E.; ANDERSON, N.L.; et al. Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 223-236, 2010.

DUBE, D.H.; BERTOZZI, C.R. Glycans in cancer and inflammation - potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v.4, n. 6, p. 477-488, 2005.

DUFFY, M.J.; CROWN, J. Companion biomarkers: paving the pathway to personalized treatment for cancer. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 1447-1456, 2013.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumoriais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n.4, p.377-388, 2001.

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. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.

ELLIS, S.J.; TANENTZAPF, G. Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interactions. **Cell Tissue Research**, v. 339, p.121-130, 2010.

ELLIS, I.O.; ELSTON, C.W.; POLLER, D.N. Ductal carcinoma in situ. In: Elston CW, Ellis IO, editors. **The breast**. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998. p. 249-282.

ERCAN, C.; VAN DIEST, P.; VAN DER ENDE, B.; HINRICHS, J.; BULT, P.; et al. p53 mutations in classic and pleomorphic invasive lobular carcinoma of the breast, **Cell Oncology**, v. 35, p. 111-118, 2012.

ERNSTER, V.L.; BARCLAY, J.; KERLIKOWSKE, K.; GRADY, D.; HENDERSON, C. Incidence and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. **The Journal of the American Medical Association**, v. 275, p. 913-918, 1996.

FENTIMAN, I.S. Ductal carcinoma in situ. In: Fentiman IS, editor. **Detection and Treatment of Breast Cancer**. 2nd ed. London: British Library; 1998. p. 217-233.

FERNANDES, B.; SAGMAN, U.; AUGER, M.; DEMETRIOU, M.; DENNIS, J.W. Beta1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. **Cancer Research**, v. 51, p. 718-723, 1991.

FISHER, B.; LAND, S.; MAMOUNAS, E.; DIGNAM, J.; FISHER, E.R.; WOLMARK, N. Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. **Seminars in Oncology**, v.28, n.4, p. 400-418, 2001.

FOUNTZILAS G, DAFNI U, BOBOS M, BATISTATOU A, KOTOULA V.; ET AL. Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. **PLoS One**, v. 7, n.6, e37946.

FREIRE, T.; ROBELLO, C.; CASARAVILLA, C.; ERRICO, D.A.; MEDEIROS, A.; CARMONA, C.; OSINAGA, E. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. **Actas de Fisiología**, v. 8, p. 89-107, 2002.

FUSTER, M.M.; ESKO, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, 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, n. 3, p. 236-247, 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.; ROCHA, R. M.; NUNES, C. B. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 131-140, 2008.

GUO, K. ; LIU, Y.; ZHOU, H.; DAÍ, Z.; ZHANG, J.; SUN, R.; et al. Involvement of protein kinase C beta-extracellular signal-regulating kinase 1/2/p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 activation in hepatocellular carcinoma cell motility and invasion. **Cancer Science**, v. 99, n. 3, p. 486–496, 2008.

GU, J.; TANIGUCHI, N. Regulation of integrin functions by N-glycans. **Glycoconjugates Journal**, v. 21, p. 9-15, 2004.

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, n. 3, p. 306–312, 2000.

FITZGIBBONS, P.L.; PAGE, D.L.; WEAVER, D.; THOR, A.D.; ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-78, 2000.

FLAMANT, L.; NOTTE, A.; NINANE, N.; RAES, M.; MICHIELS, C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 191, p. 1-15, 2010.

HANDERSON, T.; CAMP, R.; HARIGOPAL, M.; RIMM, D.; PAWELEK, J. Beta1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 8, pp. 2969-2973, 2005.

HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10231-10233, 2002.

HARDUIN-LEPERS, A.; VALLEJO-RUIZ, V.; KRZEWSKI-RECCHI, M.A.; SAMYN-PETIT, B.; JULIEN, S.; DELANNOY, P. The human sialyltransferase family. **Biochimie** v. 83, n. 8, p. 727-737, 2001.

HAMMOND, M.E.; HAYES, D.F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D.C.; HAGERTY, K.L.; et al: American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer: the next generation, **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANISCH, F.G. O-glycosylation of the mucin type. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 2, p. 143-149, 2001.

HITTELET, A. et al., Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **International Journal of Cancer**. v. 103, p. 370-379, 2003.

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002

HEDLUND, M.; NG, E.; VARKI, A.; VARKI, N.M. Alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 388–394, 2008.

HUANG B.; WU, Q.; GE, Y.; ZHANG, J.; SUN, L.; ZHANG, Y. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in gastric cancer correlates with metastasis and prognosis. **International Journal of Oncology**, doi: 10.3892/ijo.2014.2248, 2013.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: 06 Jan. 2014.

JANIK, M.E.; LITYŃSKA, A.; VEREECKEN, P. Cell migration - The role of integrin glycosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, n. 6, p. 545-555, 2010.

