



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

JULIANA LÚCIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**ESTUDO DO MICRORNA-30C E SEU ENVOLVIMENTO NA
MODIFICAÇÃO DA GLICOSILAÇÃO TUMORAL MEDIADA PELA
GALNT7 NO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO MAMÁRIO**

**RECIFE
2016**

JULIANA LÚCIA DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS

**ESTUDO DO MICRORNA-30C E SEU ENVOLVIMENTO NA
MODIFICAÇÃO DA GLICOSILAÇÃO TUMORAL MEDIADA PELA
GALNT7 NO CARCINOMA DUCTAL INVASIVO MAMÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Inovação
Terapêutica como requisito para
obtenção do título de Doutor em
Inovação Terapêutica.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica - CCB/UFPE

Co-orientador:

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Departamento de Histologia-CCB/UFPE

Co-orientador:

Prof. Dr. Victor Piana de Andrade
Departamento de Anatomia Patológica-Hospital AC Camargo
Câncer Center

**Recife
2016**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Vasconcelos, Juliana Lúcia de Albuquerque

Estudo do microrna-30C e seu envolvimento na modificação da glicosilação tumoral mediada pela GALNT7 no carcinoma ductal invasivo mamário/ Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos Recife: O Autor, 2016.

96 folhas: Il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientadores: Jacinto da Costa Silva Neto e Victor Piana de Andrade

Tese (doutorado) ã Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e anexos

- 1. Mamas- câncer 2. Glicosiltransferases I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Silva Neto, Jacinto da Costa (coorientador)III. Andrade, Victor Piana de IV. Título**

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-271

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque.

Título: Estudo do microRNA-30c e seu envolvimento na modificação da glicosilação tumoral mediada pela GalNAc7 no Carcinoma Ductal Invasivo Mamário

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 26/02/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandez

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM

Assinatura: _____

Profa. Dra. Amanda Lucena Rosendo de Lima

Centro Acadêmico do Agreste-Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Mariana Montenegro de Melo Lira

Departamento de Patologia - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Bárbara Simas Chagas

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Vasconcelos, J.	Estudo do microRNA-30c e seu envolvimento na modificação da glicosilação tumoral mediada pela GalNac7 no Carcinoma Ductal Invasivo Mamário		Doutoradp PPGIT/UFPE 2016
-----------------	---	--	---------------------------------

Não autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof^a. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^a. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

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

Prof. Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo a três pessoas singulares que passaram em minha vida de forma marcante e singela.

Inicialmente dedico a minha amada mãe Maria Lúcia de Albuquerque Vasconcelos *ón memoriam* por ser hoje e sempre, o grande amor da minha vida, meu orgulho, meu exemplo de força, amor, fé e caráter. Minha grande incentivadora na busca do saber, utilizando como principais características o esforço, humildade e honestidade. Amo-te pra sempre!

Dedico a minha alegre tia Maria Zélia da Silva Albuquerque *ón memoriam* por demonstrar tanta fé, felicidade, força, amor e ajuda em todos os momentos de sua vida e por ser minha primeira paciente com câncer de mama. Amo você!

Eternas saudades!

Também dedico a nossa paciente Cicilia Farias *ón memoriam* que iniciou comigo este doutorado com sentimentos similares, pois tínhamos anseios, medos e desafios diante de uma nova jornada que estava por vir. Ela diante do diagnóstico de Câncer de Mama Ductal Invasivo do subtipo Luminal B-Her2+ aos seus 34 anos e eu diante do início de mais um desafio em estudar um tumor de alta taxa de morbimortalidade. Dedico a Cicilia por me ensinar tanto diante da sua garra, amor com seus filhos e marido e por permitir nossa amizade construída através de visitas ao hospital, visitas em casa, telefonemas, projetos sociais e muito amor.

Dedico todo o meu esforço a estas pessoas que amo e sempre amarei e que sofreram com uma patologia intrigante e para elas, mortal.

Dedico esta tese a estas mulheres que me mostraram de forma única e diante do exemplo de vida que ciência sem amor não é nada e que sabedoria sem humildade não é válida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades concedidas, por todos os momentos vividos de alegria e de angústia, agradeço por me proporcionar a presença de pessoas tão especiais e por me permitir alçar mais esta etapa de minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor **Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, por ser este homem humano, amigo e de um caráter inigualável, agradeço por todas as oportunidades concedidas e por toda confiança depositada durante estes anos de pesquisa e amizade. Como sempre, muito obrigada Eduardo!

Agradeço ao meu coorientador Professor Doutor **Victor Piana de Andrade** por sua grande ajuda na construção desta tese e por sua confiança. Obrigada por sua amizade, respeito e atenção no período que estive em São Paulo.

Agradeço ao meu coorientador Professor Doutor **Jacinto Costa da Silva Filho** por sua confiança e atenção concedida. Obrigada por seu respeito e dedicação ao nosso estudo.

Agradeço ao **Dr. Emanuel Dias Neto** por sua ajuda, amizade e respeito para a realização deste estudo.

Agradeço ao meu pai **James Williams Vasconcelos** por seu amor. Obrigada pai!

Agradeço ao meu noivo **Ítalo Teixeira Vilela Torres**, por tão grande amor, amizade, companheirismo, atenção, paciência e cuidado. Amo-te!

Agradeço ao meu irmão **João Luís de Albuquerque Vasconcelos**.

A minha avó **Maria José da Silva Albuquerque**, por seu amor, carinho e exemplo de vida. Agradeço por não esquecer nunca de mim, mesmo diante da sua doença. Amo-te!

Agradeço a minha mãe do coração **Audice Moraes Arcoverde** por seu amor e cuidado durante todos esses anos. Sem seu amor não sei como seria e como eu estaria. Também agradeço ao meu pai do coração **Lúcio Lúcio Soares**, por sua ajuda em tantos momentos, apoio, confiança e amor. Amo muito vocês!

Agradeço as minhas irmãs do coração **Andressa Arcoverde, Raissa Arcoverde, Melissa Arcoverde e Larissa Arcoverde** por todo o amor, irmandade, cuidado e alegrias compartilhadas durante todo este tempo. Tenho muito orgulho de vocês!

Agradeço a minha tia **Clarice da Silva Albuquerque**, por demonstrar sempre tanto amor e cuidado, agradeço por sua amizade e confiança. Amo-te!

Agradeço a todos meus familiares, principalmente a minha tia **Maria Zélia da Silva Albuquerque** *ón memoriam* poder ser meu grande apoio e incentivadora. SAUDADES!

Agradeço as minhas primas e primo **Carina Albuquerque dos Santos, Clariana Albuquerque dos Santos, Sandra Albuquerque dos Santos, Tatiana Albuquerque Arruda, Júlio César Arruda** por toda confiança e apoio.

Agradeço a minha tia **Lindalva Albuquerque Sato** e a minha prima **Isa Albuquerque Sato** por todo apoio no momento em que estive em São Paulo para construir esta tese. Obrigada por tudo!

Agradeço as minhas amigas-irmãs de Pernambuco: **Juliana Brandão, Stefanny Ferreira, Jéssica Frutuoso, Karina Monteiro, Natali Monteiro, Ana Rosa, Silvia Freitas, Thassyane Rebeca, Yolanda Sampaio, Fabiana Maria** e aos meus amigos **João Luiz, Bruno Trajano, Daniel Arcoverde, Samuel Arcoverde, Lucas Vieira, Thiago Gomes** por toda ajuda, por toda alegria compartilhada, pela atenção, pelo carinho, pela AMIZADE. Adoro vocês!

