



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FUT3 NO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA:
INVESTIGAÇÃO DO PROMOTOR GÊNICO E EXPRESSÃO PROTÉICA
EM PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

ORIENTADOR: EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO
CO-ORIENTADORA: CÍNTIA RENATA COSTA ROCHA

RECIFE, 2015

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

FUT3 NO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA:
INVESTIGAÇÃO DO PROMOTOR GÊNICO E EXPRESSÃO PROTÉICA
EM PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO

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

Orientador: Prof. Eduardo
Isidoro Carneiro Beltrão
Co-orientadora: Prof.^a Cíntia
Renata Costa Rocha

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Nascimento, Jessica Catarine Frutuoso do

FUT3 no carcinoma ductal invasivo de mama: investigação do promotor gênico e expressão proteica em pacientes do Nordeste brasileiro/ Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento– Recife: O Autor, 2015.

47 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientadora: Cíntia Renata Costa Rocha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referência e anexo

- 1. Mamas- câncer 2. Câncer- epidemiologia 3. Genes I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Rocha, Cíntia Renata Costa (coorientadora) III. Título**

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-159

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

FUT3 NO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA:
INVESTIGAÇÃO DO PROMOTOR GÊNICO E EXPRESSÃO PROTÉICA
EM PACIENTES DO NORDESTE BRASILEIRO

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

Aprovado por:

Prof^o. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o. Dr. Lucas André Cavalcante Brandão (Titular Externo 1)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Titular Externo 2)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^o. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (Titular Externo 3)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Data: 24 de fevereiro de 2015

Aos meus pais,
Suas são minhas conquistas,
Desde a origem e para sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que a mim nunca desamparou. Aos meus queridos pais, Maria José e Jasiel, pelo amor, apoio e compreensão durante toda minha vida. Aos meus irmãos Jasiel Junior e Juliane, meus eternos cúmplices. Aos meus familiares, pela torcida mesmo a distância. Aos meus amigos e namorado, pelo aconchego dos seus ombros. Aos meus orientadores, Eduardo Beltrão e Cíntia Rocha, que igualmente contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos. Ao grupo Biomarcadores no Câncer e todos os seus componentes, por me receberem de braços abertos e me ajudarem a enfrentar todos os desafios desse mestrado, em especial a Bruno Trajano, Matheus Filgueira, Steffany Ferreira, Juliana Vasconcelos e João Quirino. Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (Lika) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e todos os seus colaboradores pela estrutura dada para a realização de todos os experimentos. Ao Departamento de Bioquímica e Fisiologia da UFPE e seu corpo docente pelo conhecimento transmitido durante todas as disciplinas. Ao Hospital das Clínicas da UFPE e ao Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e todos os seus funcionários. A todos aqueles que se voluntariaram a participar desta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tumor maligno de mama mais comum e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer em mulheres no mundo. A alteração no padrão de glicosilação é uma característica marcante do fenótipo tumoral. Dentre as reações glicosídicas alteradas no câncer está a fucosilação. Os tetrassacarídeos fucosilados sialil Lewis X (sLe^x) e sialil Lewis A (sLe^a) são ligantes reconhecidos pelas glicoproteínas transmembrânicas selectinas envolvidos nas interações célula-célula necessárias nos processos inflamatórios, hemostase/trombose, cicatrização de feridas e metástase tumoral. A etapa final na síntese do sLe^x e sLe^a é realizada pela ação da α 1,3/4-fucosiltransferase (FUT3), enzima codificada pelo gene *FUT3*. A expressão do sLe^a em carcinoma mamário está relacionada ao estágio tumoral e maiores níveis desse antígeno foram encontrados em tumores metastáticos. Níveis elevados da enzima FUT3 está relacionada ao maior poder metastático em linhagens celulares de câncer de próstata e pâncreas e sua ação é fundamental para o mecanismo de transição epitelial-mesenquimal induzido por TGF- β no câncer colorretal. Apesar da ação pró-tumoral exercida pela enzima FUT3 e seus produtos, estudos vem demonstrando sua importância para a citotoxicidade mediada pelas células NK sobre células tumorais, tanto devido ao reconhecimento do antígeno sLe^x pelos receptores lectina do tipo C quanto devido a fucosilação dos receptores DR4 e DR5 por essa enzima que é fundamental para o desencadeamento da via de apoptose extrínseca estimulada pelo Apo2L-TRAIL. Visando o maior conhecimento do papel dessa enzima no câncer de mama, o presente trabalho objetivou avaliar os níveis teciduais da FUT3 em tumores mamários malignos (carcinoma ductal invasivo - CDI) de pacientes do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), investigando se há correlação entre a expressão enzimática com a malignidade tumoral e o risco de metástase. A genotipagem da região promotora do gene *FUT3* também foi realizada a fim de identificar possíveis SNPs relacionados à expressão dessa enzima. Para tal biópsias em parafina de carcinoma ductal invasivo (CDI) foram selecionadas no arquivo do Setor de Anatomia Patológica do HC-UFPE e do IMIP. Os níveis teciduais da FUT3 foram avaliados por imuno-histoquímica. O DNA foi extraído por metodologia adaptada de Ramalho et al. (2014), a região promotora amplificada por PCR e posteriormente sequenciada pelo método de Sanger modificado. As sequências obtidas em duplicata foram analisadas através do software CLC Main Workbench. A análise estatística foi realizada através do teste exato de Fisher para os dados de expressão e pelo teste de Qui quadrado para a análise genômica, ambas as análises utilizando o software GraphPad Prism v.5. Nossos resultados demonstraram que a ausência tecidual da enzima FUT3 está relacionada ao CDI em pacientes brasileiros, sendo mais freqüente em tumores maiores e negativos para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Análise genômica mostrou que duas variações localizadas na região promotora do gene *FUT3* estão associadas ao CDI, embora o efeito direto desses polimorfismos na expressão da FUT3 não pode ser avaliada. O alelo T do SNP rs73920070 (-6933 C> T) está associado a ausência da neoplasia enquanto que o alelo T do SNP rs2306969 (-6951 C> T) está associado a presença do carcinoma ductal invasivo na população brasileira.

Palavras-chave: FucT-III; Carcinoma Ductal Infiltrativo; Promotor Gênico; SNP.

ABSTRACT

Invasive ductal carcinoma (IDC) is the most common breast malignant tumor and the mainly cause of death related to cancer among women in the world. The alteration of glycosylation pattern is a well established feature of tumor phenotype. Fucosylation is one of main glycosidic changes in cancer. The fucosylated tetrasaccharides sialil Lewis X (sLe^x) and sialil Lewis A (sLe^a) are ligands recognized by the transmembrane glycoproteins selectins involved in cell-cell interactions during the inflammatory process, hemostasis/thrombosis, wound healing and tumor metastasis. The final step in sLe^x and sLe^a synthesis is done by the action of α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT3), enzyme encoded by *FUT3* gene. The expression of sLe^a in mammary carcinoma is related to tumor stage and higher levels of this antigen were found in metastatic tumors. Higher protein expression of FUT3 were related to a bigger metastatic power in prostate and pancreas cancer cell lines and its action is primordial to epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β in colorectal cancer. Despite the pro-tumoral action of FUT3 enzyme and its products, studies have shown their importance to NK cell-mediated cytotoxicity against tumor cells, due to the sLe^x antigen recognition by type C lectin receptors and due to the fucosylation of DR4 and DR5 receptors, fundamental step to the extrinsic pathway of apoptosis stimulated by Apo2L-TRAIL. Aiming to better understand the role of this enzyme in breast cancer, the purpose of this study was evaluate the tissue protein expression of FUT3 in breast malignancies (invasive ductal carcinoma – IDC) in patients from Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) and Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). We investigated whether there is correlation between the FUT3 enzymatic expression with malignancy and metastasis risk in this cancer type. The genotyping of the *FUT3* promoter region was also realized in order to identify SNPs with potential to interfere on the enzyme expression. IDC formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies were selected from pathological anatomy service from HC-UFPE and IMIP. FUT3 tissue levels were evaluated by immunohistochemistry. DNA was extracted using the adapted methodology from Ramalho et al. (2014), the promoter region was amplified by PCR and next sequenced by Sanger modified method. The sequences obtained in duplicate were analyzed using the CLC Main Workbench software. Statistical analyzes were realized using Fisher's exact test for expression data and Qui square test for genomic data. Both analyzes were conducted using GraphPad Prism software v. 5. Our results demonstrate that the lack of FUT3 expression in breast tissues is related to the presence of IDC in Brazilian patients. No expression of FUT3 was more frequent in patients with large neoplastic lesions and tumors that do not express the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Genomic analyzes showed that two variations localized in *FUT3* promoter region are statistically associated to IDC, however the direct effect of these polymorphisms in FUT3 enzyme expression is still to be evaluated. The T allele of rs73920070 (-6933 C> T) SNP is associated to the neoplasia absence while the T allele of rs2306969 (-6951 C> T) SNP is associated to IDC presence in Brazilian northeastern population.

Keywords: FucT-III; Invasive Ductal Carcinoma; Gene Promoter; SNP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em mulheres, exceto pele não melanoma.....	p. 14
Figura 2 – Classificação histológica do câncer de mama.....	p. 16
Figura 3 – Tipos de N-glicanos.Cada N-glicano contém um núcleo comum Man3GlcNAc2Asn.....	p. 20
Figura 4 – Modelo simplificado de mucina secretada. A região VNTR (do inglês variable number of tandem repeat) rica em serina, treonina e prolina é altamente O-glicosilada e o peptídeo assume a conformação “escova de garrafa”	p. 21
Figura 5 – Representação esquemática do gene FUT3. Em vermelho estão sinalizadas as posições dos sítios de reconhecimento para o fator de transcrição AP1.....	p. 25
Figura 6 – Estrutura esquemática dos tetrassacarídeos Sialil Lewis X (sLe ^x) e Sialil Lewis A (sLe ^a).....	p. 28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos tumores mamários de acordo com o sistema TNM.....	p. 17
Quadro 2 – Classificação molecular dos tumores mamários de acordo com a 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2013).....	p. 18
Quadro 3 – Lista de algumas glicoproteínas utilizadas como biomarcadores no câncer aprovadas pela FDA (do inglês US Food and Drug Administration).....	p. 23
Quadro 4 – Recomendações para a utilização de biomarcadores (glicoconjugados) tumorais no câncer de mama. Antígeno do câncer (do inglês <i>cancer antigen</i>).....	p. 24
Quadro 5 – Estrutura e função dos Antígenos de Lewis produzidos pela ação da enzima FUT3.....	p. 27

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP – Alfa-fetoproteína
AFP-L3 – Alfa-fetoproteína isoforma 3
Apo2L/TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Asn – Asparagina
Asp – Aspartato
CA – Antígeno do câncer (do inglês *cancer antigen*)
CDI – Carcinoma ductal invasivo
CDIS – Carcinoma ductal *in situ*
CEA – Antígeno carcinoembrionário (do inglês *carcinoembryonic antigen*)
CLI – Carcinoma lobular
CLIS – Carcinoma lobular *in situ*
CTC – Célula tumoral circulante
EMT – Transição epitelial-mesenquimal (do inglês *epithelial-mesenchymal transition*)
EUA – Estados Unidos da América
FUT – Fucosiltransferase
Gal – Galactose
GalNAc – N-acetilgalactosamina
GDP – Guanosina difosfato (do inglês *guanosine diphosphate*)
GHN – Grau Histológico de Nottingham
Glc – Glicose
GlcNAc – N-acetilglicosamina
HCC – Carcinoma hepatocelular (do inglês *hepatocellular carcinoma*)
HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HNF1 α – Fator nuclear de hepatócitos 1 alfa (do inglês *hepatic nuclear factor 1 alpha*)
IL – Interleucina
Kb – Quilobases (do inglês *kilobases*)
Le^a – Antígeno de Lewis A
Le^b – Antígeno de Lewis B
Le^y – Antígeno de Lewis Y
Le^x – Antígeno de Lewis X
Man – Manose
mm – milímetro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger ribonucleic acid*)

NK – *Natural killer*

OST – Oligossacarídeotransferase

pb – pares de base

ppGalNAcT – N-acetilgalactosaminiltransferase

RE – Receptor de estrógeno

RE-Golgi – Retículoendoplasmático-Complexo de Golgi

RNAi – Ácido ribonucleico de interferência (do inglês *ribonucleic acid interference*)

RP – Receptor de progesterona

Ser – Serina

sLe^a – Antígeno sialil Lewis A

sLe^x – Antígeno sialil Lewis X

TβR – Receptor do TGF-β

TGF-β – Fator de crescimento transformante beta (do inglês *transforming growth factor beta*)

Thr – Treonina (do inglês *threonine*)

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)

UDP – Uridina difosfato (do inglês *uridine diphosphate*)

VNTR – Repetições sequenciais de número variável (do inglês *variable number tandem repeat*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Câncer de Mama	14
2.1.1 Epidemiologia	14
2.1.2 Classificação Histológica	14
2.1.3 Graus Histológicos	16
2.1.4 Classificação TNM.....	17
2.1.5 Classificação molecular.....	17
2.2 Glicobiologia	18
2.2.1 Estrutura e função dos carboidratos	18
2.2.2 Ligações Glicosídicas.....	19
2.3 Glicoconjugados no câncer	22
2.4 Glicanos fucosilados	24
2.4.1 α -1,3/4-Fucosiltransferase (FUT3)	25
2.4.2 Antígenos de Lewis	26
2.4.3 FUT3 e o câncer	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 REFERÊNCIAS.....	32
5 ARTIGO.....	37
6 CONCLUSÕES	38
ANEXO 1	40

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tumor que mais acomete mulheres em todo mundo (INCA, 2014). No Brasil os tumores de mama são os mais incidentes entre as mulheres, quando excluídos do cálculo os casos de pele não melanoma (INCA, 2014), e sua mortalidade vem crescendo ao longo dos últimos 35 anos, tanto entre mulheres jovens, quanto em mulheres com mais de 50 anos (MARTINS et al., 2013). O aumento na mortalidade pelo câncer de mama pode ser explicado, em parte, pelo aumento da incidência da doença decorrente da adoção de um estilo de vida mais urbano pelas mulheres. Entretanto, maior acesso ao diagnóstico precoce e tratamento vem gerando ligeira redução no número de óbitos por câncer de mama nas capitais brasileiras, demonstrando sua importância para o controle da doença nos estágios iniciais (GIRIANELLI; GAMARRA; SILVA, 2014). Nesse contexto, a descoberta de novas moléculas de diagnóstico e prognóstico para o câncer de mama terá importância no manejo dos pacientes e visa contribuir para um melhor desfecho dos casos.

Dentre as moléculas utilizadas na caracterização patológica dos tumores, os glicoconjugados exercem papel-chave. A glicosilação é um mecanismo celular que se encontra alterado durante a transformação neoplásica, podendo ser resultante de modificações nos níveis de expressão de glicosiltransferases e glicosidases, dos nucleotídeos-açúcares doadores, bem como do comprometimento do complexo de Golgi (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012). A fucosilação representa uma das principais reações de glicosilação alteradas no câncer. Os glicanos fucosilados são sintetizados pela ação das Fucosiltransferases (FUTs), enzimas responsáveis por transferir resíduos de L-fucose da sua forma ativa, GDP-fucose, para o glicano aceptor. L-fucose α -ligada presente em células de câncer de mama está relacionada a sua adesão a componentes da matriz extracelular e às células endoteliais, em modelos *in vitro* (YUAN et al., 2008a).