KINNE, D.W.; PETREK, J.A.; OSBORNE, M.P.; FRACCHIA, A.A.; DePALO, A.A.; ROSEN, P.P. Breast carcinoma in situ. **Archives of Surgery**, v. 124, p. 33-36, 1989.

KREN, A.; BAERISWYL, V.; LEHEMBRE, F.; WUNDERLIN, C.; STRITTMATTER, K.; ANTONIADIS, H.; et al. Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of b1-integrin function. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 12, p. 2832-2842, 2007.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, p. 844-847, 1998.

KUWADA, S.K. Drug evaluation: volociximab, an angiogenesis-inhibiting chimeric monoclonal antibody. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, n. 9, n. 1, p. 92–98, 2007.

LI, D.; LI, Y.; WU, X.; LI, Q.; YU, J.; GEN, J.; 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.

LUDWIG, J.A.; WEINSTEIN, J.N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment. **Nature Reviews**, v.5, p.845-856, 2005.

MELKER, A.A.; SONNENBERG, A. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. **Bioessays**, v. 21, n. 6, p. 499–509, 1999.

McCawley, L.J.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Molecular Medicine Today**, v. 6, n. 4, p.149-156, 2000.

Meany, D.L.; Chan, D.W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2011.

Minko, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 491-509, 2004.

Murata, K.; Miyoshi, E.; Kameyama, M.; Ishikawa, O.; Kabuto, T.; Sasaki, Y.; et al. Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. **Clinical Cancer Research**. v. 6, p. 1772–1777, 2000.

Oliveira-Costa, J.P.; Zanetti, J.S.; Oliveira, L.R.; Soares, F.A.; Ramalho, L.Z.; et al. Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. **Human Pathology**, v. 41, n. 11, p. 1624–1630. 2010.

Page, D.L.; Anderson, T.J. **Diagnostic histopathology of the breast**. 1st ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987. p. 120-192.

Park, C.C.; Zhang, H.J.; Yao, E.S.; Park, C.J.; Bissell, M.J. Beta1 integrin inhibition dramatically enhances radiotherapy efficacy in human breast cancer xenografts. **Cancer Research**, v. 68, n. 11, p. 4398–4405, 2008.

Patani, N.; Jiang, W.; Mokbel, K. Prognostic utility of glycosyltransferase expression in breast cancer. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 5, p. 333-340, 2008.

Pierce, M.; Buckhaults, P.; Chen, L.; Fregien, N. Regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase V and Asn-linked oligosaccharide β (1,6) branching by a growth factor signaling pathway and effects on cell adhesion and metastatic potential. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, n. 5, p. 623–630, 1997.

Polyak, K.; Kalluri, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 11, a003244, 2010.

RCSB PDB – The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein databank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/>> Acesso em: 11 out. 2012.

RICCI, M.D.; JUNQUEIRA, P.A.A. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n.3, p. 189-189, 2008.

ROSETE, P.G.; ATZÍN, J.A.; SALDAÑA, A.K.; ESPINOSA, B.; URREA, F.J.; VÁZQUEZ, N.; et al. Comportamiento tumoral y glicosilación. **Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 21, n. 4, p. 190-197, 2008.

REIS, C.A.; OSÓRIO, H.; SILVA, L.; GOMES, C.; DAVID, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, **Journal of Clinical Pathology**, v. 63, n. 4, p. 322-329, 2010.

REIS, C.A.; CAMPOS, D.; OSÓRIO, H.; SANTOS, L.L. Glycopeptide microarray for autoantibody detection in cancer. **Expert Reviews of Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 435-437, 2011.

SALLES, M. A. MATIAS, M.A.R.F.; PEREZ, A.A.; GOBBI, H. Carcinoma ductal in situ da mama: critérios para diagnóstico e abordagem em hospitais públicos de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, 2006.

SAITO, T.; MIYOSHI, E.; SASAI, K.; NAKANO, N.; EGUCHI, H.; HONKE, K. et al. A secreted type of beta 1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferases activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 17002-17008, 2002.

SAPINO, A.; MARCHIÒ, C.; SENETTA, R.; CASTELLANO, I.; MACRÌ, L.; CASSONI, P.; et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. **Virchows Archiv: A international Journal of Pathology**, v. 449, n. 3, p. 288-96, 2006.

SCHRAML, P.; KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; MOCH, H.; BISSIG, H.; NOCITO, A.; et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 8, p. 1966-1975, 1999.

SCHWARTZ, G.F.; FINKEL, G.C.; GARCIA, J.C.; PATCHEFESKY, A.S. Subclinical ductal carcinoma in situ of the breast: treatment by local excision and surveillance alone. **Cancer**, v. 70, n. 10, p. 2468-2474, 1992.