Agradeço a **Carmelita Cavalcanti e Marina Cartaxo** por toda ajuda, amizade, confiança e apoio. Amo vocês!

Agradeço as minhas amigas-irmãs de São Paulo: **Vanessa Pereira, Sabrina Moretti, Daiana Marin, Camila Prieto, Maria Galli, Sheila Garcia, Melissa Pizzi, Beatriz Nunes, Kivvi Mello, Fernanda Paiva, Patrícia Santos, Adriana, Taís Palis, Janaína Almeida, Stefanny, Bianca Troncarelli, Tonielli Lacerda, Iara Rodrigues** por toda ajuda, alegria compartilhada, atenção, carinho e AMIZADE. Adoro vocês!

Agradeço especialmente a Dra. **Juliana Laino** por sua atenção, grande ajuda, carinho, cuidado e amizade construída de forma tão linda. Amo você Jú!

Agradeço aos amigos **Priscila Dias, Denis Cavalcanti, Eleny Vassão, Gavin Aitken** pelas orações, passeios, alegrias e aprendizado compartilhado.

Agradeço a todo o **Grupo BmC** pelo o apoio e amizade.

Agradeço a todo o **Grupo Genômica Médica - AC Camargo** pelo o apoio e amizade.

Agradeço aos funcionários **Severino, Carlos, Sueli, Ivan Neves e Marina França** do AC Camargo Cancer Center por grande ajuda, respeito e amizade.

Agradeço aos colegas pós-graduando do programa em Inovação Terapêutica por estes quatro anos vividos e compartilhados.

Agradeço à Dra. **Mariana Lira** por ser tão solícita e por sua grande ajudar.

Agradeço as recepcionistas do Setor de **Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC/UFPE)**, por toda ajuda e paciência colaborando com nossas pesquisas.

Agradeço a todos os colegas, funcionários e professores do **Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)**.

Agradeço toda a ajuda e amizade dos colegas, funcionários e professores do **Centro Internacional de Pesquisa Ensino (CIPE)**.

Agradeço toda a ajuda e amizade dos colegas, funcionários e professores do **Hospital AC Camargo Cancer Center (SP)**.

A todos que estiveram direta e indiretamente presentes em minha vida e que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

E é assim, que nos caminhos escolhidos por Deus,
aprendemos e ensinamos, perdemos e ganhamos,
renunciamos, porém optamos;

É nesta estrada que caminhamos ou até mesmo
corremos na busca do saber;

E que este saber, venha atrelado à humildade e
sabedoria para influenciar com benfeitorias aos que
também percorrem este mesmo caminhar;

Que Deus esteja nos abençoando e direcionando cada
passo, em amor, para por fim, ao próximo também
amar.

(Autoria própria)

RESUMO

VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque. Estudo do microRNA-30c e seu envolvimento na modificação da glicosilação tumoral mediada pela GALNT7 no Carcinoma Ductal Invasivo Mamário. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de mama é o tipo de tumor que mais acomete as mulheres no mundo. No Brasil estimam-se para 2016/2017, 57.960 novos casos de câncer de mama por ano. O desenvolvimento destes tumores envolve um mecanismo complexo e multifatorial, onde glicosiltransferases e microRNAs (miRNAs) desempenham papéis importantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a galactosiltransferase 7 (GALNAC7) e o miRNA 30c no carcinoma ductal invasivo mamário (CDI). Nosso estudo demonstrou, uma baixa expressão do antígeno Tn nos tumores mamários, diante da baixa expressão da GalNAC7 e do seu carboidrato-substrato N-acetil-galactosamina (GalNAc). O estudo evidenciou, também, que o gene GALNT7 não apresenta influência significativa quanto a um prognóstico reservado para CDI, diante de sua baixa expressão gênica e proteica, demonstrando que o mecanismo de O-glicosilação na formação de mucinas pode ser estimulado, também, por outros genes da família GALNT, porém observamos que o gene GALNT7 pode ser modulado pelo o miRNA 30c frente ao aumento de sua expressão nos tumores estudados, levantando a hipótese de um novo alvo diagnóstico e terapêutico via modulação da expressão de genes da glicosilação. A análise dos dados clínicopatológicos, não demonstrou correlação significativa, com exceção da expressão de GalNAc e tamanho do tumor. Diante da análise do segmento clínico de cada paciente, na curva de sobrevida, não houve resultados significativos quando comparados com os subtipos moleculares, estadiamento clínico, idade e tamanho do tumor. Assim, nossos resultados sugerem que o miRNA 30c pode ser um potencial regulador da expressão do gene GALNT7 e que assim favorece a menor expressão da enzima GALNAC7 levando a uma menor inserção do carboidrato GalNAc nos glicoconjugados de superfície de células de carcinoma ductal invasivo.

Palavras-chave: carcinoma ductal invasivo de mama, glicosiltransferase, miRNA-30c.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Juliana Lúcia de Albuquerque. Study of microRNA-30c and its involvement in changes of tumor glycosylation mediated by GalNAC7 in Breast Invasive Ductal Carcinoma. Theses. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Breast cancer is the most common cancer in women in world. In Brazil, it is estimated 57,960 new cases of mammary cancers per year in 2016/2017. The development of these tumors comprises a complex and multifactorial mechanism where glycosyltransferase and microRNAs (miRNAs) play important roles. This study aimed to evaluate the galactosyltransferase 7 (GALNAC7) and the miRNA-30c in mammary invasive ductal carcinoma (IDC). Our results showed a low expression of Tn antigen in mammary tumors resulting from the low expression of GALNAC7 which leads to a low insertion of its saccharide-substrate N-acetyl-galactosamine (GalNAc) in tumor cell glycoconjugates. The study also evidenced that the gene GALNT7 did not influenced the poor prognostic of IDC, since a low gene expression and, consequently, a low protein expression was observed. Such fact indicates that other genes of the GALNT family may stimulate the O-glycosylation. However, we observed that miRNA-30c might modulate GALNT7 expression and can be a new potential target for diagnosis and therapeutic via modulation of the expression of glycosylation genes. Among the clinocopathologic data, only GalNAc expression and tumor size present a correlation. Patient's survival curve did not present correlation with tumor molecular subtyping, clinic staging, age and tumor size. Our results suggest that miRNA-30c may be a potential regulator of the GALNT7 gene expression and so favoring a lower expression of the enzyme GALNAC7 leading to a lower insertion of the saccharide GalNAc in glycoconjugates of cell surface in invasive ductal carcinoma.