O gene *FUT3* é responsável por codificar uma Fucosiltransferase com atividade α 1-3 e α 1-4 (FUT3), cujos principais produtos são os antígenos de Lewis (JAVAUD et al., 2003). Os produtos da ação da enzima FUT3, o antígeno sialil Lewis X (sLe^x) e seu isômero sialil Lewis A (sLe^a), são encontrados em altos níveis em tumores sólidos, dentre eles no câncer de mama (JESCHKE et al., 2005). Além disso, a ação dessa enzima foi relacionada à migração e invasão celular, transição epitelial-mesenquimal e disparo da citotoxicidade celular mediada por células *natural killer* em estudos *in vitro* em diferentes linhagens de células tumorais (HIGAI; ICHIKAWA; MATSUMOTO, 2006; HIRAKAWA et al., 2014; OHYAMA et al., 2002; SILSIRIVANIT et al., 2013; WAGNER et al., 2007). Devido a sua participação em

mecanismos pró- e anti-tumorais e a escassez de estudos *in vivo* avaliando a expressão dessa enzima e a células neoplásicas, novos estudos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar o papel dessa enzima em células transformadas, em particular no câncer de mama.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer de Mama

2.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é o tumor maligno que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tendo atingido cerca de 1,67 milhões de mulheres no ano de 2012 (INCA, 2014). Nos EUA estimou-se para o ano de 2014 uma incidência de 62.570 novos casos de carcinoma mamário *in situ* e 232.670 novos casos de carcinoma mamário invasivo que culminariam em 40.430 mortes, sendo a segunda neoplasia que mais mata nesse país (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). No Brasil, no mesmo período, ele representou 20,8% dos casos de câncer em mulheres, quando excluídos do cálculo os casos de câncer de pele não-melanoma (Figura 1). Em Pernambuco estimou-se para 2014 um total de 2.450 novos casos de câncer de mama, representando uma taxa de 51,64 casos/100 mil habitantes (INCA, 2014).

	Localização primária	casos	%
 Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em mulheres, exceto pele não melanoma. Fonte: Adaptado do INCA (2014).

2.1.2 Classificação Histológica

Devido a grande heterogeneidade, várias classificações para o câncer de mama foram estabelecidas com o objetivo de melhor entender o prognóstico da doença e seu manejo terapêutico (MALHOTRA et al., 2010). A classificação histológica baseia-se nas características celulares e teciduais da lesão. Nesta o câncer de mama é subdividido em carcinomas *in situ*, que se restringem ao ducto ou lóbulo afetado, e em carcinomas invasivos, onde ocorre a infiltração dos tecidos adjacentes por células tumorais, apresentando este um maior poder metastático (LAKHANI et al., 2012).

As lesões mamárias *in situ* são subclassificadas em ductais e lobulares. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é caracterizado por uma proliferação de células epiteliais neoplásicas restrita a estrutura parenquimatosa do ducto, sem que ocorra invasão do estroma através da membrana basal. Quando comparado ao carcinoma lobular, o CDIS apresenta células ligeiramente maiores e mais coesas. O CDIS pode ainda ser subclassificado de acordo com a morfologia celular, arquitetura e presença/ausência de necrose (NHSBSP, 2005). O carcinoma lobular *in situ* (CLIS), se desenvolve nos lóbulos mamários mantendo sua arquitetura, sem invasão do estroma. É constituído por células pequenas e regularmente espaçadas, que apresentam citoplasma delgado e alta relação núcleo-citoplasma (COCQUYT; BELLE, 2003). Há ainda outras lesões não-invasivas menos frequentes, tais como a doença de Paget do mamilo, caracterizada por presença de células tumorais na epiderme do mamilo, e o carcinoma microinvasivo, definido por extensas lesões de CDIS que contêm um ou mais focos de infiltrações do estroma que não ultrapassem 1 mm de diâmetro (NHSBSP, 2005).

Dentre os tumores invasivos de mama o carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tumor mais comum, correspondendo a 75-80% dos casos, caracterizado como um grupo heterogêneo de tumores sem características histológicas específicas (JEMAL et al., 2009; OLIVEIRA; SILVA, 2008). Pacientes com CDI apresentam normalmente um maior envolvimento linfático e pior prognóstico que aquele verificado em pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (ABREU; KOIFMAN, 2002). O carcinoma lobular invasivo (CLI) é formado por células pequenas e regulares idênticas às encontradas no CLIS. Essas células encontram-se dissociadas umas das outras ou formando fileiras. O carcinoma tubular apresenta estruturas tubulares formadas por monocamadas de células tumorais dispostas em um estroma fibrocelular ou fibroelástico. Já o carcinoma cribiforme invasivo apresenta estruturas em formato de crivo. O carcinoma mucinoso por sua vez é composto por ilhas de células transformadas rodeadas por mucina (NHSBSP, 2005). Outros tipos menos comuns de lesões invasivas são o carcinoma com elementos medulares, metaplásico, apócrino, micropapilar invasivo e papilar invasivo (GOBBI, 2012) (Figura 2).

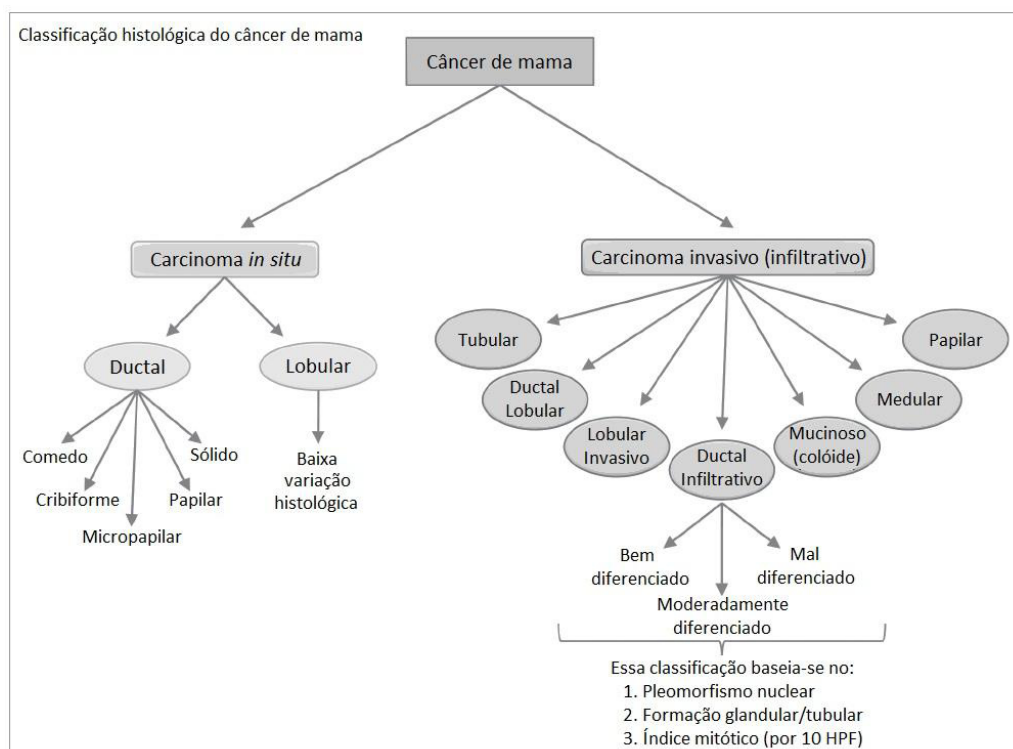


Figura 2: Classificação histológica do câncer de mama. HPF: Campo em ampliação máxima (do inglês *High Power Field*). Fonte: Adaptado de MALHOTRA et al. (2010).

2.1.3 Graus Histológicos

Carcinomas invasivos de mama são ainda classificados de acordo com seu grau de diferenciação. O grau histológico de Nottingham (GHN), revisado por Page, Ellis e Elston em 1995, reflete o quão próximo de um tecido epitelial normal está o tecido tumoral (RAKHA et al., 2010). Para tal, essa classificação leva em consideração o grau de formação de túbulos/glândulas, a atipia nuclear/pleomorfismo e o índice mitótico. Cada uma dessas características é graduada de 1 a 3 e a soma dos valores é utilizada para definir o grau histológico final. Totalizando valores de 3 a 5 o tumor recebe o grau histológico 1 ou bem diferenciado, apresentando portanto a maior homologia com o tecido normal. Valores de 6 a 7 caracterizam um tumor grau 2 ou moderadamente diferenciado e valores de 7 a 9 indicam um tumor grau 3 ou pouco diferenciado (NHSBSP, 2005). O GHN apresenta um grande valor prognóstico, equivalente ao obtido através da análise do status linfonodal. Tumores bem diferenciados (grau 1) são os que apresentam melhor prognóstico, onde quadros de recorrência e metástase são raros e quando ocorrem acontecem relativamente tarde. Já os tumores pouco diferenciados (grau 3) são os de prognóstico mais reservado, apresentando alto risco de recorrência e metástase precoces. Tais informações são de fundamental importância

para a definição do manejo terapêutico apropriado para diferentes pacientes com neoplasia mamária (RAKHA et al., 2010).

2.1.4 Classificação TNM

Além da classificação histológica, o câncer de mama pode ser classificado de acordo com a sua extensão anatômica através do sistema TNM. Esse sistema baseia-se em três características: a extensão do tumor primário (representado pela letra 'T' na sigla TNM); presença/ausência de metástase nos linfonodos regionais bem como sua extensão (representado pela letra 'N'); e presença/ausência de metástase distante (representado pela letra 'M'). Números acompanhando as letras indicam a extensão de cada uma das características, a letra 'X' indica que aquela característica não pode ser avaliada e a expressão 'is' significa *in situ* (Quadro 1) (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2009). O valor preditivo do sistema TNM no câncer de mama ainda é questionável e essa classificação não deve ser utilizada sozinha para definição de prognóstico e terapia (PARK et al., 2011).

QUADRO 1: Classificação dos tumores mamários de acordo com o sistema TNM

Classificação TNM	
Tamanho do tumor primário	
Tx	Tamanho do tumor não pode ser avaliado
Tis	Tumor (carcinoma) <i>is situ</i>
T1	Tumor com diâmetro ≤ 2 cm
T2	Tumor com diâmetro > 2 cm e ≤ 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor espalhado pela parede torácica e/ou pele ou carcinoma inflamatório
Metástase linfonodal	
Nx	Metástase linfonodal não pode ser avaliada
N0	Ausência de células tumorais nos linfonodos regionais
N1	Presença de células tumorais nos linfonodos axilares, mas não pressas aos tecidos vizinhos
N2	Presença de células tumorais nos linfonodos axilares presos a tecido vizinhos ou presença de células tumorais nos linfonodos mamários internos sendo ausentes nos linfonodos axilares
N3	Presença de células tumorais nos linfonodos localizados abaixo ou acima da clavícula ou presença de células tumorais nos linfonodos axilares e mamários internos
Metástase distante	
M0	Ausência de metástase distante
M1	Presença de metástase distante

Fonte: SOBIN, GOSPODAROWICZ & WITTEKIND (2009)

2.1.5 Classificação molecular

Embora os carcinomas mamários sejam rotineiramente classificados de acordo com sua histologia e extensão anatômica, tumores agrupados em um mesmo subtipo patológico podem apresentar evoluções e respostas às terapias diferentes. Com o objetivo de obter uma

classificação eficiente na definição de prognóstico, a 12ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2011) adotou a classificação molecular de carcinomas mamários. Esse sistema utiliza a técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) e do marcador nuclear de proliferação celular Ki-67. Os níveis de expressão desses marcadores diferenciam os tumores mamários em cinco classes: Luminal A, Luminal B HER-2 negativo, Luminal B HER-2 positivo, Superexpressão de HER-2 e Triplo-negativo ou *Basal like* (GOLDHIRSCH; WOOD, 2011). Após modificações realizadas pela 13ª edição desta mesma conferência ocorrida em 2013, a classificação molecular do câncer de mama passou a ser determinada de acordo com o Quadro 2 (SERRA et al., 2014). Tumores classificados como Luminal A apresentam o melhor prognóstico, com probabilidade de morte decorrente da doença inferior a 1% em dois anos e de 7,1% em 10 anos. O prognóstico mais reservado está relacionado a tumores triplo-negativos, com probabilidade de morte decorrente da doença de 17% em 10 anos (CAAN et al., 2014).

QUADRO 2: Classificação molecular dos tumores mamários de acordo com a 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2013)

Classificação Molecular do Câncer de Mama	
Luminal A	HER-2 negativo RE positivo RP positivo ($\geq 20\%$) e Ki-67 baixo ($< 14\%$)
Luminal B HER-2 negativo	HER-2 negativo RE positivo RP negativo ou positivo ($< 20\%$) ou Ki-67 alto ($> 14\%$)
Luminal B HER-2 positivo	HER-2 positivo RE positivo Qualquer valor de RP ou Ki-67
Superexpressão de HER-2	HER-2 positivo RE negativo RP negativo
Triplo-negativo ou <i>Basal like</i>	HER-2 negativo RE negativo RP negativo

Fonte: SERRA et al. (2014).

2.2 Glicobiologia

2.2.1 Estrutura e função dos carboidratos

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes do planeta formadas por uma ou mais unidades monossacarídicas. A grande variedade de carboidratos encontrada nos sistemas vivos é resultado de várias características intrínsecas dessa classe de biomoléculas, dentre elas a habilidade de formar ligações glicosídicas entre diferentes tipos de monossacarídeos, formando oligo- ou polissacarídeos com tamanhos variados, as

características estruturais das moléculas, os tipos de ligações glicosídicas e a presença/ausência e a posição das ramificações (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Envolvidos na transdução de informação bioquímica, os carboidratos apresentam, além das funções energética e estrutural, grande importância na comunicação entre as células e a matriz extracelular circundante. Na maioria dos casos os carboidratos encontram-se ligados covalentemente a proteínas ou lipídios, na forma de glicoconjugados. Glicoconjugados localizados na superfície celular apresentam importantes funções fisiológicas e patológicas, tais como o desenvolvimento embrionário, diferenciação e crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação hospedeiro-patógeno, resposta imunológica, tráfego intracelular, rigidez membranar, desdiferenciação e metástase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Moléculas secretadas pelas células e a própria matriz extracelular de organismos pluricelulares são ricas em glicanos e glicoconjugados (VARKI et al., 2009).

A maioria dos glicoconjugados localizados na superfície celular ou secretados por organismos eucarióticos são sintetizados e processados pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi (RE-Golgi), porém algumas estruturas podem ser sintetizadas no citoplasma ou na própria membrana plasmática. As reações de glicosilação utilizam formas ativadas de monossacarídeos, geralmente açúcares ligados a nucleotídeos, como doadores para a ação das glicosiltransferases e glicosidases, enzimas responsáveis por inserir e retirar açúcares de proteínas e lipídeos, respectivamente. Esses doadores são, na grande maioria dos casos, sintetizados no citoplasma e transportados ativamente via bicamada lipídica para o lúmen do RE-Golgi. A ação sequencial de várias glicosiltransferases gera o glicano final (VARKI et al., 2009).

2.2.2 Ligações Glicosídicas

Nos glicoconjugados, onde as glicoproteínas são os principais representantes, os oligossacarídeos podem formar ligações glicosídicas de duas formas diferentes, formando N- ou O-glicanos.