SEALES, E.C.; JURADO, G.A.; BRUNSON, B.A.; WAKEFIELD, J.K.; FROST, A.R.; et al. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. **Cancer Research**, v. 65, n. 11, p. 4645-52, 2005.

SELL, A.M.; da-COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n.2, p. 297-303, 2000.

SHARON, N.; LIS H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n.11, p. 53-62, 2004.

SHIBUE, T.; Weinberg, R.A. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 25, p. 10290-10295, 2009.

SHINAGAWA, K.; ANDRESON, G.P. Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. **Journal of Immunological Methods**, n. 237, v. 1-2, p. 65-72, 2000.

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 Epidemiology Biomarkers**. v. 14, p. 2517–2523, 2005.

SINGH, A.; SAU, A.K. Tissue Microarray: A powerful and rapidly evolving tool for high-throughput analysis of clinical specimens. **International Journal of Case Reports and Images**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2010.

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

SOBRAL, A.P.V. REGO M.J.; CAVALACANTI, C.L.; CARVALHO, L.B Jr.; BELTRÃO, E.I. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral Science**, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SPANGENBERG C, LAUSCH EU, TROST TM, PRAWITT D, MAY A, KEPPLER R, et al. ERBB2-mediated transcriptional up-regulation of the α 5 β 1 integrin fibronectin receptor promotes tumor cell survival under adverse conditions. **Cancer Research**, v. 66, n. 7, p. 3715–3725, 2006.

SPIRO, R.G. Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 1025–1041, 2004.

STEFANIDAKIS, M.; KOIVUNEN E. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1441-50, 2006.

SWINDALL, A.F.; BELLIS, S.L. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.26, p.22982-22990, 2011.

TANIGUCHI, N.; YOSHIMURA, M.; MIYOSHI, E.; IHARA, Y.; NISHIKAWA, A.; FUJII, S. Remodeling of cell surface glycoproteins by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection: modulation of metastatic potentials and down regulation of hepatitis B virus replication, **Glycobiology**, v. 6, n. 7, p. 691-694, 1996.

TANIGUCHI, N.; KOREKANE, H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics, **BMB Reports**, v. 44, n. 12, p. 772-781, 2011.

TAVASSOLI, F.A.; MAN, Y. Morphofunctional features of atypical intraductal hyperplasia, and various grades of intraductal carcinoma. **Breast Journal**, v. 1, p. 155-162, 1995.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7212-7220, 2005.

VAN DE VIJVER, M.J.; HE Y.D., VAN'T VEER, L.J.; DAI, H.; HART, A.A.; VOSKUIL, D.W.; et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

VARKI A. Sialic acids in human health and disease. **Trends on Molecular Medicine**. v. 14, n. 8, p. 351-60, 2008.

VIDEIRA, P.A.; CORREIA, M.; MALAGOLINI, N.; CRESPO, H.J.; LIGEIRO, D.; CALAIS, F.M.; et al. ST3 Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. **BMC Cancer**, v. 9, n. 357, p. 1-15, 2009.

VIEIRA-DE-MELLO, G.S.; SILVA-FILHO, A.F.; BARROS, P.S.; RÊGO, M.J.B.M.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin histochemistry reveals changes in carbohydrate expression on morphological types of breast ductal carcinoma in situ. **Journal of Cytology and Histology**, v. 4, p. 1-4, 2013.

WANG, PH. Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. **Journal of Cancer Molecules**, v. 1, n.2, p. 73-81, 2005.

WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; VAN'T VEER, L.J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, 2005

WEIGELT, B.; GEYER, F.C.; REIS-FILHO, J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, p.192–208, 2010.

WHITTAKER, C.A.; HYNES, R.O. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 10, p. 3369-3387, 2002.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>> Acesso em 06 dez. 2013.

WHO - World Health Organization – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva; 1993.

WOLFF, A.C.; HAMMOND, M.E.; SCHWARTZ, J.N.; HAGERTY, K.L.; ALLRED, D.C.; et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists: American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 131, p. 18–43, 2007.

WÜNSCH-FILHO, V.; GATTÁS, G.J.F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.

YAO, E.S.; ZHANG, H.; CHEN, Y.Y.; LEE, B.; CHEW, K.; MOORE, D. et al. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 2, p.659-664, 2007.

ZANETTI, J.S.; SOAVE, D.F.; OLIVEIRA-COSTA, J.P.; DA-SILVEIRA, G.G.; RAMALHO, et al. The role of tumor hypoxia in MUC1-positive breast carcinomas. **Virchows Arch**, v. 459, n.4, p. 367-75, 2011.

ZHAO, J.; SIMEONE, D.M.; HEIDT, D.; ANDERSON, M.A.; LUBMAN, D.M. Comparative serum glycoproteomics using lectin selected sialic acid glycoproteins with mass spectrometric analysis: Application to pancreatic cancer serum. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 7, p. 1792-1802, 2006.