Key words: invasive ductal carcinoma, glycosyltransferase, miRNA-30c.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Marcos do Câncer (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000)	24
Figura 2.	Associação do crescimento tumoral com o tempo para diagnóstico e tratamento: a) biomarcador preditivo; b) biomarcador de detecção precoce; c) biomarcador de diagnóstico (estadiamento clínico e histológico tumoral) e d) biomarcador de monitoramento da doença e avaliação de tempo de sobrevida. (Adaptado de Levenson et al, 2007)	26
Figura 3.	Critérios para classificação dos biomarcadores. (Adaptado de Mishra e Verma, 2010)	27
Figura 4.	Taxa de incidência de câncer de mama, por região, para o ano de 2016/ 2017 no Brasil. (Fonte: INCA, 2016).	29
Figura 5.	Ilustração da heterogeneidade dos carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos da superfície celular (Adaptação de Ghazarian; Idonil; Oppenheimer, 2011)	33
Figura 6.	Tipos de ligação que acontecem na glicosilação celular, demonstrando a N-glicosilação e a O-glicosilação (Adaptado de Varkiet al, 2009)	34
Figura 7.	Sequência de carboidratos que constituem o início da O-glicosilação tipo mucina. (Adaptado de Varkiet al, 2009)	35
Figura 8.	Esquema exemplificando um processo de glicosilação tipo N-ligado de proteínas ainda no Retículo Endoplasmático Rugoso (Adaptado de Potapenko et al, 2010)	36
Figura 9.	Finalização da N-glicosilação no complexo de Golgi formando glicoconjugados Oligomanose, Complexos e Híbridos (Adaptado de Rosnoblet et al, 2013)	37
Figura 10.	Mecanismo de progressão e metástase tumoral diante de alteração na O-glicosilação tipo mucina versus epitélio com expressão normal de mucinas (Adaptado de Varki et al, 2009)	37
Figura 11.	Interação das lectinas e carboidratos na superfície celular e o reconhecimento de patógenos (Adaptado de Sharon e Lis, 2004)	39
Figura 12.	Envolvimento dos microRNAs na regulação dos hallmarkers do câncer (Adaptado de Ruan, Fang, Ouyang, 2009)	40
Figura 13.	Histoquímica com VVA. A/A1: CDI de grau histológico II apresentou marcação citoplasmática difusamoderada (aumentos 10X e 40X, respectivamente); B/B1: tecido normal apresentou marcação apicalmoderada (aumentos 10X e 40X, respectivamente); C/C1: inibição da VVA com GalNAcem CDI (aumentos de 10X e 40X, respectivamente).	44
Figura 14.	Imuno-histoquímica para GALNT7. A: CDI de grau	53

histológico II apresentando marcação citoplasmática fraca (aumento 20X); **B**: CDI de grau histológico II apresentando marcação citoplasmática moderada (aumento 20X); **C**: tecido normal apresentando marcação fraca (aumento 20X); **D**: controle de marcação (ausência de anticorpo) de CDI grau histológico II (aumento 20X).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação de Scarff, Bloom e Richardson (modificada por Elston e Ellis em 1991)	30
Tabela 2	Perfis imunofenotípicos para a classificação por imuno-histoquímica dos tumores de mama.	32
Tabela 3.	Correlação entre dados clínico-histopatológicos versus expressão de GalNAc e GALNT7	55
Tabela 4.	Apresentação dos dados clínico-histopatológicos dos casos com aumento de expressão do gene GALNT7	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Apresentação da correlação estatisticamente significativa ($p=0,1022$) entre o carboidrato GalNAc e a proteína GALNAC 7 (teste estatístico Mann Whitney, GraphPad Prism 5)	56
Gráfico 2.	Apresentação da correlação estatisticamente significativa ($p<0,0001$) entre os subtipos moleculares e controles livres de doença (controle normal) diante da expressão quantitativa do gene GALNT7 em tumores CDI mamários (teste estatístico Kruskal-Wallis, GraphPad Prism 5)	57
Gráfico 3.	Apresentação da correlação estatisticamente significativa ($p<0,0001$) entre os subtipos moleculares diante da expressão quantitativa do gene GALNT7 em tumores CDI mamários (teste estatístico Kruskal-Wallis, GraphPad Prism 5)	58
Gráfico 4.	A. Correlação estatística significativa dos casos livres de doença ($p=0,0288$); B. Correlação estatística significativa dos subtipos moleculares triplo negativo ($p<0,001$); C. Correlação estatística significativa dos subtipos moleculares Luminal B/Her2+ ($p=0,0146$) e D. Correlação não significativa entre os subtipos moleculares Superexpressão de Her2 ($p=0,0650$). Todos os testes foram feitos utilizando o teste estatístico Mann Whitney, GraphPad Prism 5	60
Gráfico 5.	Apresentação da correlação estatisticamente significativa ($p<0,0001$) diante da análise de expressão do gene GALNT7 e miRNA 30c em amostras de CDI mamário (teste estatístico Mann Whitney, GraphPad Prism 5)	61
Gráfico 6.	Apresentação da correlação estatisticamente significativa ($p<0,0001$) entre os 4 tipos de moléculas analisadas em tumores mamários humanos pareadas (teste estatístico Kruskal-Wallis, GraphPad Prism 5)	62
Gráfico 7	Curva de sobrevida ($n=183$) com os subtipos moleculares (A), Estadiamento Clínico (B), Idade (C) e tamanho do tumor (D) apresentando resultados não significativos em todos os casos (Kaplan Meier, GraphPad Prism 5)	63

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AFP: Alfafetoproteína

Asn: Asparagina

CDI: Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*

CEA: Antígeno Carcinoembrionário (do inglês *carcinoembriogenic antigen*)

CM: Câncer de Mama

CpGs: Ilhas citosina/guanina

EGFR: Receptor de crescimento epidermal tipo 1 (do inglês *epidermal growth factor receptor type 1*)

Fuc: L-fucose

Gal: Galactose

GALNAC: galactosiltransferase (do inglês galactosyltransferase)

GalNac: N-Acetil- α -D-Galactosamina (do inglês N -Acetyl- α -D galactosamine)

GALNT7: gene galactosiltransferase 7 (do inglês galactosyltransferase 7 gene)

Glc: Glicose

GlcNac: N-acetil- α -D-glicosamina

HER 2: Receptor para o fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (do inglês *human epidermal growth factor receptor type 2*)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Ki 67: proteína nuclear Ki-67

LDH: enzima Desidrogenase Láctica (do inglês *lactate desidrogenase*)

Man: Manose

OMS: Organização Mundial da Saúde

PSA: Antígeno Prostático Específico (do inglês *prostatic specific antigen*)

RE: Receptor de Estrógeno

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

RP: Receptor de Progesterona

Sialil Tn: antígenos sialil Tn

Sia: Ácido Siálico (do inglês sialic acid)

TCGA: Plataforma do Cancer Genome Atlas

T ou TF: antígenos de Thomson-Friedrich

TMS: Teoria da Mutação Somática

Tn: antígeno Thomson-Nouvelle

TNM: Sistema de Classificação Histopatológica Tumoral (tamanho do tumor, invasão linfonodal e metástase)

VVA: *Vicia Villosa* Aggutinin

microRNA: miRNA

miRNA: microRNA

qRT-PCR: Reação de transcriptase reversa, seguida de Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*).