2.2.2.1 N-glicanos

N-glicanos são oligossacarídeos que se ligam via N-acetilglicosamina a porção amida da cadeia lateral do resíduo de Asparagina (Asn), localizada no domínio Asp-X-Ser/Thr, sendo X qualquer aminoácido, exceto Prolina (Asn: Asparagina, Ser: Serina, Thr:

Treonina)(GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). N-glicanos apresentam o núcleo comum $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ (Man: manose, GlcNAc: N-acetilglicosamina), sendo classificados em três tipos básicos: oligomanose, complexo e híbrido. Oligossacarídeos N-ligados do tipo oligomanose são compostos apenas por resíduos de manose ligados ao núcleo comum. N-glicanos complexos são constituídos por antenas ligadas ao núcleo comum, onde cada antena se inicia com uma N-acetilglicosamina. Os híbridos, por sua vez, apresentam apenas manoses ligadas a manose $\alpha 1-6$ e uma ou duas antenas ligadas a uma manose $\alpha 1-3$ do núcleo (Figura 3) (VARKI et al., 2009).

A síntese dos N-glicanos se inicia na face citoplasmática do retículo endoplasmático, ancorada no precursor lipídico dolicol-fosfato. Inicialmente ocorre a transferência de uma N-acetilglicosamina-fosfato da UDP-GlcNAc para o dolicol-fosfato, originando o dolicol-pirofosfato-N-acetilglicosamina. A partir deste produto, outros monossacarídeos são adicionados ao precursor ainda na face citoplasmática do retículo endoplasmático até a formação de um glicano contendo duas N-acetilglicosaminas e cinco manoses. Essa estrutura sofre então um “flip” sendo transferida da face citoplasmática para o lúmen do retículo endoplasmático onde continua a sofrer a ação de glicosiltransferases. À medida que o núcleo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ é gerado (Glc: Glicose), o glicano é transferido do dolicol para o resíduo de asparagina da sequência Asn-X-Ser/Thr da proteína pela enzima oligossacarídeotransferase (OST). A glicoproteína em formação sofre ainda a ação de glicosiltransferases e glicosidases no RE e no complexo de Golgi nos chamados processamentos precoces e tardios e maturação, até originar o N-glicano final (VARKI et al., 2009).

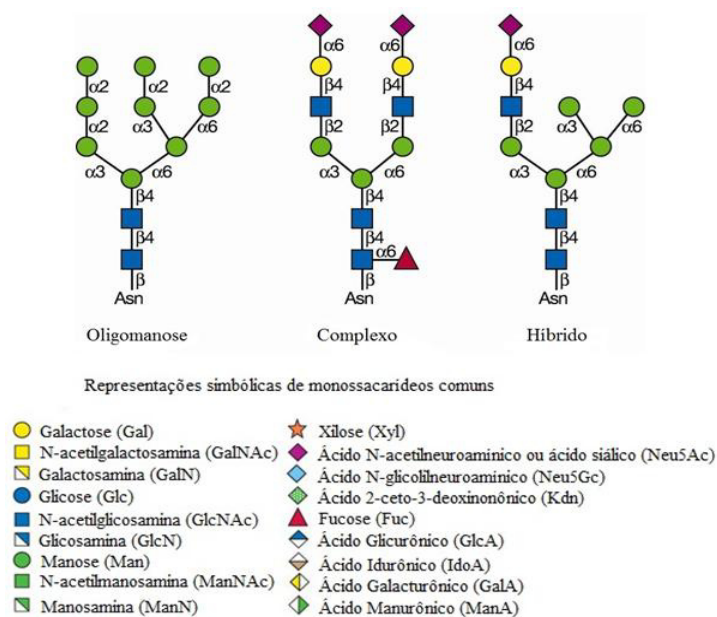


FIGURA 3: Tipos de N-glicanos. Cada N-glicano contém um núcleo comum $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$. Fonte: Adaptado de VARKI et al.

2.2.2.2 O-glicanos

Glicoproteínas O-ligadas são estruturas formadas pela ligação do C1 de uma N-acetilgalactosamina (GalNAc) a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina na cadeia polipeptídica (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

As mucinas são as principais glicoproteínas que apresentam glicanos O-ligados. Elas apresentam regiões ricas em resíduos de serina e treonina aceptores de O-glicanos, denominadas “repetições sequenciais de número variável” (do inglês *variable number of tandem repeat* ou VNTR). As VNTRs geralmente apresentam-se ricas em prolina, aminoácido que parece facilitar a adição da GalNAc. Devido à alta glicosilação no domínio VNTR, as mucinas adquirem uma conformação do tipo “escova de garrafa”. Domínios ricos em cisteína e o domínio D, região semelhante ao fator de von Willebrand, também estão presentes na estrutura das mucinas, sendo responsáveis pela polimerização das mesmas. (Figura 4). As mucinas compõem secreções mucosas ou são encontradas como glicoproteínas transmembrana presentes na superfície celular. Mucinas transmembrana estão envolvidas na transdução de sinal, adesão célula-célula ou em funções antiadesivas. As mucinas presentes em secreções são responsáveis por conferir alta viscosidade ao muco e podem ser poliméricas, denominadas mucinas formadoras de gel, sendo sintetizadas principalmente por células caliciformes do trato traqueobrônquico, gastrointestinal e geniturinário. Já as mucinas monoméricas, mucinas solúveis, podem ser sintetizadas por uma variedade de células epiteliais (VARKI et al., 2009).

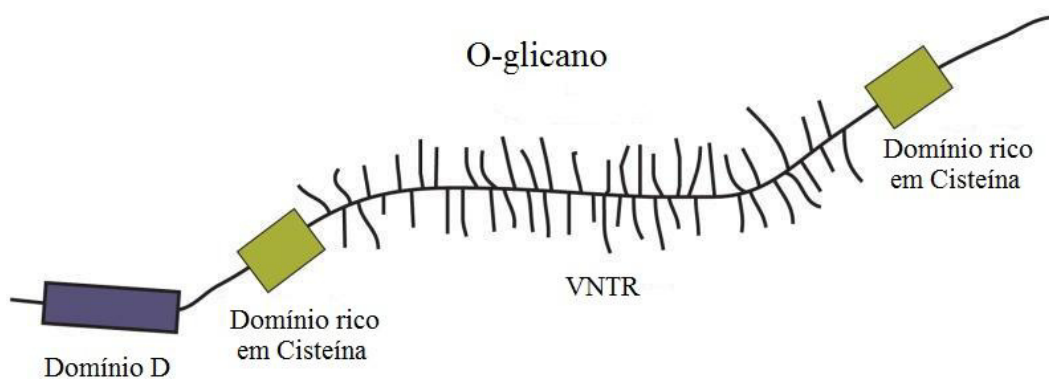


Figura 4: Modelo simplificado de mucina secretada. A região VNTR (do inglês *variable number of tandem repeat*) rica em serina, treonina e prolina é altamente O-glicosilada e o peptídeo assume a conformação “escova de garrafa”. Adaptado de VARKI et al. (2009).

A O-glicosilação ocorre basicamente no complexo de Golgi (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). A primeira etapa representa a transferência da N-acetilgalactosamina da UDP-GalNAc para a serina ou treonina aceptora, por ação da enzima

peptídeo-N-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAcT) (VARKI et al., 2009). Após a adição do primeiro resíduo de GalNAc, a elongação das cadeias de O-glicanos pode ocorrer pela adição de outros carboidratos, tais como galactose, fucose, N-acetilglicosamina e ácido siálico, por ação de várias enzimas, formando diferentes núcleos (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

2.3 Glicoconjugados no câncer

A expressão dos glicoconjugados muda de acordo com as condições celulares. A alteração no padrão de glicosilação é uma característica marcante do fenótipo tumoral, fato comprovado inicialmente por Meezan e colaboradores em 1969, demonstrando que fibroblastos saudáveis apresentavam uma membrana glicoprotéica menor que os respectivos homólogos transformados (DUBE; BERTOZZI, 2005). As alterações podem ocorrer em qualquer tipo de glicoconjugado e podem ser resultantes de modificações nos níveis de expressão de glicosiltransferases e glicosidases, dos nucleotídeos-açúcares doadores, bem como do comprometimento do complexo de Golgi (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012).

Alterações na diversidade de glicanos em um tecido ou mesmo no soro de pacientes com neoplasias vêm sendo analisadas na busca de novos marcadores tumorais. Biomarcadores são características biológicas objetivamente medidas e avaliadas que indicam processos biológicos normais ou patogênicos (BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001). Os biomarcadores podem ser utilizados na determinação do risco de desenvolvimento de uma doença, no diagnóstico inicial, estadiamento, monitoramento da progressão da doença e na avaliação da resposta a uma intervenção terapêutica (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012).

Estudos de glicômica de tumores apresentaram biomarcadores glicanos que hoje são utilizados na clínica para o diagnóstico e acompanhamento da progressão tumoral (Quadro 3) (KIM; MISEK, 2011). Dentre eles está a alfa-fetoproteína (AFP), glicoproteína sintetizada principalmente pelo saco vitelino, trato gastrointestinal e fígado durante o desenvolvimento fetal que tem sua produção drasticamente reduzida após o nascimento. A AFP vem sendo utilizada como biomarcador para o carcinoma hepatocelular (HCC), estando relacionada a características clínico-patológicas desse tipo tumoral, tais como estadiamento TNM, grau histológico e tamanho do tumor. Por ser encontrada em altas concentrações tanto no HCC quanto em doenças benignas do fígado, atualmente a utilização da AFP como biomarcador vem sendo substituída pela avaliação da sua variante fucosilada AFP-L3, isoforma da AFP

unicamente produzida por células tumorais. Quando associada com a pesquisa da proteína GP-73, a dosagem de AFP-L3 sérica apresenta sensibilidade, especificidade e acurácia de 94.0 %, 93.1 % e 93.3 %, respectivamente, para o diagnóstico do HCC (XU et al., 2014).

Quadro 3: Lista de algumas glicoproteínas utilizadas como biomarcadores no câncer aprovadas pela FDA (do inglês *US Food and Drug Administration*)

Biomarcador	Glicosilação	Fonte	Tumor
CA15.3	Sim	Soro	Mama
CA27-29	Sim	Soro	Mama
HER2/NEU	Sim	Soro	Mama
Fibrina/FDP	Sim	Urina	Bexiga
Antígeno Carcinoembrionico (CEA)	Sim	Soro	Cólon, mama, pulmão, pâncreas
Receptor do fator de crescimento epidérmico	Sim	Tecido	Cólon
CA19-9	Sim	Soro	Pâncreas
KIT	Sim	Tecido	Gastrointestinal
α -fetoproteína(AFP)	Sim	Soro	Fígado, testículo
Gonadotrofina coriônica humana - β	Sim	Soro	Testículo
Tiroglobulina	Sim	Soro	Tireóide
CA125	Sim	Soro	Ovário
Antígeno próstata-específico (PSA)	Sim	Soro	Próstata

CA: Antígeno do câncer (do inglês *cancer antigen*); FDP: Proteína de degradação de fibrina (do inglês *fibrin degradation protein*). Fonte: Adaptado de KIM & MISEK (2011).

Outro exemplo de glicoconjugado utilizado na prática clínica é o CA19-9, o único biomarcador sérico aprovado para o câncer de pâncreas. É constituído pelo antígeno de Lewis a (Le^a) sialilado e também se encontra elevado no soro de pacientes com doenças benignas do pâncreas (pancreatite e colestases). Por apresentar várias características que podem torná-lo um biomarcador útil na prática clínica, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de contornar a sua baixa especificidade. A dosagem deste biomarcador em momentos clinicamente relevantes para o paciente com câncer de pâncreas pode ter uma utilidade potencial no seu manejo (HUMPHRIS et al., 2012).

No câncer de mama alguns biomarcadores glicanos já têm seu uso recomendado na prática clínica (Quadro 4). O CA15-3 é uma glicoproteína transmembrana codificada pelo gene MUC-1 e relacionada à adesão celular a matriz extracelular. CA15-3 encontra-se elevado em pacientes com metástase distante, mas raramente altos níveis desse biomarcador são encontrados em pacientes com estágios precoces da doença. Níveis pré-cirúrgicos anormais de CA15-3 estão relacionados ao aumento no risco de recorrência e morte (SANDRI et al., 2012).

Assim como o CA15-3, o biomarcador CA27-29 é uma glicoproteína relacionada ao gene MUC-1 e utilizada como biomarcador no carcinoma mamário. Contudo esta glicoproteína é altamente heterogênea, podendo ser encontradas com alterações em seu glicocódigo em

diferentes pacientes ou em um mesmo paciente em diferentes estágios do câncer de mama. O CA27-29 se mostrou mais sensível que o CA15-3 quando utilizado para estadiamento do câncer de mama (GION et al., 2001).

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína de alto peso molecular localizada na superfície celular cujos níveis séricos encontram-se elevados em tumores malignos de cólon, mama, pulmão, fígado, dentre outros, mas não em doenças benignas. No câncer de mama os níveis de CEA diminuem após a retirada cirúrgica do tumor e após a quimioterapia e níveis mais elevados são encontrados em pacientes com comprometimento linfonodal (FARIDI et al., 2014). Níveis elevados de CA15-3 e CEA estão relacionados aos subtipos luminais do câncer de mama e valores maiores de CA15-3 estão correlacionados a metástase óssea (GENG et al., 2015).

Quadro 4: Recomendações para a utilização de biomarcadores (glicoconjugados) tumorais no câncer de mama

Biomarcador	Recomendação
CA15-3 e CA27-29	Não há dados suficientes que suportem sua utilização na triagem, diagnóstico ou estadiamento do câncer de mama, assim como para detectar recorrência após terapia primária. Recomendado para o monitoramento de pacientes com metástase distante em terapia ativa, sempre associado ao diagnóstico por imagem, histórico e exames físicos.
CEA	Não é recomendado seu uso para triagem, diagnóstico ou estadiamento do câncer de mama, assim como para detectar recorrência após terapia primária. Recomendado para o monitoramento de pacientes com metástase distante em terapia ativa, sempre associado ao diagnóstico por imagem, histórico e exames físicos.

CA: Antígeno do câncer (do inglês *cancer antigen*); CEA: Antígeno Carcinoembrionário (do inglês *carcinoembryonic antigen*). Fonte: Adaptado de HARRIS et al. (2007).

2.4 Glicanos fucosilados

A fucosilação representa um dos principais tipos de glicosilação alterados no câncer. Em 1979, Baumann e colaboradores relataram diferenças qualitativas e quantitativas no padrão de fucosilação dos glicolipídeos entre células de hepatoma e hepatócitos normais de ratos (BAUMANN et al., 1979).

Os glicanos fucosilados são sintetizados pela ação das fucosiltransferases (FUTs), enzimas responsáveis por transferir resíduos de L-fucose da sua forma ativa, GDP-fucose, para o glicano aceptor (MIYOSHI; MORIWAKI; NAKAGAWA, 2008). Até o momento treze genes codificadores de fucosiltransferases foram identificados no genoma humano, denominados

respectivamente *FUT1* a *FUT11*, *POFUT1* e *O-FUT2*, onde apenas os genes *FUT10*, *FUT11* e *O-FUT2* não tiveram suas funções estabelecidas (BECKER; LOWE, 2003).

2.4.1 α -1,3/4-Fucosiltransferase (FUT3)

O gene *FUT3* é responsável por codificar uma fucosiltransferase com atividade α 1-3 e α 1-4, estando localizado no braço curto do cromossomo 19, juntamente com os genes *FUT5* e *FUT6*, formando um *cluster* de aproximadamente 35 quilobases (Kb)(JAVAUD et al., 2003). O gene é constituído pelos éxons A, B e C, que apresentam 81, 541 e 1976 pares de base (pb) respectivamente, estando a região codificadora totalmente inserida no exon C. Devido ao *splicing* alternativo, quatro diferentes transcritos do gene *FUT3* são encontrados em diferentes tecidos, todos iniciando no éxon A, onde o transcrito mais abundante apresenta 2,37 Kb. A região promotora do gene *FUT3* apresenta três regiões definidas, a primeira porção que representa os elementos promotores basais, seguida de uma região que possui elementos de potencialização da expressão e uma terceira região que apresenta elementos de forte regulação negativa (DABROWSKA et al., 2005).