ZHAO, Y.; TAKAHASHI, M.; GU, J.; MIYOSHI, E.; MATSUMOTO, A.; KITAZUME, S.; et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Science**, v. 99 n. 7, p. 1304-1310, 2008.

ZHAO Y, LI J, XING Y, WANG J, LU C, XIN X, et al. N-acetylglucosaminyltransferase V mediates cell migration and invasion of mouse

mammary tumor cells 4TO7 via RhoA and Rac1 signaling pathway. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 309, p. 199–208, 2008.

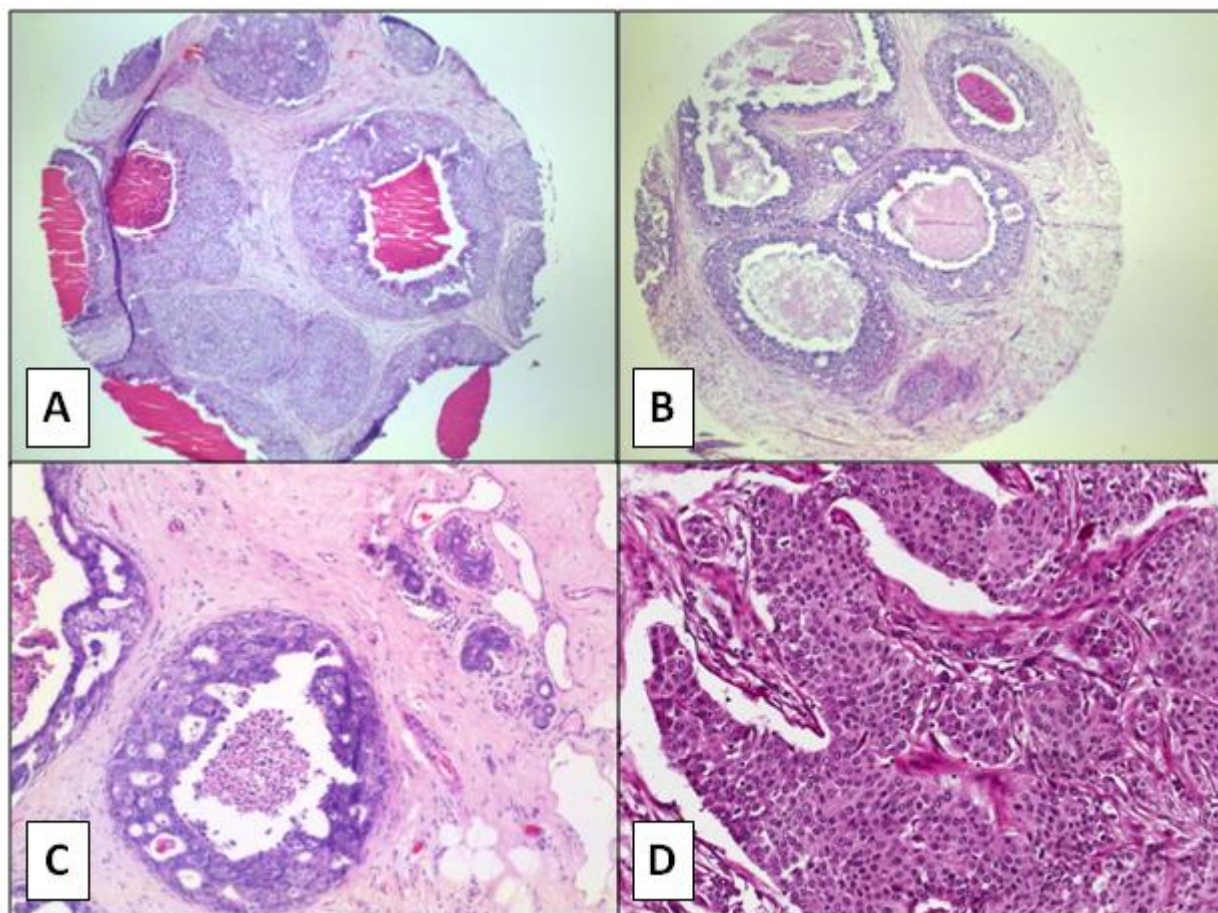


Figura Anexo 1: Amostras de tumores em TMA corados pela técnica de H&E para confirmação dos casos: A, B e C: Carcinoma ductal *in situ*; D: Carcinoma ductal invasivo. (Fonte: autor).