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Compreendendo o câncer: principais características e gênese tumoral	24
2.2 Biomarcadores oncológicos	26
2.3 Epidemiologia do câncer de mama e fatores de risco.....	29
2.4 Estadiamento histopatológico de tumores mamários	30
2.5 Classificação molecular das patologias mamárias	32
2.6 Glicosilação versus Progressão tumoral	33
2.6.1 Aspectos gerais da glicosilação	33
2.6.2 O-Glicosilação e progressão tumoral: produção de O- glicoconjugados tipo mucinas.....	38
2.6.3 Oncodiagnóstico: uso das lectinas como ferramentas biológicas	40
2.6.4 Histoquímica com lectinas.....	41
2.6.5 Lectina <i>Vicia villosa</i> Agglutinin (VVA)	42
2.7 microRNAs: biogênese e mecanismo de regulação.....	43
2.8 GALNT7 versus miRNA 30c: uma análise preditiva.....	45
3OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2Objetivos Específicos	47
4MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Casuística.....	48
4.2 Tissue Microarray (TMA).....	49
4.3 Histoquímica com lectinas.....	49
4.4 Imuno-histoquímica.....	40
4.5Análise digital de Imagens	50
4.6 Extração de RNA.....	51
4.7 qRT-PCR para GALNT7.....	51
4.8 qRT-PCR para miRNA-30c.....	52
4.9Análise <i>in silico</i>	52
4.10Análise estatística.....	52
5RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. ANEXOS.....	84
8.1 Artigo publicado.....	84
8.2Parecer Consubstanciado CCS/UFPE.....	91
8.3Parecer Consubstanciado AC Camargo.....	94

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde o câncer é um problema de saúde pública mundial onde se estima que 8,2 milhões de pessoas morrem por câncer no mundo (WHO, 2015). O tumor que mais acomete as mulheres em países em desenvolvimento e desenvolvidos é o Câncer de Mama (CM). No Brasil estimam-se para 2016 e 2017, 57.960 novos casos de CM por ano, com incidência de 56,2 casos novos de câncer de mama para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

O câncer é o resultado de um conjunto de alterações celulares, que levam a uma divisão celular sem controle, podendo invadir tecidos adjacentes ou distantes através da circulação sanguínea e do sistema linfático (INCA, 2016), apresentando um mecanismo de desenvolvimento bastante complexo. Sonnenschein e Soto (2008) descrevem a principal teoria da carcinogênese, a Teoria da Mutação Somática (TMS), que defende o surgimento do câncer a partir de uma única célula somática que sofre múltiplas mutações em seu DNA, descontrolando assim, o ciclo de proliferação celular. Os mesmos sugerem as teorias de Desorganização Tecidual e Teoria Híbrida que relacionam a TMS com o conceito que o câncer é também dado inicialmente pela desorganização tecidual (SONNENSCHIN; SOTO, 2008).

Entretanto, o processo da carcinogênese pode também ser examinado e caracterizado mais amplamente no contexto da perda de controle da homeostase na arquitetura tecidual, atipia celular, destruição das camadas de revestimento, mudanças na estrutura do estroma, angiogênese e metástase (CUNHA *et al*, 2004). Muitas destas características são também resultantes de mecanismos alterados de expressão de proteínas e glicoconjugados celulares que proporcionam alterações nas vias de sinalização, havendo mudanças no microambiente tumoral, que favorecem, na maioria das vezes, o desenvolvimento do tumor e metástase (KARAVANI, 2013; CHRISTIANSEN *et al*, 2014).

Estes glicoconjugados apresentam uma alta variação estrutural quanto aos seus resíduos de carboidratos os quais são expressos diferentemente entre espécies, tecidos e grau de maturação celular (SCHJOLDAGER, CLAUSEN, 2012). A inserção e/ou retirada dos carboidratos nos

glicoconjugados é um evento bioquímico denominado de glicosilação. Este é um dos mais importantes processos biológicos pós-tradução de modificação na estrutura e função de lipídios e proteínas, mediado por enzimas chamadas de glicosiltransferases e glicosidases (CHRISTIANSEN *et al*, 2014). A apresentação de glicosilação aberrante ocorre, geralmente, precocemente no processo de transformação e é importante para o diagnóstico e tratamento do câncer (POTAPENKO *et al*, 2010).

Dentro dos quatro tipos de glicosilação, dois tipos são mais comuns e envolvidos com o câncer. O tipo N-glicosilação, caracterizado pela ligação dos monossacarídeos no aminoácido asparagina da proteína e o tipo O-glicosilação, que promove ligação do arcabouço glicídico aos resíduos dos aminoácidos serina/treonina da proteína, existindo diferentes tipos incluindo a O-glicosilação tipo mucina que pode ser iniciada por uma N-Acetil- α -D-galactosamina (GalNAc), caracterizando os antígenos Tn (CORFIELD, 2014). Ambos os tipos de glicosilação estão relacionados com a estabilidade e dobramento das diferentes glicoproteínas formadas inicialmente no Retículo Endoplasmático Rugoso (RER).

Um tipo específico de enzima que atua no processo de O-glicosilação para formação do antígeno Tn, são as galactosiltransferases (GALNACs), codificada pela família de genes GALNTs e que inserem especificamente os resíduos de carboidratos N-Acetil- α -D-Galactosamina (GalNAcs) (PARK *et al*, 2010; SCHJOLDAGER; CLAUSEN, 2012). Para identificação da GalNAc e dos mais diversos tipos de monossacarídeos em tecidos normais e transformados, há uma família de moléculas glicoproteicas ubíquas utilizadas como ferramenta biológica denominadas de lectinas (FERREIRA *et al*, 2010). Como componente deste grupo de moléculas a lectina *Vicia Villosa* Aggutinin (VVA) é específica para reconhecer carboidratos do tipo N-Acetil- α -D-galactosamina (antígeno Tn) (KOROURIAN *et al*, 2008).

Há pequenas moléculas não codificantes de proteínas que atuam como reguladores da expressão gênica, denominadas de microRNAs (miRNA). Estas moléculas atualmente são vistas como inibidores da expressão de RNAs mensageiros (mRNA) ou promotores da degradação destas moléculas, favorecendo um erro ou não produção das proteínas/enzimas de glicosilação e

modificando toda biologia celular, tornando-se alvo para diagnóstico e terapia no câncer (KASPER et al, 2014).

Assim, este trabalho se propõe pesquisar a expressão do miRNA 30c e seu envolvimento na modificação da glicosilação tumoral mediada pela galactosiltransferase 7 (GALNAC7) no carcinoma ductal invávido mamário (CDI) e suas possíveis correlações clínicopatológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Compreendendo o câncer: principais características e gênese tumoral

No século passado, Bishop e Weinberg (1996), já apresentavam o câncer como uma doença que envolve uma série de alterações genômicas que apresentavam uma exacerbação na produção de oncogenes e uma supressão na expressão de genes supressores de tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Atualmente, o câncer pode ser entendido como um conjunto de mais de 100 tipos de doenças das quais as células sofrem inicialmente alterações genéticas, dividindo-se segundo seu próprio controle, podendo conseqüentemente invadir tecidos adjacentes ou distantes através da circulação sanguínea e do sistema linfático (INCA, 2016).

Essas doenças apresentam-se de maneira diferenciada diante de uma vasta complexibilidade molecular e de vários mecanismos adaptativos que dificultam a obtenção do total entendimento sobre o câncer no organismo. Atualmente são descritos seis características-chave que influenciaram e definem as mudanças biológicas que acontecem durante o desenvolvimento e progressão tumoral. Elas foram descritas por Hanahan e Weinberg em 2000 e são conhecidas como os *hallmarks of cancer* (marcos do câncer) (Figura 1).