A presença de três sítios de ligação do fator de transcrição AP-1 na região representante dos elementos de potencialização do promotor do gene *FUT3* sugere que esse complexo protéico possa estar envolvido na regulação da sua expressão (Figura 5) (DABROWSKA et al., 2005). Outros fatores de transcrição já demonstraram influência sobre a expressão do *FUT3*, tais como HNF1 α em células hepáticas e pancreáticas (LAUC et al., 2010), p53 em células de adenocarcinoma colorretal (KATKOORI et al., 2012), c-Myc em células de câncer de cólon (SAKUMA; AOKI; KANNAGI, 2012). As citocinas pro-inflamatórias também exercem papel regulatório sobre a expressão gênica do *FUT3*, sendo, entretanto, sua ação citocina-específica e tecido-específica. A IL-8 e o TNF- α promovem o aumento da expressão do gene *FUT3* em células de mucosa brônquica humana (GROUX-DEGROOTE et al., 2008) e em linhagem celular de carcinoma mucoepidermóide pulmonar (ISHIBASHI et al., 2005), respectivamente, enquanto a IL-1 β e a IL-6 promovem a redução da sua expressão em células humanas de câncer gástrico (PADRÓ; MEJÍAS-LUQUE; COBLER, 2011).

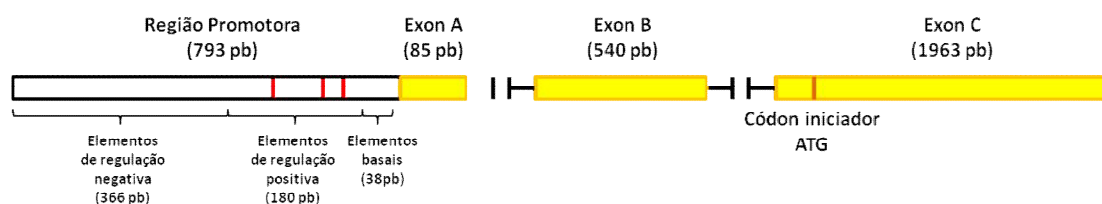


Figura 5: Representação esquemática do gene *FUT3*. Em vermelho estão sinalizadas as posições dos sítios de reconhecimento para o fator de transcrição AP1. pb: pares de base.

Serpa e colaboradores (2006) demonstrou que a expressão do gene *FUT3* e sua atividade $\alpha(1,4)$ fucosiltransferase em linhagens celulares de carcinoma gástrico é fortemente regulada pelo grau de metilação da sua região promotora. Tratamento com 5-aza-2'deoxicitidina, agente desmetilante, aumentou em 294,3 vezes os níveis do mRNA do *FUT3* na linhagem celular MKN45 e conseqüentemente a atividade enzimática $\alpha(1,4)$ fucosiltransferase, demonstrando que a expressão do gene *FUT3* depende da hipometilação da sua região promotora (SERPA et al., 2006).

No banco de dados dbSNP *Short genetic variations* do NCBI estão registrados, até o momento, 607 variações de base única em toda região do gene *FUT3* (SHERRY et al., 2001). Mutações na região codificante do gene causam, de maneira geral, a produção de enzimas inativas ou com atividade reduzida, existindo poucas exceções onde a atividade é mantida (SOEJIMA et al., 2009).

A enzima α -1,3/4-Fucosiltransferase é uma glicoproteína transmembrana do tipo II inserida na membrana do complexo de Golgi (COLOMB et al., 2014). Estruturalmente é constituída por uma pequena calda citoplasmática N-terminal, o domínio transmembranar, o domínio catalítico orientado para o lúmen do complexo de Golgi e uma haste ligando o domínio transmembranar ao domínio catalítico (VARKI et al., 2009). A enzima *FUT3* compartilha com as enzimas *FUT4* a *FUT7* e *FUT9* sua ação α 1,3-fucosiltransferase, mas não sua ação α 1,4 (BECKER; LOWE, 2003). As α 1,3FUTs apresentam grande homologia entre suas sequências de aminoácidos, estando a maior heterogeneidade localizada fora do domínio catalítico. A capacidade da *FUT3* de catalisar a transferência de um resíduo de L-fucose para a posição α -1,4 às cadeias oligossacarídicas do tipo I (Gal β 1,3GlcNAc) é atribuída a uma região N-terminal hipervariável localizada entre os resíduos 73 e 151, característica essa que a diferencia das outras FUTs do seu grupo. O resíduo adicional que confere essa habilidade é a Asp³³⁶ localizada próximo ao domínio catalítico. α -1,3/4-Fucosiltransferase apresenta 361 aminoácidos, contendo 2 pontes dissulfeto interligando os resíduos C⁸¹-C³³⁸ e C⁹¹-C³⁴¹ e 2 sítios de N-glicosilação, cuja glicosilação é necessária para a atividade enzimática total (VRIES et al., 2001).

2.4.2 Antígenos de Lewis

A enzima *FUT3* cataliza as reações de fucosilação α -1,3 e α -1,4, onde seus principais produtos são os antígenos de Lewis (Quadro 5) (BECKER; LOWE, 2003).

Quadro 5: Estrutura e função dos Antígenos de Lewis produzidos pela ação da enzima FUT3

Antígeno	Estrutura	Função	Referência
Le ^a	Galβ3[Fuca4]GlcNAc-R	Presentes em células endoteliais em contato direto com o ambiente externo e em eritrócitos. Responsáveis pelo sistema sanguíneo de Lewis. Possivelmente relacionados à interação das células com microrganismos.	MARIONNEAU et al., 2001
Le ^b	Fuca2Galβ3[Fuca4]GlcNAc-R		
Le ^y	Fuca2Galβ4[Fuca3]GlcNAc-R	Relacionado aos antígenos sanguíneos, porém não é encontrado na membrana dos eritrócitos. Apresenta ação angiogênica e procoagulante.	MARIONNEAU et al., 2001
Le ^x	Galβ4[Fuca3]GlcNAc-R	Relacionado aos antígenos sanguíneos, encontrado no soro e em tecidos tumorais.	SITTEL et al., 2000
sLe ^x	Siaα3Galβ4[Fuca3]GlcNAc-R	Ligantes reconhecidos pelas selectinas, atuando na adesão celular ao endotélio vascular.	KONSTANTOPOULOS; THOMAS, 2009
sLe ^a	Siaα3Galβ3[Fuca4]GlcNAc-R		

Legenda: Le^a- Lewis A; Le^b- Lewis B; Le^y- Lewis Y; Le^x- Lewis X; sLe^x- sialil Lewis X; sLe^a- sialil Lewis A; Gal- Galactose; Fuc- Fucose; GlcNAc- N-acetilglicosamina; Sia- Ácido siálico.

O tetrassacarídeos fucosilado sialil Lewis X (sLe^x) e seu isômero sialil Lewis A (sLe^a) são epítomos reconhecidos pelas E-selectinas que exercem papel fundamental na adesão inicial ao vaso e consequente extravazamento das células tumorais circulantes (CTC) da corrente sanguínea, etapa fundamental no mecanismo de metástase hematogênea (Figura 6) (BURDICK et al., 2012).

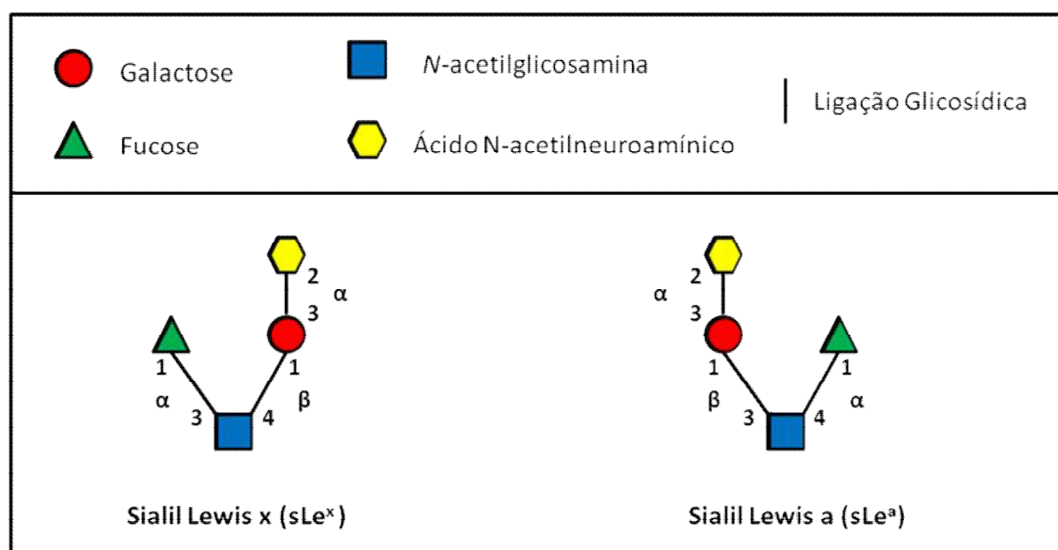


Figura 6: Estrutura esquemática dos tetrassacarídeos Sialil Lewis X (sLe^x) e Sialil Lewis A (sLe^a).

A expressão dos antígenos sLe^x e sLe^a está marcadamente elevada em tumores sólidos, tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CZERWINSKI et al., 2013), carcinomas de células renais (BORZYM-KLUCZYK; RADZIEJEWSKA, 2013); câncer de pulmão de células não-pequenas (KOMATSU et al., 2013), câncer de mama (JESCHKE et al., 2005), de colon (MARE et al., 2013), gástrico (KIM et al., 2011), pancreático (BALLEHANINNA; CHAMBERLAIN, 2012), ducto biliar (KIKKAWA et al., 2012) e de próstata (DIMITROFF et al., 2004). Os mecanismos que levam a essa alteração do perfil de carboidratos associada à transformação tumoral podem ser divididos em síntese incompleta (truncada) e neossíntese. Na síntese incompleta, a formação de carboidratos complexos de ocorrência natural nas células normais tende a ser impedida durante a transformação maligna, originando carboidratos mais simples. Na neossíntese a produção de carboidratos que alteram o perfil glicídico das células tumorais ocorre pela indução da expressão de algumas glicosiltransferases, resultando no aumento da produção de determinados carboidratos (KANNAGI, 2004).

2.4.3 FUT3 e o câncer

As fucosiltransferases são as enzimas-chave na regulação da síntese de estruturas fucosiladas, onde a atividade da enzima FUT3 exerce fundamental importância na síntese dos antígenos de Lewis. Foi demonstrado que nas linhagens de células pancreáticas tumorais SOJ-6 e BxPC-3 com altos níveis de sLe^a houve aumento na atividade enzimática α-1,4 na ordem de 350% e 100%, respectivamente, se comparadas a outras linhagens de células pancreáticas

tumorais com baixa expressão desse antígenos (MAS et al., 1998). Barthel e colaboradores (2009) observaram uma expressão aumentada do gene *FUT3* em tumores metastáticos de próstata. A transfecção da linhagem celular PC-3 com o gene *FUT3* induziu a síntese de sLe^x resultando em maior adesão celular às E-selectinas (BARTHEL et al., 2009). Através da utilização de RNAs de interferência (RNAi) quatro estudos independentes observaram a redução na expressão dos antígenos de Lewis após supressão do gene *FUT3* resultando em redução da adesão celular as E-selectinas (PADRÓ et al., 2011; YIN et al., 2010), inibição do crescimento celular, diminuição da habilidade de formar colônia (XIN et al., 2012) e redução da taxa de migração e invasão celular (SILSIRIVANIT et al., 2013) em linhagens celulares de câncer de próstata, gástrico e colangiocarcinoma.

O aumento na expressão da enzima α -1,3/4-Fucosiltransferase está relacionado a um maior poder de metástase das células tumorais de próstata (BARTHEL et al., 2009) e pâncreas (AUBERT et al., 2000). No câncer colorretal foi evidenciado o envolvimento da *FUT3* na ativação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) via TGF- β . A fucosilação dos receptores T β R I e T β R II parece ser essencial para a ativação da cascata intracelular desencadeada pelo TGF- β (expressão dos intermediários da cascata Smad 2, p38delta e HSP27) e consequente indução da EMT, resultando em maior migração celular e metástase (HIRAKAWA et al., 2014). A participação da *FUT3* nos processos de transição epitelial-mesenquimal e adesão das células tumorais ao endotélio vascular, mecanismos indispensáveis para o processo de metástase tumoral, corroboram para uma ação pró-tumoral dessa enzima. Entretanto altos níveis de sLe^x induzidos pela superexpressão do gene *FUT3* em células de melanoma e eritroleucemia resulta em disparo da citotoxicidade mediada por células NK e inibição da progressão tumoral através da interação desse antígeno com receptores lectina do tipo C (HIGAI; ICHIKAWA; MATSUMOTO, 2006; OHYAMA et al., 2002). Superexpressão do gene *FUT3* foi encontrada em linhagens celulares de câncer de cólon sensíveis a via de apoptose extrínseca mediada pela Apo2L/TRAIL, indicando sua possível importância para esse mecanismo de morte celular (WAGNER et al., 2007). Devido ao fato de que grande parte dos estudos relacionando a *FUT3* a progressão e metástase tumoral foram realizados em linhagens celulares e que essa metodologia não mimetiza eficientemente o microambiente e a heterogeneidade tumoral (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007), a real importância dessa enzima para tumores *in vivo* ainda deve ser investigada mais atentamente.

Estudando a expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de carcinoma mamário, Jeschke e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão do sLe^a está relacionada ao estágio tumoral e que os maiores níveis desse antígeno foram encontrados em tumores

metastáticos (JESCHKE et al., 2005). A remoção dos resíduos de L-fucose α -ligados por uma α -L-fucosidase em linhagem celular de câncer de mama reduziu o poder de adesão dessas células a componentes da matriz extracelular e reduziu sua ligação às células endoteliais de veia umbilical humana em condições estáticas e sob fluxo, demonstrando a importância desse carboidrato nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular e consequentemente para o processo de metástase (YUAN et al., 2008). Uma maior expressão da enzima FUT3 e do sLe^x é encontrada em tumores mamários negativos para o receptor de estrógeno quando comparados a tumores positivos para esse marcador. O antígeno sLe^x encontrado em maiores quantidades nesse subtipo tumoral compõem um glicolípídeo não reconhecido por E-selectinas (JULIEN et al., 2011). Aumento da fucosilação terminal é encontrado em células de câncer de mama quimiorresistentes à adriamicina comparadas a células não resistentes (MA et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel direto da enzima FUT3 em tumores mamários e mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de elucidar o real papel dessa enzima nos tumores *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a região promotora do gene *FUT3* e avaliar os níveis da enzima FUT3 em tecidos mamários de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama (CDI) vinculados ao Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e ao Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

3.2 Específicos

- Pesquisar a presença de polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora do gene *FUT3* em amostras de CDI, analisando a possível correlação entre o perfil gênico e a doença;
- Investigar os níveis da enzima FUT3 em tecidos mamários normais e com CDI;
- Analisar a correlação entre a expressão da enzima FUT3, o CDI e suas características histopatológicas e moleculares, dentre elas o tamanho do tumor, invasão linfonodal e expressão dos marcadores moleculares;
- Avaliar a possível relação entre o perfil gênico da região promotora do gene *FUT3* e a expressão da enzima FUT3.