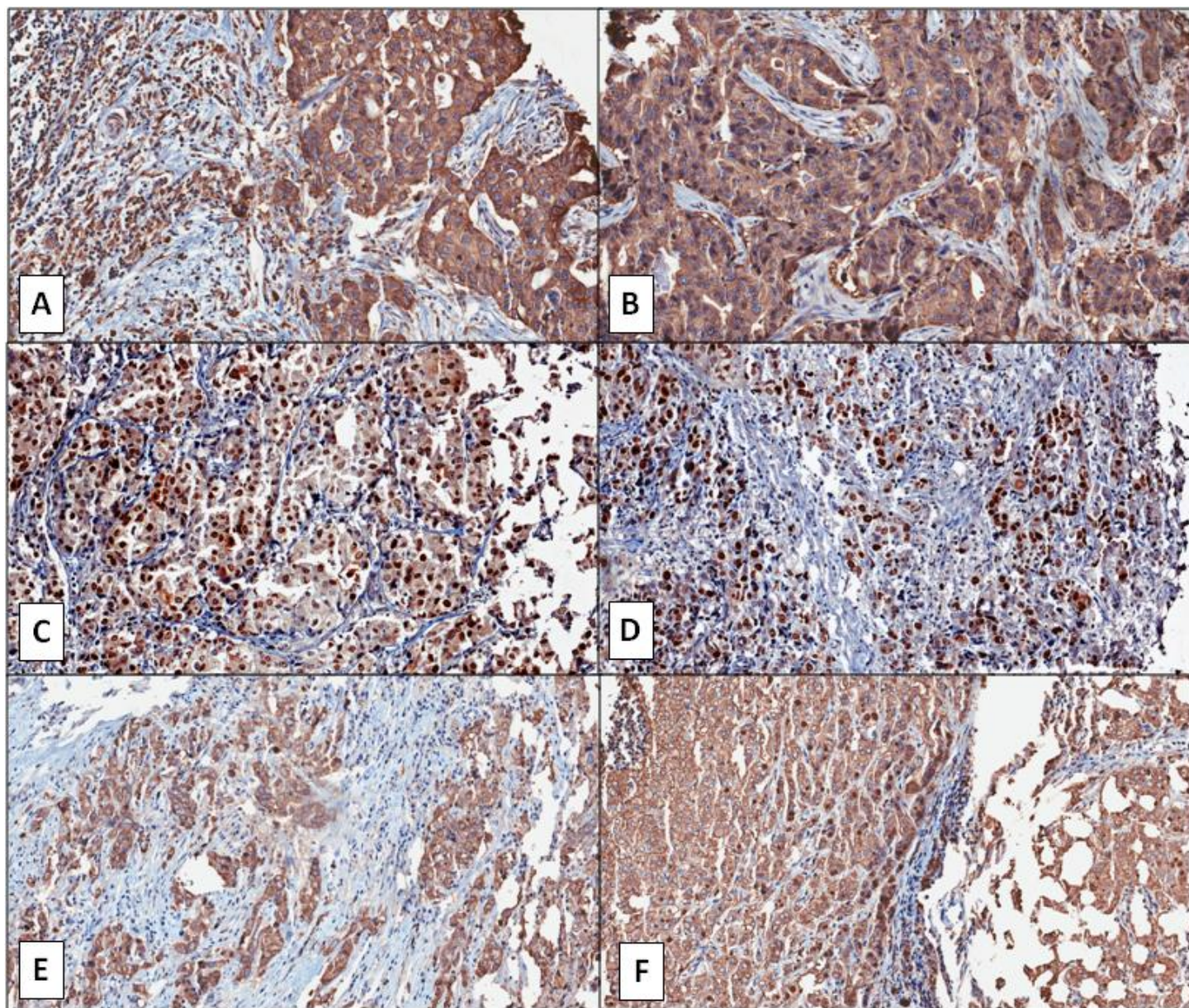


Figura Anexo 2: Imunohistoquímica de células neoplásicas de CDI positivas para os marcadores: A e B: HER-2 (marcação de membrana), C e D: Ki67 (marcação nuclear), E e F: MUC1 (marcação de citoplasma e membrana). Aumento de 200X. (Fonte: autor).