Além do poder de replicação descontrolada, fuga a apoptose, evasão de agentes supressores, produção de fatores angiogênicos e poder de invasão e metástase, outras quatro características foram sugeridas posteriormente por Hanahan e Weinberg, em 2011, tais como: a grande instabilidade genômica e mutação, desregulação do metabolismo energético celular, fuga da destruição imune e promoção de mecanismo inflamatório foram incluídas como outros marcos do câncer. Compreendendo que todos estes mecanismos são mediados por alterações da expressão de inúmeros oncogenes e supressores de tumor, que desencadeiam uma sequência de alterações moleculares nas células tumorais.

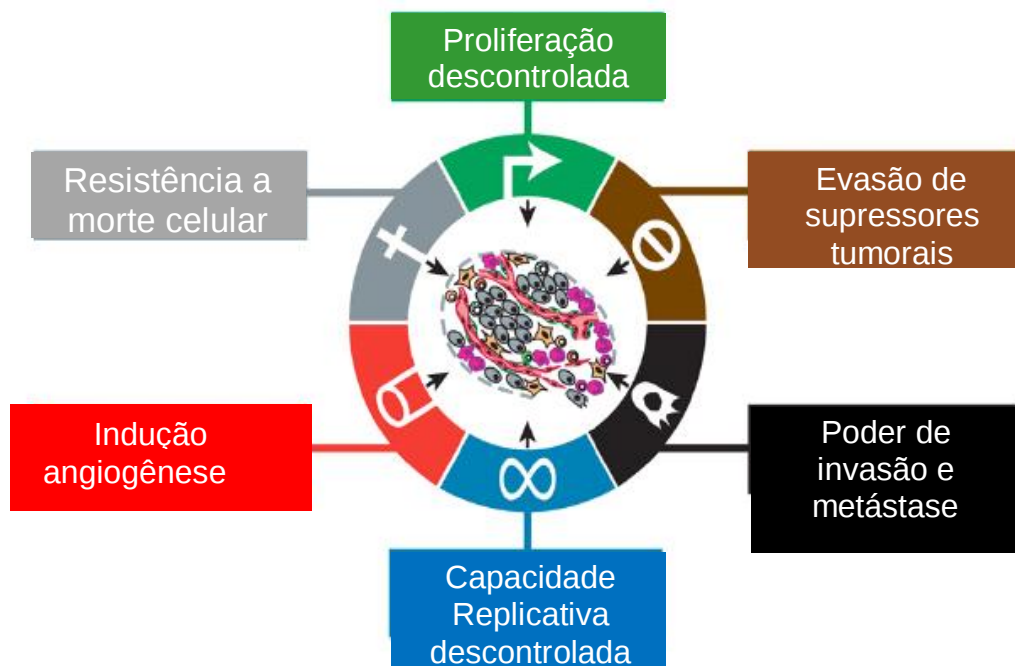


Figura 1: Marcos do Câncer (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000).

O câncer tem seu desenvolvimento sendo investigado constantemente e teorias tem sido propostas. Sonnenschein e Soto (2008) sumarizaram a principal teoria da carcinogênese, a Teoria da Mutação Somática, que defende o surgimento do câncer a partir de uma única célula somática que sofre múltiplas mutações em seu DNA. Os mesmos sugerem uma nova teoria que preconiza que o câncer é um problema de organização tecidual, comparado a organogênese que acontece durante o desenvolvimento embrionário e que a proliferação é um estado defeituoso de todas as células.

Há ainda a Teoria Híbrida que aponta alterações acima do nível nuclear, defendendo que este não é o único caminho para se entender a carcinogênese. Essa teoria relaciona a Teoria da Mutação Somática com o conceito que o câncer é também fruto da desorganização tecidual que leva a adaptações metabólicas (SONNENSCHIN; SOTO, 2008). Porém, há vertentes de estudos que colocam como principal causa do câncer os distúrbios no metabolismo celular (BENEDETTINI; NGUYEN; LODA, 2008; FURUTA *et al*, 2010). Silva, Serakides e Cassali (2004) apontam como uma das causas do câncer o descontrole hormonal que promove a perda da

homeostasia celular, sendo indutores da carcinogênese através de alterações metabólicas favorecendo uma predisposição às alterações genéticas.

Os processos anormais de modificação e multiplicação celulares estão diretamente ligados ao surgimento do câncer, relacionados às alterações genéticas, que comandam estes parâmetros. Entretanto, o processo da carcinogênese pode também ser examinado e caracterizado mais amplamente no contexto da perda de controle da homeostasia, atipia celular, destruição das camadas celulares de revestimento, mudanças no estroma, angiogênese e até metástase, além das alterações genéticas (CUNHA *et al*, 2004).

Estes mecanismos ocorrem por mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados celulares que proporcionam alterações nas vias de sinalização e mudanças no microambiente tumoral, muitas vezes favorecendo o desenvolvimento do tumor (SHIMMA *et al*, 2006; KOPF; ZHARHARY, 2007). Neste contexto os glicoconjugados apresentam uma alta variação estrutural quanto aos seus resíduos de carboidratos os quais são expressos diferentemente entre espécies, tecidos e grau de diferenciação (KARAVANI, 2013).

Provavelmente, a glicosilação molecular é o principal mecanismo que está relacionado com a modificação precoce da estrutura de glicoconjugados da superfície de células transformadas, apresentando alterações que motivam e/ou promovem a gênese e progressão tumoral (POTAPENKO *et al*, 2010).

2.2 Biomarcadores oncológicos

Em 1847, o pesquisador Sir Bence identificou uma proteína na urina de pacientes com Mieloma Múltiplo, denominada de proteína de Bence Jones. Esta descoberta foi o marco inicial para as pesquisas sobre novas moléculas que poderiam caracterizar estados normais e patológicos, denominadas posteriormente de biomarcadores e/ou marcadores biológicos (ALMEIDA *et al*, 2007).

Atualmente, biomarcadores são classificados como moléculas que tem como objetivo mensurar qualitativamente e quantitativamente um processo biológico normal, patológico ou a resposta à terapia farmacológica (MISHRA;

VERMA, 2010) e no câncer, onde diversos estudos são voltados para compreender a maquinaria biológica da célula neoplásica e desvendar moléculas alvo para diagnóstico precoce e tratamento (HANASH, BAIK, KALLIONIEMI, 2011; ANDORFER *et al*, 2011; KANG *et al*, 2012).

Estes biomarcadores, na oncologia, são importantes para avaliar parâmetros tais como: indivíduos com alto risco de desenvolver o câncer precocemente, prognóstico tumoral, formulação de terapias alvo, além de possibilitar o estadiamento clínico e patológico mais preciso, localizar metástases e até uma detecção precoce de recidiva tumoral (PARK, 2004; ALMEIDA *et al*, 2007; ANDRE *et al*, 2011; HAYES *et al*, 2014).

Além destas características, a busca de novas moléculas para prever a probabilidade de desenvolver tumor é um grande desafio quando a patologia em análise é o câncer. O diagnóstico precoce anterior à detecção de uma massa tumoral diagnosticável clinicamente é perseguido na clínica e na pesquisa científica, visto que proporcionará melhor prognóstico, valor preditivo e consequentemente qualidade de vida (LEVENSON, 2007) (Figura 2).