4 REFERÊNCIAS

- ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.
- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 9, p. 1347–53, 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. **Cancer Facts and Figures**, v. 2014, p. 1–68, 2014.
- AUBERT, M. et al. Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by antisense FUT3 sequence. **International Journal of Cancer**, v. 88, p. 558–565, 2000.
- BALLEHANINNA, U. K.; CHAMBERLAIN, R. S. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. **Journal of gastrointestinal oncology**, v. 3, n. 2, p. 105–19, 2012.
- BARTHEL, S. R. et al. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, p. 19491–6, 2009.
- BAUMANN, H. et al. Neutral fucolipids and fucogangliosides of rat hepatoma HTC and H35 cells, rat liver, and hepatocytes. **Cancer Research**, v. 39, p. 2637–2643, 1979.
- BECKER, D. J.; LOWE, J. B. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, v. 13, n. 7, p. 41R–53R, 2003.
- BORZYM-KLUCZYK, M.; RADZIEJEWSKA, I. Changes of the expression of Lewis blood group antigens in glycoproteins of renal cancer tissues. v. 60, n. 2, p. 223–226, 2013.
- BURDICK, M. M. et al. Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. August, p. 1–11, 2012.
- CAAN, B. J. et al. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: Prognostication of short- and long-term outcomes. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 5, p. 725–734, 2014.
- COCQUYT, V.; BELLE, S. VAN. Lobular carcinoma in situ and invasive lobular cancer of the breast. p. 55–60, 2003.
- COLOMB, F. et al. Epithelial mucins and bacterial adhesion. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 40, p. 596–623, 2014.
- CZERWINSKI, M. J. et al. In vitro evaluation of sialyl Lewis X relationship with head and neck cancer stem cells. **Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 149, n. 1, p. 97–104, 2013.
- DABROWSKA, A. et al. Promoter analysis of the human alpha1,3/4-fucosyltransferase gene (FUT III). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1731, n. 1, p. 66–73, 2005.

DIMITROFF, C. et al. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. **Cancer research**, v. 64, p. 5261–5269, 2004.

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. 477–88, 2005.

FARIDI, S. et al. Role of serum carcinoembryonic antigen (CEA) as a tumor marker in breast cancer. **International Journal of Advanced Medical and Health Research**, v. 1, n. 2, p. 10–13, 2014.

GENG, B. et al. Association of CA 15-3 and CEA with clinicopathological parameters in patients with metastatic breast cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 3, n. 1, p. 232–236, 2015.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–47, 2011.

GION, M. et al. CA27. 29: a valuable marker for breast cancer management. A confirmatory multicentric study on 603 cases. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 355–363, 2001.

GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; SILVA, G. A. E. Os grandes contrastes na mortalidade por câncer do colo uterino e de mama no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 459–467, 2014.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89–95, 2001.

GROUX-DEGROOTE, S. et al. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. **The Biochemical journal**, v. 410, n. 1, p. 213–223, 2008.

HARRIS, L. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 33, p. 5287–312, 2007.

HIGAI, K.; ICHIKAWA, A.; MATSUMOTO, K. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, p. 1355–1363, 2006.

HIRAKAWA, M. et al. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. **British journal of cancer**, v. 110, n. 1, p. 156–63, 7 jan. 2014.

- HUMPHRIS, J. L. et al. The prognostic and predictive value of serum CA19.9 in pancreatic cancer. **Annals of oncology**, v. 23, n. 7, p. 1713–22, jul. 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.]. p. 1–124
- ISHIBASHI, Y. et al. Regulation of sialyl-Lewis x epitope expression by TNF- α and EGF in an airway carcinoma cell line. **Glycoconjugate journal**, v. 22, n. 1-2, p. 53–62, 2005.
- JAVAUD, C. et al. The fucosyltransferase gene family : an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. **Genetica**, v. 118, p. 157–170, 2003.
- JEMAL, A. et al. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 4, p. 1–25, 2009.
- JESCHKE, U. et al. Expression of Sialyl Lewis X , Sialyl Lewis a , E-Cadherin and Cathepsin-D in Human Breast Cancer : Immunohistochemical Analysis in Mammary Carcinoma In Situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis. **Anticancer Research**, v. 35, n. 3A, p. 1615–1622, 2005.
- JULIEN, S. et al. Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. **Cancer research**, v. 71, n. 24, p. 7683–7693, 2011.
- KANNAGI, R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression — The Warburg effect revisited. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, p. 353–364, 2004.
- KATKOORI, V. R. et al. Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e30020, 2012.
- KIKKAWA, S. et al. Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **International journal of proteomics**, v. 2012, p. 1–8, 2012.
- KIM, D. H. et al. The relationships between perioperative CEA, CA 19-9, and CA 72-4 and recurrence in gastric cancer patients after curative radical gastrectomy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 104, p. 585–591, 2011.
- KIM, E. H.; MISEK, D. E. Glycoproteomics-Based Identification of Cancer Biomarkers. **International Journal of Proteomics**, v. 2011, p. 1–10, 2011.
- KOMATSU, H. et al. Sialyl Lewis X as a predictor of skip N2 metastasis in clinical stage IA non-small cell lung cancer. **World journal of surgical oncology**, v. 11, p. 309, 2013.
- KONSTANTOPOULOS, K.; THOMAS, S. N. Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 177–202, 2009.
- LAKHANI, S. R. et al. Tumors of the Breast. In: **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4. ed. [s.l.] IARC, 2012. p. 1–112.
- LAUC, G. et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. **PLoS genetics**, v. 6, n. 12, p. e1001256, 2010.

- MA, H. et al. Functional roles of glycogene and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells. **IUBMB life**, v. 65, n. 5, p. 409–22, 2013.
- MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.
- MARE, L. et al. CA19.9 antigen circulating in the serum of colon cancer patients: Where is it from? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 4, p. 792–797, 2013.
- MARIONNEAU, S. et al. ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. **Biochimie**, v. 83, n. 7, p. 565–573, 2001.
- MARTINS, C. A. et al. Evolução da Mortalidade por Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Desafios para uma Política de Atenção Oncológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n. 3, p. 341–349, 2013.
- MAS, E. et al. Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. **Glycobiology**, v. 8, n. 6, p. 605–613, 1998.
- MIYOSHI, E.; MORIWAKI, K.; NAKAGAWA, T. Biological function of fucosylation in cancer biology. **Journal of biochemistry**, v. 143, n. 6, p. 725–9, 2008.
- NHS BREAST SCREENING PROGRAMME. **PATHOLOGY REPORTING OF BREAST DISEASE**. 3. ed. Wakefield: [s.n.]. p. 1–134
- OHYAMA, C. et al. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13789–94, 2002.
- OLIVEIRA, C. F. DE; SILVA, T. S. DA. Carcinoma invasivo da mama : do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. In: **Manual de Ginecologia**. 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 247–288.
- PADRÓ, M. et al. Down-regulation of FUT3 and FUT5 by shRNA alters Lewis antigens expression and reduces the adhesion capacities of gastric cancer cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1810, n. 12, p. 1141–9, 2011.
- PADRÓ, M.; MEJÍAS-LUQUE, R.; COBLER, L. Regulation of glycosyltransferases and Lewis antigens expression by IL-1 β and IL-6 in human gastric cancer cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 28, n. 2, p. 99–110, 2011.
- PARK, Y. et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1554–1560, 2011.
- RAKHA, E. A et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast cancer research**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010.
- SAKUMA, K.; AOKI, M.; KANNAGI, R. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial–mesenchymal transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 1–6, 2012.

SANDRI, M. T. et al. Prognostic role of CA15.3 in 7942 patients with operable breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 132, n. 1, p. 317–26, 2012.

SERPA, J. et al. Expression of Lea in gastric cancer cell lines depends on FUT3 expression regulated by promoter methylation. **Cancer letters**, v. 242, n. 2, p. 191–7, 2006.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 575–580, 2014.

SHERRY, S. T. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 308–311, 2001.

SILSIRIVANIT, A. et al. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. **Cancer science**, v. 104, n. 10, p. 1278–1284, 2013.

SITTEL, C. et al. Prognostic Factors of Recurrence in T1 and T2 Laryngeal Carcinoma. v. 67, n. June, p. 1012–1017, 2000.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **International Union against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumours**. 7. ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2009.

SOEJIMA, M. et al. Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. **Transfusion**, v. 49, n. 5, p. 959–66, 2009.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, p. 659–672, 2007.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

VRIES, T. DE et al. Fucosyltransferases: structure/function studies. **Glycobiology**, v. 11, n. 10, p. 119R–128R, 2001.

WAGNER, K. W. et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. **Nature medicine**, v. 13, n. 9, p. 1070–1077, 2007.

XIN, Y. et al. Transfection of miRNAs targeting the FUT3 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line KATO-III. **World Chinese Journal of Digestology**, v. 20, n. 25, p. 2341–2346, 2012.

XU, W.-J. et al. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 12, p. 12069–74, 2014.

YIN, X. et al. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 16, p. 2334–42, 2 nov. 2010.

YUAN, K. et al. Alterations in human breast cancer adhesion-motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying alpha-L-fucose moieties. **International journal of oncology**, v. 32, p. 797–807, 2008.

5 ARTIGO

Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter
and protein expression

Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento^{a,b,*}, Steffany de Almeida Ferreira^b, Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos^b, João Luiz Quirino da Silva-Filho^b, Bruno Trajano Barbosa^b, Matheus Filgueira Bezerra^b, Cíntia Renata Costa Rocha^{a,b}, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{a,b}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil.

Artigo publicado na revista “Experimental and Molecular Pathology” sob doi: 10.1016/j.yexmp.2015.08.015 (ANEXO 1)

6 CONCLUSÕES

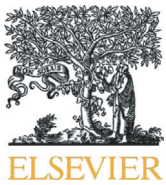
Nosso trabalho demonstrou que a ausência de expressão da enzima FUT3 pelo tecido mamário está associada ao carcinoma ductal invasivo de mama. A expressão da enzima FUT3 não foi relacionada ao grau histológico, invasão linfonodal ou expressão dos marcadores moleculares do tipo receptor de estrógeno, receptor de progesterona ou Ki-67 em pacientes com CDI, porém a não da expressão dessa enzima foi mais frequente em lesões maiores e tumores negativos para o HER-2. Estes dados nos levam a propor a hipótese ausência de FUT3 nos tumores mamários pode representar uma vantagem adaptativa adquirida pelas células tumorais, que resulta em um fenótipo imunoresistente, propiciando o estabelecimento do tumor primário. O poder metastático dos tumores mamários, relacionado a uma maior expressão de antígenos fucosilados, pode ser resultado do aumento na expressão de outras α -1,3-FUTs, tais como a FUT4.

Análise genômica da região promotora do gene *FUT3* em pacientes com CDI e controles saudáveis revelou a presença de duas variações associadas a essa neoplasia na população de Pernambuco, nordeste brasileiro. O SNP rs73920070 (-6933 C>T) se mostrou relacionado à proteção enquanto que o SNP rs2306969 (-6951 C>T) foi associado à susceptibilidade ao desenvolvimento de CDI. Predição *in silico* das possíveis alterações geradas nos sítios de ligação de fatores de transcrição mostrou que a presença do alelo minoritário T, em lugar do alelo C, no SNP rs73920070 resulta no ganho de dois potenciais sítios de ligação respectivamente para os fatores TFIID e GR- α . Em contrapartida, no SNP rs2306969, a presença do alelo minoritário T em lugar do alelo C, resultaria em perda de seis potenciais sítios de ligação respectivamente para os fatores TFII-I, STAT4, c-Est-1, Ebf-1, MAS e GR- α . O ganho de dois sítios de ligação de fatores de transcrição pelo genótipo rs73920070 (-6933 C>T) poderia contribuir para a maior expressão de FUT3, enquanto que a perda de seis sítios pelo genótipo rs2306969 (-6951 C>T) resultaria em menor ou ausência de expressão de FUT3. Esta hipótese busca relacionar os polimorfismos aos seus respectivos papéis na proteção e susceptibilidade ao carcinoma ductal invasivo de mama.

A continuidade deste trabalho avaliando o papel de FUT3 no câncer de mama deve ser realizada a fim de definir a importância desta enzima para o estabelecimento, progressão e metástase do tumor. Os efeitos de sua subexpressão na síntese dos antígenos de Lewis, no processo de transição epitelial-mesenquimal e na citotoxicidade mediada por células NK devem ser avaliados em células de câncer de mama. Análises dos padrões de expressão dessa enzima diretamente em pacientes com outros tipos tumorais também se fazem necessárias

para avaliar se o fenótipo observado nos sistemas *in vitro* corresponde ao que acontece nos sistemas biológicos. Os resultados do presente trabalho sugerem que subsequentes análises da influência direta dos polimorfismos rs73920070 (-6933 C>T) e rs2306969 (-6951 C>T) na expressão da enzima FUT3, e no desenvolvimento do câncer de mama, também merecem ser realizadas.

ANEXO 1



Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression



Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento^{a,b,*}, Steffany de Almeida Ferreira^b,
Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos^b, João Luiz Quirino da Silva-Filho^b, Bruno Trajano Barbosa^b,
Matheus Filgueira Bezerra^b, Cíntia Renata Costa Rocha^{a,b}, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{a,b}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2015

Received in revised form 7 August 2015

Accepted 24 August 2015

Available online 29 August 2015

Keywords:

FucT-III

Human mammary carcinoma

Protein expression

Single nucleotide polymorphism

Regulatory region

ABSTRACT

Fucosylated glycans synthesized by $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransferase (FUT3) enzyme play an important role in breast cancer prognosis and metastasis, being involved in the binding of circulating tumor cells to the endothelium and being related to tumor stage, metastatic potential and chemoresistance. Despite the pro-tumor action of this enzyme, studies have demonstrated its role in natural killer-induced cytotoxicity through the recognition of sialyl Lewis X by C-type lectin receptors and through extrinsic apoptosis pathway triggered by Apo2L-TRAIL. This study aimed to investigate the expression pattern of FUT3 in invasive breast carcinoma (IDC) from patients of Pernambuco state, Northeast of Brazil, and genotype FUT3 promoter region to identify possible SNPs that could be associated with variations in FUT3 expression. Immunohistochemistry assay was used to access the FUT3 expression in normal ($n = 11$) and tumor tissues ($n = 85$). DNA sequencing was performed to genotype the FUT3 promoter region in patients with IDC ($n = 109$) and healthy controls ($n = 110$). Our results demonstrated that the absence of FUT3 enzyme is related to breast's IDC. The non-expression of FUT3 was more frequent in larger lesions and also in HER2 negative IDC tumors. Genomic analysis showed that two variations localized in FUT3 promoter region are possibly associated with IDC. Our results suggest that minor allele T of SNP rs73920070 (–6933 C > T) confers protection whereas minor allele T of SNP rs2306969 (–6951 C > T) triggers susceptibility to IDC in the population of Pernambuco state, Northeast of Brazil.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most incident tumor among women worldwide, having affected 1.67 million women in 2012 (Ferlay et al., 2014). Although early diagnosis associated with new therapies had been giving the chance of cure for many breast cancer patients, oncology field is still far away to comprehend all factors that trigger and rule the disease development.

Fucosylated glycans play an important role in breast cancer prognosis and metastasis, being involved in the binding of circulating tumor cells to the endothelium (Yuan et al., 2008; Zen et al., 2008) and also related to tumor stage, metastatic potential (Jeschke et al., 2005) and chemoresistance (Ma et al., 2013).