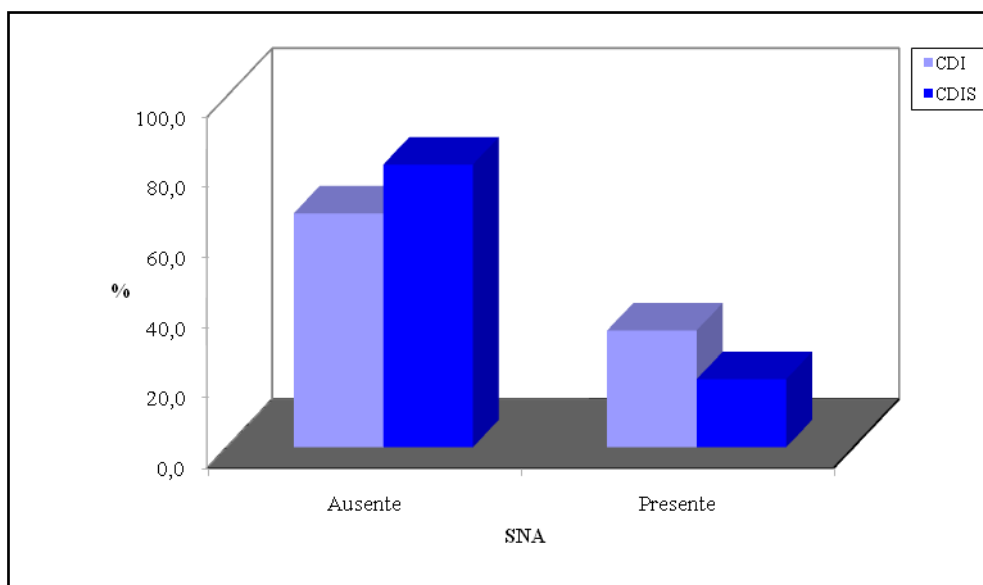


Figura Anexo 3: Teste de Qui-quadrado entre os casos de CDI e CDIS positivos (presente) e negativos (ausente) para a presença de ácidos siálicos $\alpha 2,6$ -ligados reconhecidos pela SNA em histoquímica com lectinas ($p=0,034$; SPSS 13.0).

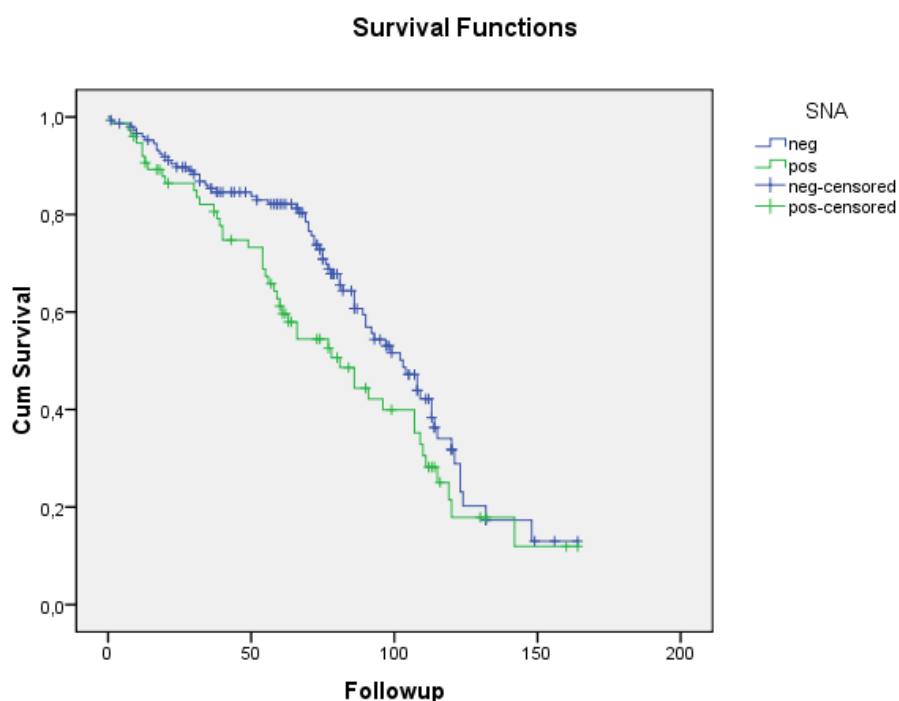


Figura Anexo 4: Análise univariada (Teste de Kaplan-Meier seguido de Log-rank); Impacto da presença (curva verde) e ausência (curva azul) de ácidos siálicos $\alpha 2,6$ -ligados no acometimento de linfonodos das pacientes com CDI. O total de 47 pacientes com metástases em linfonodos tiveram a expressão do ácido siálico $\alpha 2,6$ -ligados.

Tabela Anexo 1: Correlação entre a expressão de $\beta 1$ -Integrina e MGAT-5 com fatores clínico-histopatológicos de significado prognóstico em **carcinoma ductal *in situ* de mama**; teste Qui-quadrado; SPSS 19.0.