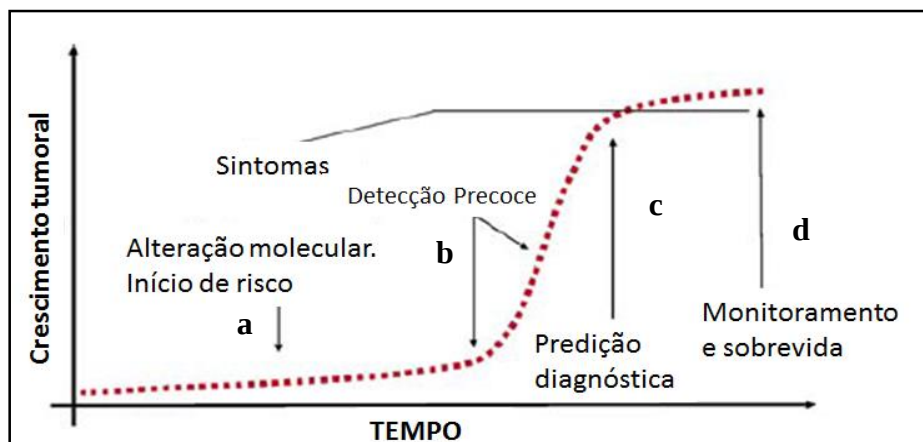


Figura 2. Associação do crescimento tumoral com o tempo para diagnóstico e tratamento: a) biomarcador preditivo; b) biomarcador de detecção precoce; c) biomarcador de diagnóstico (estadiamento clínico e histológico tumoral) e d) biomarcador de monitoramento da doença e avaliação de tempo de sobrevida. (Adaptado de Levenson *et al*, 2007).

Atualmente, há critérios para classificação dos biomarcadores tumorais (Figura 3), que são essenciais para acompanhamento dos indivíduos acometidos por tumores malignos, compreendendo que essas moléculas

podem ser provenientes de tecidos, sangue e outros fluidos biológicos (MISHRA; VERMA, 2010).

Há diversos tipos de biomarcadores descritos e utilizados na rotina clínica utilizando o sangue (soro) como a enzima Desidrogenase Láctica (LDH), Antígeno Prostático Específico (PSA), Antígeno Carcinoembrionário (CEA), alfafetoproteína (AFP) (DUFFY, 2006; HANASH; BAIK; KALLIONIEMI, 2011) e tecido tumoral proveniente de biópsias como Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), Receptor para o Fator de Crescimento Epidermal Humano do tipo 2 (HER-2), Vimentina e Citoqueratinas (WU *et al*, 2010; GOBBI, 2012) Também há pesquisa de expressão gênica para os genes BRCA1 e BRCA 2, PTEN, e genes que codificam as proteínas acima citadas (COYLE; JOHNSTON, 2010; MISHRA;VERMA, 2010)

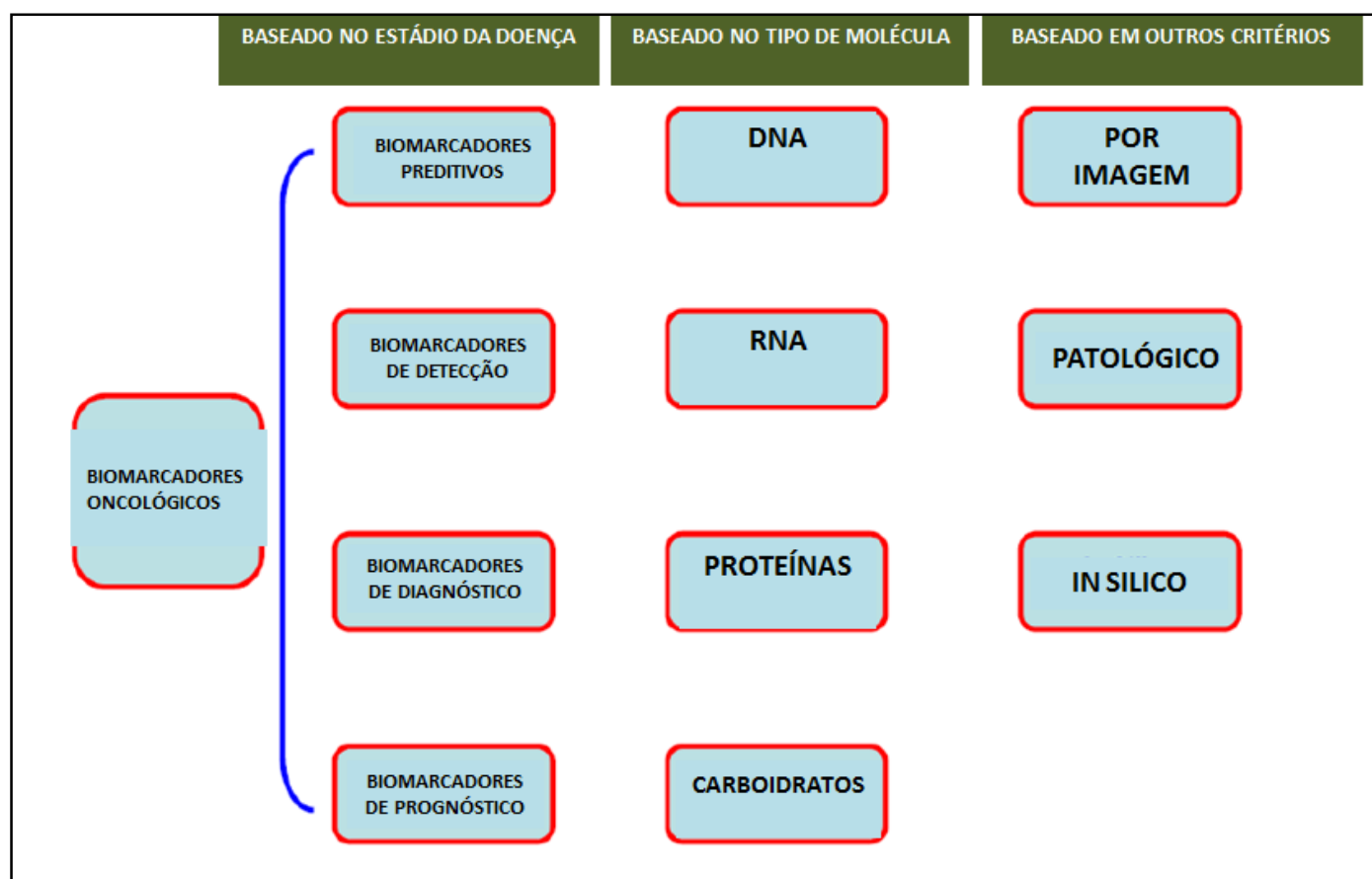


Figura 3. Critérios para classificação dos biomarcadores. (Adaptado de Mishra e Verma, 2010).

Um biomarcador válido deve apresentar um custo acessível, além de uma boa sensibilidade e especificidade (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008),

porém ainda não há biomarcadores 100% sensíveis e específicos utilizados no Brasil e no mundo, deste modo, percebem-se algumas dificuldades em diagnóstico, estratificação tumoral e monitoramento da terapêutica aplicada (MISHRA; VERMA, 2010).