Fucosyltransferases are a family of enzymes that catalyzes the L-fucose transfer from GDP-L-fucose to a nascent glycan (Miyoshi et al., 2008). There are 13 genes encoding fucosyltransferases in human genome which are called FUT1 to FUT11, POFUT1 and O-FUT2 (Becker and Lowe, 2003). FUT3 gene encodes a fucosyltransferase with $\alpha 1,3$ and $\alpha 1,4$ L-fucose bonding activity. This gene is localized in the short

arm of chromosome 19 and is formed by three exons, A, B and C (Kukowska-Latallo et al., 1990). The expression of FUT3 is dependent on its hypomethylation (Serpa et al., 2006) and is regulated by transcription factors, such as HNF1 α (Lau et al., 2010), p53 (Katkoori et al., 2012) and c-Myc (Sakuma et al., 2012), and interleukins IL-8, TNF- α (Groux-Degroote et al., 2008), IL-1 β and IL-10 (Padró et al., 2011b).

The mainly products of FUT3 enzyme are the Lewis antigens. Sialyl Lewis X (sLe^x) and its isomer sialyl Lewis A (sLe^a) are glycans, recognized by the E-selectins, involved in adhesion of tumor cells to the endothelium and consequent escape of these cells from blood stream, a crucial step in hematogenous metastasis (Burdick et al., 2012). Although the mechanism mediated by Lewis antigens and E-selectin represents an important aspect in tumor biology, FUT3 is also related to other pathways in neoplastic cells. In colorectal cancer, the fucosylation by FUT3 of T β R I and T β R II receptors is essential for epithelial–mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β (Hirakawa et al., 2014). However, tumor death pathways are also dependent on fucosylation. Overexpression of sLe^x in melanoma and erythroleukemia cell lines by FUT3 gene transfection leads to cytotoxicity mediated by natural killer cells through ligation to C type lectin receptors, such as CD94 (Higai et al., 2006;

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil.

Ohyama et al., 2002). *FUT3* is overexpressed in colorectal cell lines sensitive to extrinsic apoptosis pathway triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L-TRAIL). O-glycosylation of DR4 and DR5 receptors seems to be central to TRAIL signaling pathway (Wagner et al., 2007).

In spite of studies that had found a relationship between the expression of Lewis antigens and the metastatic spread of human breast cancers, indicating a pro-tumor action of *FUT3* processing (Listinsky et al., 2011), the importance of NK-induced cytotoxicity for antitumor efficacy against breast cancer cells suggests an involvement of this enzyme in antitumor pathways (Kajitani et al., 2012). In order to a better understanding of *FUT3* role in breast tumors this study aimed to investigate the expression pattern of *FUT3* enzyme in invasive breast carcinoma (IDC) samples from Pernambuco State, Northeast of Brazil. Genotype of *FUT3* promoter region was also performed to identify possible single nucleotide polymorphisms (SNPs) that could be associated with variations in *FUT3* tumors expression.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor samples of 127 patients diagnosed with breast invasive ductal carcinoma (IDC) from 2009 to 2014, were collected from the tissue bank of the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) and from the Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). The diagnosis of breast cancer was based on hematoxylin and eosin histopathology analyzed by two independent pathologists. Patients' clinical data were obtained from medical files and included age, tumor size, metastasis to regional lymph nodes and tumor staging. In the breast cancer patients' samples (127), 65 samples had DNA extraction and immunohistochemistry assay developed. Forty-four out of 127 samples had only DNA extracted while 20 out of 127 samples (not belonging to previous 44 sample group) were only immunohistochemistry assayed. DNA from 15 blood samples was obtained from the 44 sample's group for genotyping evaluation of germline or somatic origin of *FUT3* gene variations. Control samples included 11 normal breast tissues obtained from cosmetic surgery and 110 blood samples of cancer-free patients. This study was approved by the local Research Ethics Committee (CAAE 06586612.9.0000.5208 – No. 140.876) and all participants signed the written informed consent.

2.2. Immunohistochemistry assay

FFPE tissue samples from 85 IDC patients and 11 healthy controls were sliced in sections of 4 μ m and immunohistochemistry assay was performed according to Vasconcelos et al. (2013). Sections were deparaffinized in xylene and hydrated with decreasing ethanol concentration. Tissues were antigen retrieved with 10 mM citrate buffer (pH 6.0), followed by endogenous peroxidase blocking with methanolic H_2O_2 solution and finally incubated with 1% bovine serum albumin dissolved in phosphate buffered saline (PBS-BSA). Sections were incubated, separately, with primary antibodies: goat polyclonal antibody anti-estrogen receptor L-20, mouse monoclonal antibody anti-progesterone receptor AB-52, mouse monoclonal antibody anti-Ki-67 (all at 1:50 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), rabbit polyclonal antibody anti-c-erbB-2 (HER-2) oncoprotein (1:100, DAKO, Carpinteria, California) and rabbit polyclonal antibody anti-*FUT3* (1:200, SigmaAldrich, St. Louis, Missouri). Immunocomplex detection were done by the polymer-based detection system ADVANCE™ HRP kit (DAKO, Carpinteria, California) and the reaction was revealed with 3,3'-Diaminobenzidine (DAKO, Carpinteria, California) and counterstaining with hematoxylin (QEEL, São Paulo, São Paulo). Positive breast tissues for the corresponding antibody were used as internal

staining controls. Negative staining controls were prepared replacing the primary antibody for 1% PBS-BSA.

2.3. Immunohistochemistry analyzes

Tissues were analyzed using an image system coupled to an Eclipse 50i microscope (Nikon, Melville, New York). The estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression analyzes were conducted following the recommendations of the ASCO/CAP ER/PR guidelines (2010) (Hammond et al., 2010) and HER-2 expression was evaluated according to the ASCO/CAP HER2 guideline (2013) (Wolff et al., 2013). Ki67 expression was evaluated according to Fountzilas and colleagues (2012) (Fountzilas et al., 2012) and cases were considered positive when more than 14% of neoplastic cells nuclei expressed this protein. Tissue staining for *FUT3* was classified based on the percentage of stained cells and dichotomized in positive and negative groups, considering positive samples when more than 50% of neoplastic cells were reactive to *FUT3* antibody in at least 3 fields in a 100 $\times$ magnification (Uhlen et al., 2010).

2.4. DNA extraction

DNA was extracted from 109 FFPE tumor samples following an optimized protocol adapted from Ramalho et al. (2014). The FFPE tissues used on the DNA extraction were previously characterized by the pathologist as containing tumor cells in their majority. Ten FFPE tissue slices (2 μ m) from each sample were dried under vacuum and deparaffinized with 1 mL of xylene for 30 min at 55 °C under gentle stirring. After discard of previous xylene, deparaffinization was repeated. Ethanol (1 mL) was added to the sample, mixed by inversion and incubated at 55 °C for 5 min, followed by centrifugation at 14,000 g for 3 min. Ethanol was removed and ethanol/centrifuge process was repeated using 70% ethanol. Samples were dried under vacuum. After drying, deparaffinized tissue was digested with 400 μ L of cell lysis buffer (0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 1 M Tris), 36 μ L of 20% SDS solution, 24 μ L of proteinase K (20 mg/mL) and 480 μ L of deionized water at 65 °C for 18 h. Proteins were precipitated with 420 μ L of 5 M NaCl followed by centrifugation at 14,000 g for 20 min. Supernatant was transferred to a microtube containing 800 μ L of cold isopropyl alcohol. After centrifugation at 14,000 g for 30 min, supernatant was discarded and 500 μ L of ethanol was added and briefly mixed. Samples were centrifuged at 14,000 g for 15 min and the supernatant was carefully discarded. DNA was dried under vacuum, resuspended in 50 μ L of TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris.Cl, 1 mM EDTA) and stored at –20 °C until use. DNA quantification was performed by Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts). DNA was also extracted from blood samples of 109 health controls and 15 IDC patients. Extraction was performed with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) according to manufacturer's protocol.

2.5. *FUT3* promoter genotype

Regulatory region of *FUT3* gene was amplified by PCR and sequenced using the primers ProFUT3_fw (5'-CTGGGTCTGGTATGCAAT-3') and ProFUT3_rv (5'-GGTAGAATGGGATAACTT-3'). All PCR reactions were performed using Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Grand Island, New York) according to manufacturer's protocol. Each reaction contained 2 μ M of each primer, 0.2 μ M of each dNTP and 200 ng of DNA template for a final reaction volume of 25 μ L. Amplification conditions were 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 1 min and 72 °C for 45 s and a final step at 72 °C for 5 min. Amplification was confirmed through visualization of a 507 bp fragment after electrophoresis on 1% agarose gel at 100 V for 90 min, stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL). Amplicons' purification was performed using Exonuclease 1 and Shrimp alkaline phosphatase (USB, Cleveland,

Ohio). Fragments were sequenced using BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, California) according to manufacturer's protocol adapted for MegaBACE 500 system (General Electric, Fairfield, Connecticut). After precipitation with ammonia acetate and ethanol, DNA was resuspended in 10 µL of MegaBACE Loading Buffer (General Electric, Fairfield, Connecticut) and samples were injected for electrophoresis running and sequencing in MegaBACE 500 (General Electric, Fairfield, Connecticut). Nucleotide sequences were analyzed using the CLC Main Workbench v.6 software (Quiagen, Venlo, Netherlands).

2.6. Prediction of transcription factor binding sites

The *in silico* prediction of transcription factors whose binding sites could be formed or blocked by different *FUT3* promoter region genotypes was performed using Algggen Promo software, V 3.0.2.

2.7. Statistical analysis

Statistical association was analyzed using the nonparametric Chi-square test, for genotype data, and Fisher's Exact test, for expression data. *p* value (*p*), odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated. *p* < 0.05 was considered statistically significant. Student's *t*-test was used for analysis of variances' homogeneity. All Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism version 5.

3. Results

A total of 127 breast IDC patients and 121 health controls were included in this study. Clinical and histopathological data were collected from medical files and molecular expression pattern of classic breast tumor markers was assessed by immunohistochemistry assay for IDC samples. Mean age of IDC patients was 53.6 ± 14.1 (range 31–90) and health controls were 53.6 ± 13.3 (range 21–85), showing no statistically significant difference between the two groups (*p* = 0.8650, D'Agostino & Pearson omnibus normality test). IDC population had a predominance of tumors classified as G2 or G3 (94% of all cases) according to Modified Bloom–Richardson histological grade system (Lakhani et al., 2012). All other histopathologic parameters, such as tumor size, lymph node metastasis and molecular expression pattern, showed a homogeneous distribution.

From the 127 IDC samples, 85 were analyzed by immunohistochemistry assay. Normal ductal breast tissues obtained from 11 donors submitted to cosmetic surgery were used as immunohistochemistry assay controls. *FUT3* staining in positive tissues showed a granular cytoplasmic pattern (Fig. 1). Positive *FUT3* staining was more frequent in health breast tissues than in IDC tissues (*p* = 0.0034, OR = 7.55, 95% CI 1.97–28.93), suggesting an association of absent *FUT3* expression and IDC development (Table 1). Among IDC samples, no statistic significant differences were found between patients with different histological grades or lymph node metastasis status. However, tumor size analyzes demonstrated that non-expression of *FUT3* was more frequent in larger IDC tumors (*p* = 0.0116, OR = 10.22, 95% CI 1.23–84.74) and in HER-2 negative samples (*p* = 0.006, OR = 18.2, 95% CI 2.23–148.4) (Table 1).

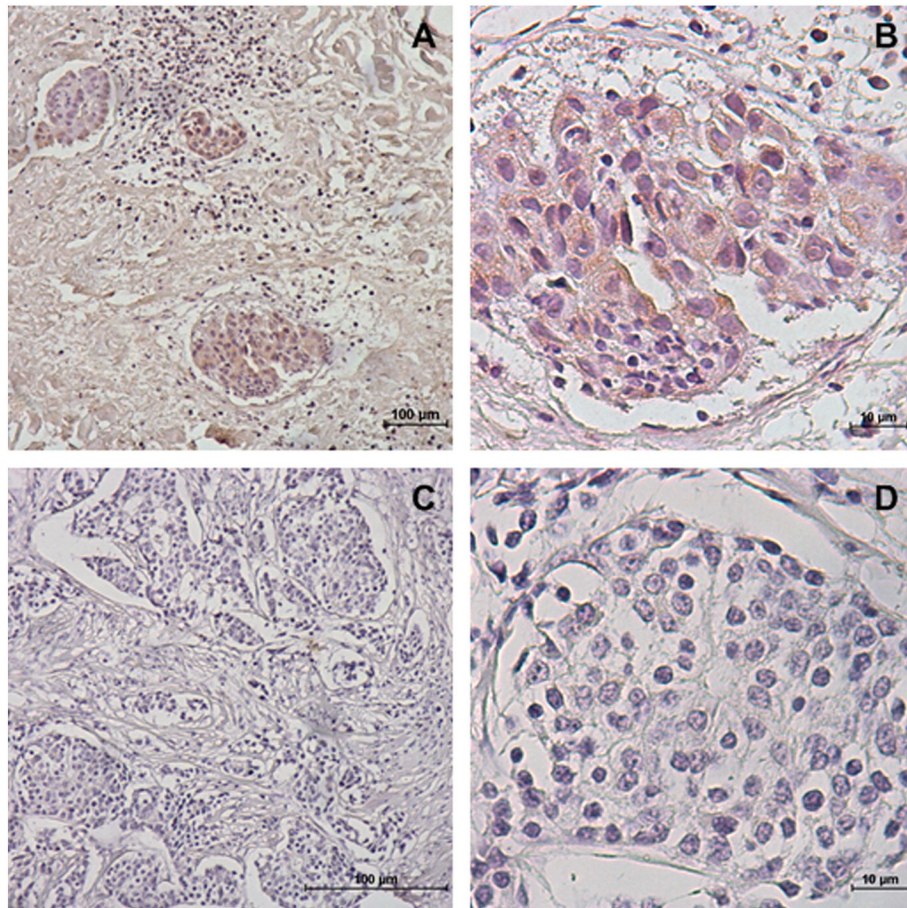


Fig. 1. Immune staining pattern of *FUT3* in breast invasive ductal carcinoma (IDC): positive staining - magnification of 100× (A) and 400× (B); negative staining - magnification of 100× (C) and 400× (D).

Table 1

FUT3 expression pattern in patients with breast invasive ductal carcinoma (IDC: case) and normal breast tissue (control).

FUT3 expression	Positive	Negative	p value	Odds ratio
Control (n = 11)	7 (0.64)	4 (0.36)	Ref.	
Case (n = 85)	16 (0.19)	69 (0.81)	0.0034**	7.55 (1.97–28.93)
Histological grade				
I	0 (0)	7 (1)	Ref.	
II	8 (0.25)	24 (0.75)	0.3077	
III	7 (0.19)	30 (0.81)	0.5753	
Lymph Node metastasis				
Absent	2 (0.09)	21 (0.91)	Ref.	
Present	11 (0.23)	36 (0.77)	0.1959	
Tumor diameter (cm)				
≤5 cm	12 (0.31)	27 (0.69)	Ref.	
>5 cm	1 (0.04)	23 (0.96)	0.0116*	10.22 (1.23–84.74)
Estrogen receptor				
Positive	7 (0.2)	28 (0.8)	Ref.	
Negative	6 (0.22)	21 (0.78)	1.00	
Progesterone receptor				
Positive	7 (0.2)	27 (0.8)	Ref.	
Negative	5 (0.19)	21 (0.81)	1.00	
HER-2				
Positive	13 (0.34)	25 (0.66)	Ref.	
Negative	1 (0.03)	35 (0.97)	0.006*	18.2 (2.23–148.4)
Ki-67				
Positive	5 (0.29)	12 (0.71)	Ref.	
Negative	8 (0.22)	29 (0.78)	0.7328	

Statistical significance and odds ratio measured by Fisher exact test using the software GraphPad Prism v. 5.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.005$.