Dados Clínico-histopatológicos e Marcadores Biológicos		$\beta 1$ -Integrina			MGAT-5		
		n	Positivos (%)	P	n	Positivos (%)	P
Idade (anos)	<50	12	54,5	0,303	19	46,3	0,483
	>50	10	45,5		22	53,7	
Status menstrual	Pré	10	54,5	0,499	17	41,5	0,148
	Pós	12	45,5		24	58,5	
Tamanho do tumor (mm)	<20	7	31,8	0,726	14	34,1	0,922
	20-50	11	50,0		22	53,7	
	>50	14	18,2		5	12,2	
Grau nuclear	I (baixo)	3	13,6	0,080	8	19,5	0,591
	II (médio)	0	0		14	9,8	
	III (alto)	19	86,4		29	70,7	
Multifocal	Negativo	9	40,9	0,679	14	34,1	0,338
	Positivo	13	59,1		27	65,9	
Receptor de Estrógeno	Negativo	5	22,7	0,487	12	29,3	0,266
	Positivo	17	77,3		29	70,7	
Receptor de Progesterona	Negativo	8	36,4	0,295	15	36,6	0,107
	Positivo	14	63,6		26	63,4	
HER2	Negativo	6	27,3	0,435	17	41,5	0,572
	Positivo	16	72,7		24	58,5	

Tabela Anexo 2. Correlação entre a expressão de $\beta 1$ -Integrina e MGAT-5 com fatores clínico-histopatológicos de significado prognóstico em **carcinoma ductal invasivo de mama**; teste qui-quadrado, SPSS 19.0.

Dados Clínico-histopatológicos, Marcadores Biológicos e Lectinas		$\beta 1$ -integrina				MGAT5			
		n	Negativos (%)	Positivos (%)	p	n	Negativos (%)	Positivos (%)	P
Idade (anos)	<50	92	65 (43,0)	27 (36,5)	0.213	92	50 (42,7)	42 (38,9)	0,326
	>50	133	86 (57,0)	47 (63,5)		133	67 (57,3)	66 (61,1)	
Status menstrual	Pré	78	54 (35,8)	24 (32,4)	0.367	78	44 (37,6)	34 (31,5)	0,205
	Pós	147	97 (64,2)	50 (67,6)		147	73 (62,4)	74 (68,5)	
Tamanho do tumor (mm)	<20	68	49 (32,5)	19 (25,7)	0.442	68	34 (29,1)	34 (31,5)	0,912
	20-50	88	55 (36,4)	33 (44,6)		88	46 (39,3)	42 (38,9)	
	>50	69	47 (31,1)	22 (29,7)		69	37 (31,6)	32 (29,6)	
Grau tumoral (Bloom-Rich)	I	82	57 (37,7)	25 (33,8)	0.845	82	42 (35,9)	40 (37)	0,192
	II	108	71 (47,0)	37 (50,0)		108	52 (44,4)	56 (51,9)	
	III	35	23 (15,2)	12 (16,2)		35	23 (19,7)	12 (11,1)	
Status linfonodal	Negativo	108	75 (49,7)	33 (44,6)	0.283	108	59 (50,4)	49 (45,4)	0,266
	Positivo	117	76 (50,3)	41 (55,4)		117	58 (49,6)	59 (54,6)	
Estadiamento Clínico	I	32	22 (14,6)	10 (13,5)	0.677	32	14 (12,)	18 (16,7)	0,766
	II	102	72 (47,7)	30 (40,5)		102	54 (46,2)	48 (44,4)	
	III	79	49 (32,5)	30 (40,5)		79	42 (35,9)	37 (34,3)	
	IV	12	8 (5,3)	4 (5,4)		12	7 (6,0)	5 (4,6)	
Recorrência	Negativo	196	131 (86,8)	65 (87,8)	0,501	196	100 (85,5)	96 (88,9)	0,287
	Positivo	29	20 (13,2)	9 (12,2)		29	17 (14,5)	12 (11,1)	
Metástase	Negativo	163	115 (76,2)	48 (64,9)	0,05	163	87 (74,4)	76 (20,4)	0,302
	Positivo	62	36 (23,8)	26 (35,1)		62	30 (25,6)	32 (29,6)	
Morte	Negativo	156	116 (76,8)	40 (54,1)	0,001	156	85 (72,6)	71 (65,7)	0,164