2.3 Epidemiologia do câncer de mama e fatores de risco

O câncer é um problema de saúde pública no mundo. Em 2030, estima-se no Brasil 21,4 milhões novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por esta doença, diante do crescimento demográfico e envelhecimento da população (INCA, 2016).

O câncer de mama apresenta maior incidência mundial entre as mulheres (MUNGRUE, 2014). Também no Brasil os cânceres mamários lideram em quase todo o país, estimando-se 57.960 novos casos para os anos de 2016 e 2017 (Figura 4). Apenas na região Norte o CM não está em primeiro lugar, perdendo para Câncer de Colo de Útero. Pernambuco está em 2º lugar no Nordeste com a maior incidência de CM, apresentando 2.450 novos casos por 100.000 mil habitantes, perdendo apenas para Bahia com 2.560 novos casos por 100.000 mil habitantes (INCA, 2016).

Atualmente são considerados fatores de risco para o câncer de mama sedentarismo, tabagismo, hábitos alimentares e herança genética apresentando parentes de primeiro grau com câncer de mama e de ovário. Estes fatores devem ser trabalhados nas políticas de saúde para inferir diretamente nos dados epidemiológicos desta patologia de alta taxa de morbimortalidade (WHO, 2015; INCA, 2016).

	Brasil	Região Norte	Região Nordeste	Região Centro-Oeste	Região Sudeste	Região Sul
1º	Mama feminina (56,20)	Colo do útero (23,97)	Mama feminina (38,74)	Mama feminina (55,87)	Mama feminina (68,08)	Mama feminina (74,30)
2º	Cólon e Reto (17,10)	Mama feminina (22,26)	Colo do útero (19,49)	Colo do útero (20,72)	Cólon e Reto (22,66)	Cólon e Reto (23,27)
3º	Colo do útero (15,85)	Cólon e Reto (5,89)	Cólon e Reto (8,77)	Cólon e Reto (16,93)	Colo do útero (11,30)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (20,61)
4º	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,54)	Estômago (5,82)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (7,24)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (9,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (10,56)	Colo do útero (15,17)
5º	Estômago (7,37)	Traqueia, Brônquio e Pulmão (5,07)	Estômago (6,73)	Ovário (6,96)	Corpo do útero (9,58)	Estômago (8,71)

Figura 4. Taxa de incidência de câncer de mama, por região, para o ano de 2016/ 2017 no Brasil. (Fonte: INCA, 2016).

2.4 Classificação e Estadiamento histopatológico de tumores mamários

Atualmente há mais de 30 tipos de tumores mamários classificados histopatologicamente, de acordo com painéis de classificações histopatológicas já estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (GOBBI, 2012, INCA, 2016).

Vale salientar que mais de 80% dos tumores são classificados como carcinoma invasivo tipo não específico (tradicionalmente denominados de ductais) e o grupo de tumores chamado carcinoma invasivo especial (tradicionalmente denominados lobulares) que equivale a 8% a 15% dos casos de tumores mamários (INCA, 2016).

Para classificá-los histologicamente, fragmentos dos tumores são adquiridos através de métodos invasivos como as biópsias e/ou cirurgias e são analisados diante de três eixos que compõem um sistema de classificação conhecida como Sistema TNM desenvolvido por Pierre Denoix (França), entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1952) e que pode ser de classificação patológica(p) e clínica(c), avaliando a extensão anatômica e clínica da doença, através da análise dos pontos abaixo citados (INCA, 2016):

1. **T** - Extensão do Tumor Primário (tamanho do tumor);

2. **N** - Ausência ou presença de metástase em linfonodos locorregionais;
3. **M** - Ausência ou presença de metástase à distância.

No câncer de mama, a Classificação TNM tem suas particularidades para o estadiamento clínico de acordo com o INCA (2016).

Além do estadiamento que é dado pela a Classificação TNM, nos tumores mamários. Também há uso de outro tipo de Sistema Gradação Histológico conhecido como de Scarff, Bloom e Richardson (modificada por Elston e Ellis em 1991), que realiza um somatório dos pontos determinados na escala para avaliar o grau histológico de classificação, como abaixo descrito (DEROSS*et al*, 2003):

Ç3-5 pontos: grau 1 ou bem diferenciado;

Ç6-7 pontos: grau 2 ou moderadamente diferenciado;

Ç8-9 pontos: grau 3 ou pouco diferenciado.

Essa pontuação é dada diante do somatório dos valores dos 3 parâmetros histopatológicos analisados: formação tubular, características nucleares e contagem mitótica (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação de Scarff, Bloom e Richardson (modificada por Elston e Ellis em 1991).

Escala de subdivisão dos Carcinomas Mamários	
Formação Tubular	Escala
Maioria de tumor (>75%)	1
Grau moderado (10%-75%)	2
Pouca ou nenhuma (<10%)	3
Pleomorfismo Nuclear	
Núcleo pequeno, regular, uniforme	1
Moderado aumento no tamanho e variabilidade	2
Variação marcante, nucléolo presente	3
Contagem Mitótica*	
Índice baixo (0-10/10 campos)	1
Índice moderado (11-20/10 campos)	2
Índice alto (>21/20 campos)	3

Fonte: Adaptado de Derossi *et al*, 2003; Elston e Ellis, 1991.

2.5 Classificação molecular das patologias mamárias

Além da classificação histopatológica, é imprescindível, a realização da subtipagem molecular, que surgiu através de novas técnicas para análise molecular como os microarranjos de DNA complementar, realizando análise paralela de milhares de genes permitido correlacionar perfis de expressão gênica dos CM com a evolução clínica dos pacientes e com as respostas às terapias utilizadas (RAKHA *et al*, 2008).

Foram analisados mais de 8 mil genes, assim identificando-se alguns genes alvo com superexpressão em tumores mamários mesmo com classificação histopatológica diferente. Assim, houve a classificação dos subtipos moleculares do CM que são atualmente utilizados na assistência oncológica, denominados de: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basaloide e triplo negativo não basaloide ou mama-normal símile (Tabela 2) (PEROU *et al*, 2000). Mais recentemente, outro subtipo foi descoberto, denominado Claudin-Low (HERSCHKOWITZ *et al*, 2007).

Os subtipos moleculares são dados através da técnica de imuno-histoquímica, uma técnica atualmente simples que avalia a expressão de proteínas ou glicoproteínas (produto final da transcrição e tradução gênica) tais como: proteína Receptor de Estrógeno (RE), proteína Receptor de Progesterona (RP), proteína Receptor de Crescimento Epidermal Humano 2 (HER-2), além da citoqueratina 5, proteína Ki-67 e proteína Receptor de Crescimento Epidermal tipo 1 (EGFR) (CIQUEIRA *et al*, 2011) (Tabela 2).

Um novo subtipo molecular está sendo proposto, através de estudos sobre as proteínas de adesão como as Claudinas, Ocludinas e a E-caderina, denominado de Claudin-Low, porém novos estudos ainda são necessários para estabelecer um perfil imuno-histoquímico adequado (CIQUEIRA *et al*, 2011).