In attempt to elucidate the reason of the absence of FUT3 expression in IDC patients, we extracted DNA from 109 FFPE tissue samples, out of the 127 IDC group, and sequenced the *FUT3* promoter region. As control, DNA was also extracted and sequenced from 110 blood samples from cancer-free donors. A 507 bp fragment was amplified to genotype 10 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously reported in dbSNP database, NCBI (Sherry et al., 2001). Among all SNPs verified in this study, four of them were biallelic in the study population (Supplementary Table 1). Variations rs73920070 (–6933 C > T) and rs2306969 (–6951 C > T) showed statistically significant differences in their genotype frequency between IDC patients and healthy controls. At position –6933 (rs73920070) the heterozygous genotype C/T was more frequent in healthy subjects than IDC patients (for the co-dominant model, $p = 0.0315$, OR = 0.21, 95% CI 0.04–0.99), as well as the minor allele T ($p = 0.0338$, OR = 0.22, 95% CI 0.05–1.02). On the other hand, the heterozygous genotype C/T at the position –6951 (rs2306969) was more frequent in IDC patients than in health subjects (for the co-dominant model, $p < 0.0001$, OR = 13.02, 95% CI 6.154–27.56), as well as the minor allele T ($p = 0.0004$, OR = 2.02, 95% CI 1.36–2.99). However, the homozygous genotype for the minor allele T showed a similar frequency between the two groups ($p = 0.51$). The genotype distribution of rs2306969 and rs73920070 *FUT3* SNPs in different models is showed in Table 2. Blood samples from 15 IDC patients were genotyped to confirm whether the variations observed in this study were really germline polymorphisms. The blood genotype for all SNPs from all samples analyzed matched with those obtained from the respectively tumor tissue samples, confirming the germinal origin of the polymorphisms.

The in silico prediction of transcription factors whose binding sites could be formed or blocked by the SNPs rs73920070 and rs2306969 in *FUT3* promoter region was performed using Algggen Promo software, V 3.0.2 (Farré et al., 2003). The presence of allele T instead C in

Table 2

Genotype distribution of rs73920070 and rs2306969 *FUT3* promoter SNPs in samples with breast invasive ductal carcinoma (IDC) and normal breast.

rs73920070	Case (n = 109)	Control (n = 110)	OR (CI 95%)	p value
Allele				
C	216 (0.99)	211 (0.96)	Ref.	
T	2 (0.01)	9 (0.04)	0.22 (0.05–1.02)	0.0338*
Codominant				
C/C	107 (0.98)	101 (0.92)	Ref.	
C/T	2 (0.02)	9 (0.08)	0.21 (0.04–0.99)	0.0315*
T/T	0 (0)	0 (0)		
Dominant				
C/C	107 (0.98)	101 (0.92)	Ref.	
C/T + T/T	2 (0.02)	9 (0.08)	0.21 (0.04–0.99)	0.0315*
Recessive				
C/C + C/T	109	110		
T/T	0	0		
Overdominant				
C/C + T/T	107 (0.98)	101 (0.92)	Ref.	
C/T	2 (0.02)	9 (0.08)	0.21 (0.04–0.99)	0.0315*
rs2306969†	(n = 109)	(n = 109†)		
Allele				
C	115 (0.53)	151 (0.69)	Ref.	
T	103 (0.47)	67 (0.31)	2.02 (1.36–2.99)	0.0004**
Codominant				
C/C	11 (0.10)	57 (0.52)	Ref.	<0.0001***
C/T	93 (0.85)	37 (0.34)	13.02 (6.15–27.56)	<0.0001***
T/T	5 (0.05)	15 (0.14)	1.73 (0.52–5.74)	0.3685
Dominant				
C/C	11 (0.10)	57 (0.52)	Ref.	
C/T + T/T	98 (0.90)	52 (0.48)	9.77 (4.72–20.22)	<0.0001***
Recessive				
C/C + C/T	104 (0.95)	94 (0.86)	Ref.	
T/T	5 (0.05)	15 (0.14)	0.30 (0.11–0.86)	0.019*
Overdominant				
C/C + T/T	16 (0.15)	72 (0.66)	Ref.	
C/T	93 (0.85)	37 (0.34)	11.31 (5.83–21.94)	<0.0001***

Statistical significance and odds ratio measured by two-tailed Chi-square test using the software GraphPad Prism v.5.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.005$.

*** $p < 0.001$.

† Genotyping data were not possible to be acquired in one control sample.

SNP rs73920070 leads to the formation of 2 new transcription factor binding sites, to the TFIID and GR- α . In turn, the presence of allele T instead C in SNP rs2306969 leads to loss of 6 transcription factor binding sites, TFII-I, STAT-4, c-Ets-1, Ebf-1, MAZ and GR- α .

4. Discussion

Alpha1,3-fucosyltransferases are a family of enzymes related to the synthesis of Lewis antigens and constituted by FUT3-FUT7 and FUT8[9]. Involved in the leukocyte diapedesis, sialyl Lewis X antigen (sLe^x, Neu5Ac α 2-3Gal α 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) and its isomer sialyl Lewis A antigen (sLe^a, Neu5Ac α 2-3Gal α 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc) are fucosylated glycans, recognized by E-selectins, in cell-cell adhesion molecules localized in vascular endothelium. Interactions between sLe^x/sLe^a and E-selectins mediate the leukocyte rolling on the endothelium, an essential step for the escape of these cells to inflammatory sites (Dube and Bertozzi, 2005). It is well known that this mechanism is also used by tumor cells to mediate their extravasation to secondary sites during hematogenous metastasis (Burdick et al., 2012). SLe^x and sLe^a antigens are overexpressed in solid tumors such as head and neck (Czerwinski et al., 2013), renal (Borzym-kłuczyk and Radziejewska, 2013), lung (Komatsu et al., 2013), colon (Mare et al., 2013), gastric (Kim et al., 2011),

pancreatic (Ballehaninna and Chamberlain, 2012), bile duct (Kikkawa et al., 2012), prostate (Dimitroff et al., 2004) and breast (Jeschke et al., 2005) carcinomas.

The FUT3 enzyme has an important role in Lewis antigens synthesis. Reduced expression of FUT3 in colon, prostate, gastric and cholangiocarcinoma tumor cell lines leads to suppression in Lewis antigens levels (Padró et al., 2011a; Silsirivanit et al., 2013; Weston et al., 1999; Xin et al., 2012; Yin et al., 2010) and overexpression of this enzyme results in raised levels of sLe^a and sLe^x in pancreatic and prostatic tumor cell lines, respectively (Aubert et al., 2000; Barthel et al., 2009). In colon cancer cell lines, FUT3 is also involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) stimulated by TGF- β . T β R I and T β R II receptor's fucosylation mediated by this enzyme is fundamental for TGF- β signaling of EMT process (Hirakawa et al., 2014). Acquisition of a mesenchymal phenotype is a mechanism used by tumor cells to allow them to disseminate from primary sites and self-renew in a secondary site, leading to motility and metastasis (Wang and Zhou, 2011). Thus, due the role of FUT3 in two important steps of metastatic process, we previously hypothesized that an overexpression of this enzyme would be involved in IDC, leading to a more malignant and metastatic tumor.

In contrast, we did not find any correlation between the FUT3 expression and tumor malignancy or metastatic properties of IDC. However, we observed that lack of FUT3 enzyme expression is more frequently found in breast invasive ductal carcinoma patients from the State of Pernambuco, Northeast Brazil. Furthermore, tumor size analyzes demonstrated the correlation between FUT3 non-expression with larger lesions and HER-2 negative IDC tumors. Our results corroborate with those obtained by Teresa et al. (2010) that showed a high incidence of negative FUT3 genotypes, which leads to the synthesis of inactive truncated enzyme, in Southeastern Brazilian patients with IDC when compared to health controls. However, this previously study did not predict any correlation between negative FUT3 genotype and tumor size or molecular pattern (Teresa et al., 2010). Although these are unexpected results since high levels of Lewis antigens have been seen in breast invasive carcinomas, sharing of α 1,3-fucosyltransferase activity with other fucosyltransferases could, at least partially, explain this contradiction. Fucosylation of sLe^x antigen could also be performed by FUT4, FUT6 and FUT7 (Kannagi, 2004). In fact, breast carcinomas showed high levels of FUT4 when compared with normal tissues and this enzyme is overexpressed in high metastatic breast cancer cell lines (Yan et al., 2015). Therefore, the increase in sLe^x levels observed in breast carcinoma could be a result of FUT4 elevated activity in these lesions. Nevertheless, sLe^a fucosylation is mediated only by FUT3 but enzymatic activity and mRNA levels of this enzyme were not associated with sLe^a overexpression in gastrointestinal and ovarian tumors, respectively (Dohi et al., 1994; Escrevente et al., 2006). So, more studies are necessary to understand the mechanisms involved in the regulation of sLe^a expression.

Few investigations of FUT3 expression in tumor tissue samples have been made. *In vitro* studies with tumor cells lines demonstrated a major metastatic potential in prostatic and pancreatic tumor cells which overexpressed FUT3 (Aubert et al., 2000; Barthel et al., 2009) but this methodology do not completely reproduce the tumor heterogeneity and microenvironment, and could bring bias to the analysis (Vargogogola and Rosen, 2007). Unlike the observed in metastatic prostate tumor cell lines, the analysis of FUT3 in Pernambuco State patient's tissue samples identified lower levels of this enzyme in prostatic adenocarcinoma than in benign prostatic hyperplasia (Vasconcelos et al., 2013). In patients with colorectal carcinoma, low expression of FUT3 mRNA was related to tumor infiltration and distant metastasis (Petretti et al., 2000).

The differences between the results obtained by *in vitro* and *in vivo* analysis could be related to the role of immunologic system against the tumor cells *in vivo* and the involvement of FUT3 in this mechanism. Transfection of melanoma and erythroleukemia cells with FUT3 gene led to a high cytotoxicity mediated by NK cells and this process was

inhibited by anti-sLe^x antibody addition. The recognition of tumor cells via sLe^x by NK cells and triggering of cytotoxicity is mediated by C-type lectin receptors, such as CD-94 and NKG2D (Higai et al., 2006; Ohyama et al., 2002). Another death pathway against tumor cells stimulated by NK cells and influenced by the fucosylation in the Apo2L/TRAIL. The TNF-related apoptosis-inducing ligand (also known as Apo2L/TRAIL) mediates an extrinsic apoptosis pathway shoot by its ligation to TRAIL receptors DR4 and DR5. This ligation leads to receptor oligomerization on the cell membrane and initiation of apoptosis of the target cell. TRAIL can also interact with decoy receptors DCR1 and DCR2 resulting in possible inhibition of the pathway. TRAIL pathway is related to NK cell induced cytotoxicity against tumor cells (Johnstone et al., 2008). In colorectal cancer, overexpression of FUT3 mRNA was found in Apo2L/TRAIL sensitive cell lines. Reducing the O-glycosylation in these cell lines results in reduced sensitivity to this pathway (Wagner et al., 2007). Colon cancer cell line HCT116 that did not express fucosylated antigens due to expression of a truncated GMDS enzyme resulted in larger tumors *in vivo* than the same cell line that express fucosylated antigens after GMDS transfection (rescue). HCT116 rescued cells were more sensitive to TRAIL stimulation than not rescued ones (Moriwaki et al., 2009). These finds showed a possible relationship between the expression of FUT3 enzyme and NK-induced cytotoxicity through C-type lectin receptors and Apo2L/TRAIL pathway. Due the importance of NK cell in immune system antitumor action against breast cancer cells (Kajitani et al., 2012), we propose that no expression of FUT3 enzyme in breast IDC samples observed in this study would be result of an adaptive advantage that led to an immunoresistance of the tumor cells (Fig. 2).

Genomic analysis of FUT3 promoter region showed that two variations localized in this region might be associated with IDC in Brazilian patients. Minor allele T of SNP rs73920070 (–6933 C > T) were more frequently observed in the cancer-free control group whereas minor allele T of SNP rs2306969 (–6951 C > T) were more frequently observed in IDC Brazilian patients from Pernambuco state. Few studies have reported these polymorphisms in other populations. In a Caucasian population, rs2306969 T allele was associated with ovarian cancer risk (Sellers et al., 2008). The same SNP in a European population showed that the minor allele T have a weak relationship with intestinal gastric cancer and its heritage with mutant variations of other two FUT3 SNPs (rs778986 and rs11673407) is associated with diffuse gastric cancer (Duell et al., 2014). Minor allele T of rs2306969 in patients with colorectal cancer from southern China was associated with high levels of serum carcinoembryonic antigen (CEA) a colorectal cancer biomarker (He et al., 2014). However, until the present moment studies were not found correlating rs73920070 with health disorders.

The Allgen PROMO *in silico* analysis of transcription factor binding sites using different genotypes for rs73920070 and rs2306969 gave us insight how those SNPs could influence the FUT3 mRNA transcription. The T allele of SNP rs73920070, more frequent in our control samples, leads to the gain of two potential sites for the transcription factors TFII-D and GR- α , respectively. Those transcription factors could positively modulate the transcription of FUT3 gene, possibly increasing the expression of FUT3 enzyme, which was also associated with absence of IDC. The opposite was seen for T allele of SNP rs2306969. The minor allele for this variation, more frequent in IDC patients, alters six potential sites for the transcription factors TFII-I, STAT-4, c-Ets-1, Ebf-1, MAZ and GR- α , respectively, impairing their ligation. Transcription of FUT3 gene and enzyme expression would be reduced, which was also associated with presence of IDC according to our immunohistochemistry results. However, *in vitro* assays have to be done to evaluate the real impact of SNPs rs73920070 and rs2306969 in FUT3 expression.

The dual role of the FUT3 in tumor cells could indicate that these cells modulate its expression to acquire beneficial characteristics during their establishment in the primary site and later during metastasis. Our results demonstrated that the non-expression of FUT3 enzyme is related to invasive ductal carcinoma in Brazilian patients and this pattern is

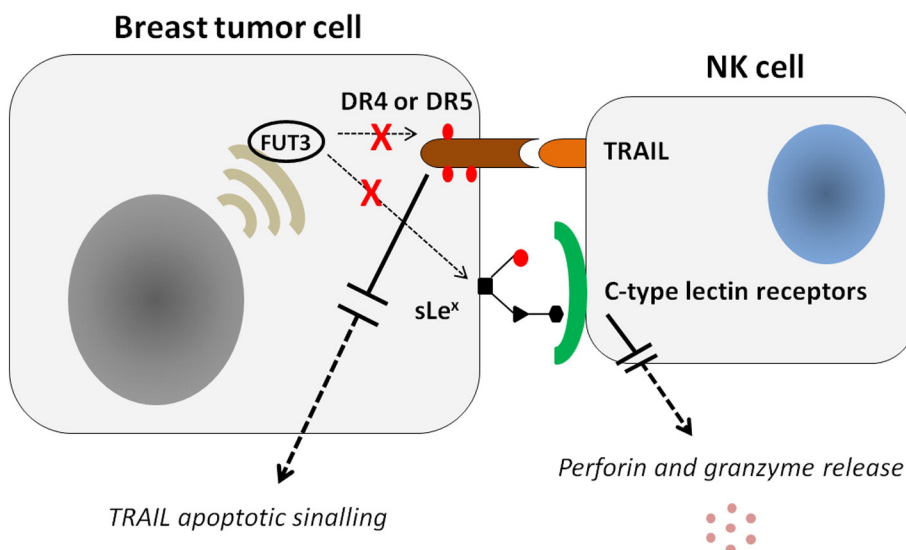


Fig. 2. Schematic representation α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT3) enzyme in Natural killer-induced cytotoxicity against breast tumor cells. The lack of FUT3 enzyme by breast cancer cells could result in no fucosylation of DR4 and DR5 receptors, blocking the TRAIL apoptotic signaling. FUT3 absence would also reduce fucosylated antigens in cell surface leading to non-recognition of Lewis antigens in tumor cell surface by C-type lectin receptor, preventing release of perforin and granzyme by NK-cells. Both mechanisms could promote the immunoresistance of breast tumor cell. NK: Natural killer; DR4: Death receptors 4; DR5: Death receptor 5; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; sLe^x: Sialyl Lewis X antigen.

more frequent in larger and HER-2 negative tumors. Moreover, two SNPs localized in *FUT3* promoter region were found in this population, suggesting that rs73920070 (−6933 C > T) confers protection whereas rs2306969 (−6951 C > T) triggers to susceptibility to IDC. Analyzing previous studies, we hypothesized that this FUT3 down regulation is an adaptive advantage developed by breast tumor cells to acquire an immune-resistant phenotype while the up-regulating of others α 1,3-fucosyltransferases, such as FUT4, contributes to the metastatic power. Studies are under development to better understand the role of the FUT3 expression in breast tumor cells regarding the immune response and the functional role of the SNPs rs73920070 and rs2306969 in FUT3 expression and IDC development.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.08.015>.