	Positivo	69	35 (23,2)	34 (45,9)		69	32 (27,4)	37 (34,3)	
Receptor de Estrógeno	Negativo	76	54 (35,8)	22 (29,7)	0.228	76	46 (39,3)	30 (27,8)	0,046
	Positivo	149	97 (64,2)	52 (70,3)		149	71 (60,7)	78 (72,2)	
Receptor de Progesterona	Negativo	87	56 (37,1)	31 (41,9)	0.290	87	50 (42,7)	37 (34,3)	0,121
	Positivo	138	95 (62,9)	43 (58,1)		138	67 (57,3)	71 (65,7)	
Ki-67	Negativo	143	93 (61,6)	50 (67,6)	0.234	143	75 (64,1)	68 (63,0)	0,484
	Positivo	82	58 (38,4)	24 (32,4)		82	42 (35,9)	40 (37,0)	
P-53	Negativo	76	54 (35,8)	22 (29,7)	0.228	76	38 (32,5)	38 (35,2)	0,387
	Positivo	149	97 (64,2)	52 (70,3)		149	79 (67,5)	70 (64,8)	
HER-2	Negativo	178	126 (83,4)	52 (70,3)	0.019	178	96 (82,1)	82 (75,9)	0,167
	Positivo	47	25 (16,6)	22 (29,7)		47	21 (17,9)	26 (24,1)	
MGAT5	Negativo	117	90 (59,6)	27 (36,5)	0.001	-	-	-	-
	Positivo	108	61 (40,4)	47 (63,5)					
β1-integrina	Negativo	-	-	-	-	151	90 (76,9)	61 (56,5)	0.001
	Positivo					74	27 (23,1)	47 (43,5)	
VEGF	Negativo	180	114 (75,5)	66 (89,2)	0.011	180	93 (79,5)	87 (80,6)	0,487
	Positivo	45	37 (24,5)	8 (10,8)		45	24 (20,5)	21 (19,4)	
MUC1	Negativo	139	100 (66,2)	39 (52,7)	0.035	139	79 (67,5)	60 (55,6)	0.044
	Positivo	86	51 (33,8)	35 (47,3)		86	38 (32,5)	48 (44,4)	
SNA	Negativo	150	112 (74,2)	38 (51,4)	0.001	150	96 (82,1)	54 (50,0)	0.0001
	Positivo	75	39 (25,8)	36 (48,6)		75	21 (17,9)	54 (50,0)	
MAL-II	Negativo	155	113 (74,8)	42 (56,8)	0.005	155	98 (83,8)	57 (52,8)	0.0001
	Positivo	70	38 (25,2)	32 (43,2)		70	19 (16,2)	51 (47,2)	
L-PHA	Negativo	154	115 (76,2)	39 (52,7)	0.0001	154	108 (92,3)	46 (42,6)	0.0001
	Positivo	71	36 (23,8)	35 (47,3)		71	9 (7,7)	62 (57,4)	

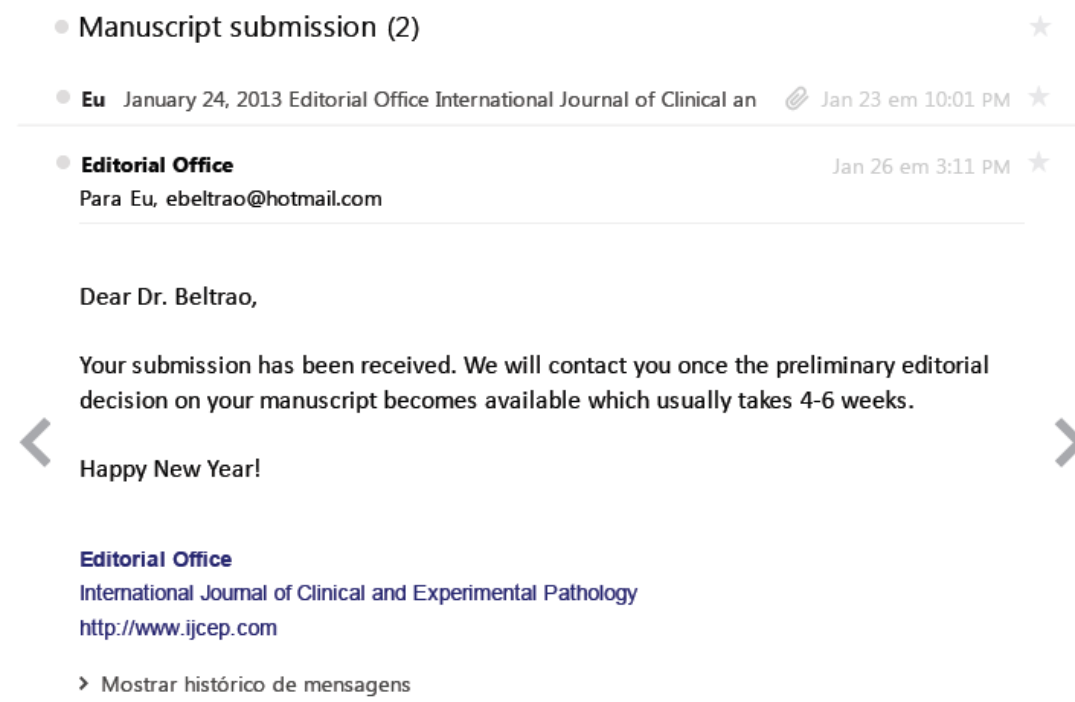


Figura Anexo 5. Comprovante (email) de submissão do artigo “A Clinicopathological and Immunohistochemical Investigation Reveals SNA Lectin as a Prognostic Carbohydrate-Dependent Probe for Invasive Ductal Cancinoma of the Breast” na revista International Journal of Clinical and Experimental Pathology.