Acknowledgments

Authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) APQ-0689-2.08/10 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Universal-480291/2011 for financial support.

References

- Aubert, M., Panicot-Dubois, L., Crotte, C., Sbarra, V., Lombardo, D., Sadoulet, M.O., Mas, E., 2000. Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by anti-sense FUT3 sequence. *Int. J. Cancer* 88, 558–565.
- Ballehaninna, U.K., Chamberlain, R.S., 2012. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: an evidence based appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 105–119. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021>.
- Barthel, S.R., Wiese, G.K., Cho, J., Opperman, M.J., Hays, D.L., Siddiqui, J., Pienta, K.J., Furie, B., Dimitroff, C.J., 2009. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19491–19496. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906074106>.
- Becker, D.J., Lowe, J.B., 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13, 41R–53R. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg054>.
- Borzum-kuczynski, M., Radziejewska, I., 2013. Changes of the Expression of Lewis Blood Group Antigens in Glycoproteins of Renal Cancer Tissues. 60, 223–226.
- Burdick, M.M., Henson, K.A., Delgadillo, L.F., Choi, Y.E., Goetz, D.J., Tees, D.F.J., Benencia, F., 2012. Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? *Front. Oncol.* 2, 1–11. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2012.00103>.

- Czerwinski, M.J., Desiderio, V., Shkeir, O., Papagerakis, P., Lapadatescu, M.C., Owen, J.H., Athanassiou-Papaefthymiou, M., Zheng, L., Papaccio, G., Prince, M.E., Papagerakis, S., 2013. In vitro evaluation of sialyl lewis X relationship with head and neck cancer stem cells. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 149, 97–104. <http://dx.doi.org/10.1177/0194599813482879>.
- Dimitroff, C., Lechpammer, M., Long-Woodward, D., Kutok, J.L., 2004. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res.* 64, 5261–5269.
- Dohi, T., Hashiguchi, M., Yamamoto, S., Morita, H., Oshima, M., 1994. Fucosyltransferase-producing sialyl lea and sialyl Lex carbohydrate antigen in benign and malignant gastrointestinal mucosa. *Cancer* 73, 1552–1561.
- Dube, D.H., Bertozzi, C.R., 2005. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 477–488. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1751>.
- Duell, E.J., Bonet, C., Lujan-barroso, L., Weiderpass, E., Boutrou-Ruault, M.C., Racine, A., Severi, G., Canzian, F., Rizzato, C., Boeing, H., Overvad, K., 2014. Variation at ABO histo-blood group and FUT loci and diffuse and intestinal gastric cancer risk in a European population. *Int. J. Cancer* 136, 880–893. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29034>.
- Escrevente, C., Machado, E., Brito, C., Reis, C.A., Stoeck, A., Runz, S., Marmé, A., Altevogt, P., Costa, J., 2006. Different expression levels of α 3/4 fucosyltransferases and lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines. *Int. J. Oncol.* 29, 557–566.
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Aduara, J.E., Roselló, L., Albà, M.M., Messegue, X., 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651–3653. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/kgk605>.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- 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., Koletsas, T., Bafaloukos, D., Televantou, D., Kalogerias, K.T., Pectasides, D., Skarlos, D.V., Koutras, A., Dimopoulos, M.A., 2012. Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* 7, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037946>.
- Groux-Degroote, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Cazet, A., Vincent, A., Lehoux, S., Lafitte, J.-J., Van Seuningen, I., Delannoy, P., 2008. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* 410, 213–223. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20070958>.
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangu, P.B., Temin, S., 2010. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Oncol. Pract.* 6, 195–197. <http://dx.doi.org/10.1200/JOP.777003>.
- He, M., Wu, C., Xu, J., Guo, H., Yang, H., Zhang, X., Sun, J., Yu, D., Zhou, L., Peng, T., He, Y., Gao, Y., Yuan, J., Deng, Q., Dai, X., Tan, A., Feng, Y., Zhang, H., Min, X., Yang, X., Zhu, J., Zhai, K., Chang, J., Qin, X., Tan, W., Hu, Y., Lang, M., Tao, S., Li, Y., Li, Y., Feng, J., Li, D., Kim, S.-T., Zhang, S., Zhang, H., Zheng, S.L., Gui, L., Wang, Y., Wei, S., Wang, F., Fang, W., Liang, Y., Zhai, Y., Chen, W., Miao, X., Zhou, G., Hu, F.B., Lin, D., Mo, Z., Wu, T., 2014. A genome wide association study of genetic loci that influence tumour

- biomarkers cancer antigen 19–9, carcinoembryonic antigen and α fetoprotein and their associations with cancer risk. *Gut* 63, 143–151. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303434>.
- Higai, K., Ichikawa, A., Matsumoto, K., 2006. Binding of sialyl lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1760, 1355–1363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.015>.
- Hirakawa, M., Takimoto, R., Tamura, F., Yoshida, M., Ono, M., Murase, K., Sato, Y., Osuga, T., Sato, T., Iyama, S., Miyaniishi, K., Takada, K., Hayashi, T., Kobune, M., Kato, J., 2014. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* 110, 156–163. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.699>.
- Sellers, T. A., Huang, Y., Cunningham, J., Goode, E.L., Sutphen, R., Vierkant, R. A., Kelemen, L.E., Fredericksen, Z.S., Liebow, M., Pankratz, V.S., Hartmann, L.C., Myer, J., Iversen, E.S., Schildkraut, J.M., Phelan, C., 2008. Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylation genes with risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 17, 397–404. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0565>.
- Jeschke, U.D.O., Mylonas, I., Shabani, N., Kunert-keil, C., Sialyl Lewis, A., 2005. Expression of sialyl lewis X. 1622, 1615–1622.
- Johnstone, R.W., Frew, A.J., Smyth, M.J., 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 782–798. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2465>.
- Kajitani, K., Tanaka, Y., Arihiro, K., Kataoka, T., Ohdan, H., 2012. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 134, 139–155. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-011-1944-x>.
- Kannagi, R., 2004. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl lewis X and sialyl lewis a expression – the warburg effect revisited. *Glycoconj. J.* 20, 353–364.
- Katkoori, V.R., Shanmugam, C., Jia, X., Vitta, S.P., Sthanam, M., Callens, T., Messiaen, L., Chen, D., Zhang, B., Bumpers, H.L., Samuel, T., Manne, U., 2012. Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. *PLoS One* 7, e30020. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030020>.
- Kikkawa, S., Sogawa, K., Satoh, M., Umemura, H., Koder, Y., Matsushita, K., Tomonaga, T., Miyazaki, M., Yokosuka, O., Nomura, F., 2012. Identification of a novel biomarker for biliary tract cancer using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Proteomics* 2012, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/108609>.
- Kim, D.H., Oh, S.J., Oh, C.A., Choi, M.G., Noh, J.H., Sohn, T.S., Bae, J.M., Kim, S., 2011. The relationships between perioperative CEA, CA 19–9, and CA 72–4 and recurrence in gastric cancer patients after curative radical gastrectomy. *J. Surg. Oncol.* 104, 585–591. <http://dx.doi.org/10.1002/jso.21919>.
- Komatsu, H., Mizuguchi, S., Izumi, N., Chung, K., Hanada, S., Inoue, H., Suehiro, S., Nishiyama, N., 2013. Sialyl lewis X as a predictor of skip N2 metastasis in clinical stage IA non-small cell lung cancer. *World J. Surg. Oncol.* 11, 309. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7819-11-309>.
- Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, R.D., Nair, R.P., Lowe, J.B., 1990. A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the lewis blood group alpha(1,3/4)fucosyltransferase. *Genes Dev.* 4, 1288–1303. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.4.8.1288>.
- Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.-H., van de Vijver, M.J., 2012. *Tumors of the Breast, in: WHO Classification of Tumours of the Breast*. IARC, pp. 1–112.
- Lau, G., Essafi, A., Huffman, J.E., Hayward, C., Knežević, A., Kattla, J.J., Polašek, O., Gornik, O., Vitart, V., Abrahams, J.L., Pučić, M., Novokmet, M., Redžić, I., Campbell, S., Wild, S.H., Borovečki, F., Wang, W., Kolčić, I., Zgaga, L., Gyllenstein, U., Wilson, J.F., Wright, A.F., Hastie, N.D., Campbell, H., Rudd, P.M., Rudan, I., 2010. Genomics meets glycomics—the first GWAS study of human N-glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet.* 6, e1001256. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001256>.
- Listinsky, J.J., Siegal, G.P., Listinsky, C.M., 2011. The Emerging Importance of α -L-Fucose in Human Breast Cancer: A Review 3, 292–322.
- Ma, H., Miao, X., Ma, Q., Zheng, W., Zhou, H., Jia, L., 2013. Functional roles of glycogene and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells. *IUBMB Life* 65, 409–422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.iub.1133>.
- Mare, L., Caretti, A., Albertini, R., Trinchera, M., 2013. CA19.9 antigen circulating in the serum of colon cancer patients: where is it from? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 792–797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.01.004>.
- Miyoshi, E., Moriwaki, K., Nakagawa, T., 2008. Biological function of fucosylation in cancer biology. *J. Biochem.* 143, 725–729. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvn011>.
- Moriwaki, K., Noda, K., Furukawa, Y., Ohshima, K., Uchiyama, A., Nakagawa, T., Taniguchi, N., Daigo, Y., Nakamura, Y., Hayashi, N., Miyoshi, E., 2009. Deficiency of GMDs leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Gastroenterology* 137, 188–198.(e2). <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.002>.
- Ohyama, C., Kanto, S., Kato, K., Nakano, O., Arai, Y., Kato, T., Chen, S., Fukuda, M.N., Fukuda, M., 2002. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl lewis x oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13789–13794. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212456599>.
- Padró, M., Cobler, L., Garrido, M., de Bolós, C., 2011a. Down-regulation of FUT3 and FUT5 by shRNA alters lewis antigens expression and reduces the adhesion capacities of gastric cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 1141–1149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.011>.
- Padró, M., Mejías-Luque, R., Cobler, L., 2011b. Regulation of glycosyltransferases and lewis antigens expression by IL-1 β and IL-6 in human gastric cancer cells. *Glycoconj. J.* 28, 99–110. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-011-9327-4>.
- Petretti, T., Kemmer, W., Schulze, B., Schlag, P.M., 2000. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut* 46, 359–366. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.46.3.359>.
- Ramalhõ, E.A.V.F., Silva-Filho, J.L.Q., Cartaxo, M.F.S., Cavalcanti, C.B.L., Rêgo, M.J.B.M., Oliveira, M.B.M., Beltrão, E.I.C., 2014. Assessment of changes in the brca2 and p53 genes in breast invasive ductal carcinoma in northeast Brazil. *Biol. Res.* 47, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1186/0717-6287-47-3>.
- Sakuma, K., Aoki, M., Kannagi, R., 2012. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial–mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1111135109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1111135109>.
- Serpa, J., Mesquita, P., Mendes, N., Oliveira, C., Almeida, R., Santos-Silva, F., Reis, C.A., LePendu, J., David, L., 2006. Expression of lea in gastric cancer cell lines depends on FUT3 expression regulated by promoter methylation. *Cancer Lett.* 242, 191–197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.009>.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Sirotkin, K., 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 308–311. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.1.308>.
- Silsirivanit, A., Araki, N., Wongkham, C., Vaeteewoottacharn, K., Pairajkul, C., Kuwahara, K., Narimatsu, Y., Sawaki, H., Narimatsu, H., Okada, S., Sakaguchi, N., Wongkham, S., 2013. CA-S27: a novel lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 104, 1278–1284. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12222>.
- Teresa, D.B., Santos, R.A., Takahashi, C.S., Carrara, H.H., Moreira, H.W., Mattos, L.C., Lia-Neto, N., Cunha, L.A., Bassi, C.L., Soares, E.G., Donadi, E.A., Mello, E.R., Soares, C.P., 2010. Polymorphisms of lewis and secretor genes are related to breast cancer and metastasis in axillary lymph nodes. *Tumour Biol.* 31, 401–409. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-010-0048-2>.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., Wernerus, H., Björling, L., Ponten, F., 2010. Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1210-1248>.
- Vargo-Gogola, T., Rosen, J.M., 2007. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* 7, 659–672. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2193>.
- Vasconcelos, J.L.d.A., Ferreira, S.d.A., Lima, A.L.R., de Rêgo, M.J.B.d.M., ARG, B., Cavalcanti, C.d.L.B., Lira, M.M.d.M., Beltrão, E.I.C., 2013. Comparing the immunoreexpression of FUT3 and FUT6 between prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Acta Histochem. Cytochem.* 46, 105–109. <http://dx.doi.org/10.1267/ahc.13010>.
- Wagner, K.W., Punnoose, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitti, R.M., Lancaster, K., Lee, D., von Goetz, M., Yee, S.F., Totpal, K., Huw, L., Katta, V., Cavet, G., Hymowitz, S.G., Amler, L., Ashkenazi, A., 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat. Med.* 13, 1070–1077. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1627>.
- Wang, Y., Zhou, B.P., 2011. Epithelial–mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin. J. Cancer* 30, 603–611.
- Weston, B.W., Hiller, K.M., Mayben, J.P., Manousos, G.A., Bendt, K.M., Liu, R., Cusack, J.C., 1999. Expression of human α (1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 59, 2127–2135.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R.B., Mangu, P.B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M.F., Spears, P. A., Vance, G.H., Viale, G., Hayes, D.F., 2013. 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.* 31, 3997–4013. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984>.
- Xin, Y., Jia, Y., Cai, Y., Liu, Q., Wang, Y., 2012. Transfection of miRNAs targeting the FUT3 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line KATO-III. *World Chin. J. Dig* 20, 2341–2346.
- Yan, X., Lin, Y., Liu, S., Aziz, F., Yan, Q., 2015. Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.048>.
- Yin, X., Rana, K., Ponnudi, V., King, M.R., 2010. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. *Carbohydr. Res.* 345, 2334–2342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.028>.
- Yuan, K., Kucik, D., Singh, R.K., Listinsky, C.M., Listinsky, J.J., Siegal, G.P., 2008. Alterations in human breast cancer adhesion–motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying alpha-L-fucose moieties. *Int. J. Oncol.* 32, 797–807. <http://dx.doi.org/10.2964/jisk.kuni0223>.
- Zen, K., Liu, D.Q., Guo, Y.L., Wang, C., Shan, J., Fang, M., Zhang, C.Y., Liu, Y., 2008. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One* 3, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001826>.