No Consenso de Saint-Gallen, evento internacional, bianual e que reuni grandes especialistas para discutir sobre as diretrizes de diagnóstico e tratamento do CM mundialmente, estabeleceu em 2011 a necessidade da subtipagem molecular utilizando análise imuno-histoquímica de expressão proteica, além de outros procedimentos para realizar diagnóstico e tratamento do CM, porém em 2015, na mesma reunião, este tipo de classificação

molecular perdeu força e há o estímulo para análise genética na determinação dos subtipos moleculares. (GOLDHIRSCH *et al*, 2011).

Estes subtipos moleculares são essenciais para diagnosticar e direcionar o tipo de tratamento que deverá ser aplicado em cada paciente. O tipo morfológico pode ser o mesmo, porém os subtipos moleculares diferentes, justificando os diferentes tratamentos, além de estimativas sobre o tempo livre da doença e prognóstico de paciente (GOBBI, 2012; PARK *et al*, 2012).

Tabela2: Perfis imunofenotípicos para a classificação por imuno-histoquímica dos tumores de mama.

Classificação com o índice de Ki-67	
Subtipo molecular	Padrão de Imunomarcacão
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 10 a 30%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 >30% ou RE+e/ou RP+, HER-2 (lumB-, Her2+)
Superexpressão de HER-2	RE-, RP- e HER-2+
Basaloide (basal-like)	RE-, RP-, HER-2-, CK5+ e/ou EGFR +
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER-2-, CK5- e EGFR-

HER-2: receptor do fator de crescimento epidérmico humanotipo 2; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmicotipo 1; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoqueratina 5. (Fonte: Adaptado de Ciqueira, 2011; St Galen, 2015).

2.6 Glicosilação versus Progressão tumoral

2.6.1 Aspectos gerais da glicosilação

Mais de 200 modificações pós-tradução acontecem após o processo de tradução proteica, finalizando o processo de maturação e funcionalidade destas moléculas (SCHJOLDAGER; CLAUSEN, 2012) (Figura 5). Dentre estes inúmeros processos, a glicosilação molecular destaca-se diante da sua complexidade e importância bioquímica (MAEDA; NISHIMURA, 2008; SCHJOLDAGER; CLAUSEN, 2012).

Essas modificações promovem várias influências moleculares, que participam do processo de reconhecimento de patógenos, reconhecimento celular, adesão celular, diferenciação e desenvolvimento embrionário, regulação e outros processos de comunicação celular (processos inflamatórios) e ainda em diversas patologias (ROSENFELD *et al*, 2007; MAEDA;

NISHIMURA , 2008; VALBUENA *et al.*, 2010) dadas de acordo com o tipo celular, etapa de desenvolvimento e diferenciação celular (CAZET *et al.*, 2010). A glicosilação além do papel estrutural aumenta a estabilidade proteica, protege as proteínas da proteólise e é importante para sua solubilidade molecular (ROSENFELD *et al.*, 2007).

In vivo as proteínas são glicosiladas pela ação de uma série de enzimas denominadas de glicosidases e glicosiltransferases, que tem função de retirar e adicionar carboidratos do arcabouço glicídico, respectivamente, resultando na variabilidade da estrutura de glicanos(ROSENFELD *et al.*, 2007).

Os carboidratos que participam da formação de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos), são encontrados fazendo parte de oligo ou polissacarídeos que formam uma cadeia linear ou ramificada de açúcares, composta freqüentemente por Manose (Man), L-fucose (Fuc), galactose (Gal), glicose (Glc), N-Acetil- β -D-Galactosamina (GalNAc), N- Acetil- β -D-glicosamina (GlcNAc) e ácido siálico (Sia) (Figura 5) . Estes carboidratos são presentes nos glicoconjugados, porém apresentam diferentes combinações, formando moléculas com diferentes sequências de carboidratos e consequentemente funções distintas (VALBUENA *et al.*, 2010).

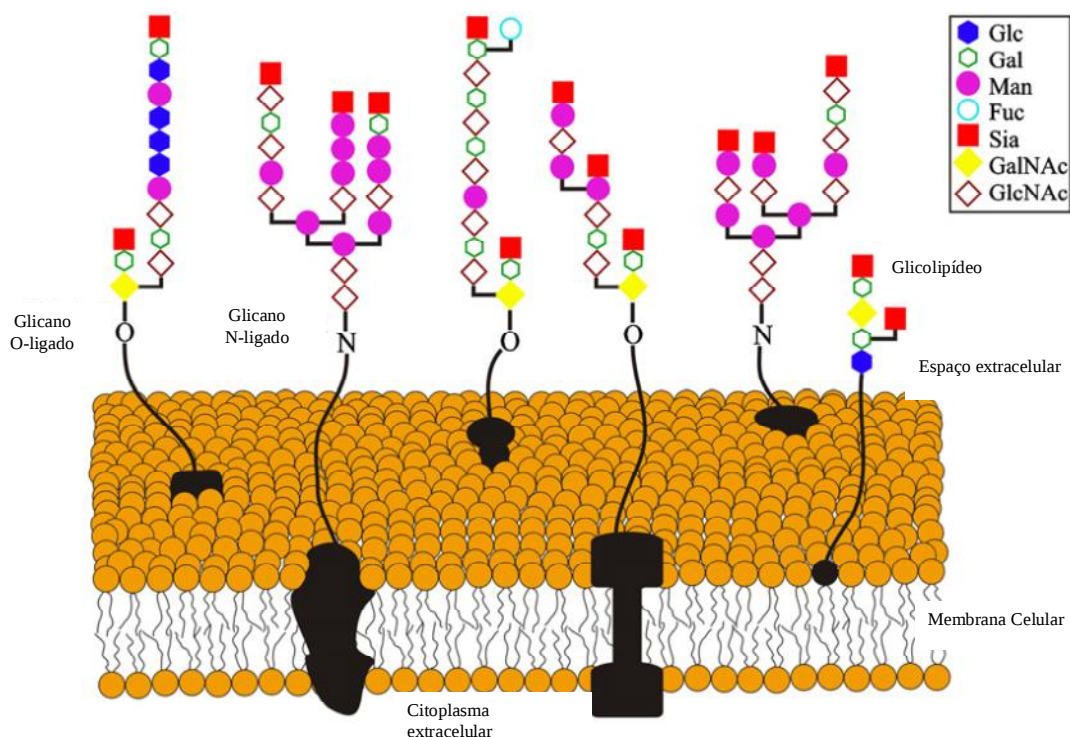


Figura 5. Ilustração da heterogeneidade dos carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolipídeos da superfície celular (Adaptado de Ghazarian, Idonil, Oppenheimer, 2011).

O tipo de ligação mais comum no processo de glicosilação celular é do tipo N-ligado, que apresenta ligações grandes e complexas, contendo várias ramificações (POTAPENKO *et al*, 2010). Esta ligação é dada pela ligação do carboidrato ao grupamento amina livre pertencente ao radical do aminoácido asparagina (Asn) (Figura 6). Outro tipo de ligação é a O-glicosilação, que promove ligação do grupamento hidroxila livre do radical dos aminoácidos serina (Ser) ou treonina (Thr) ao arcabouço glicídico, existindo assim diferentes tipos (Figura 6) incluindo a O-glicosilação tipo mucina que pode ser iniciada por uma GalNAc, apresentando vários núcleos O-glicídicos no tecido normal (Figura 7) (BROCKHAUSEN; SCHACHTER; STANLEY, 2009). Ambos os tipos de glicosilação estão relacionados com a estabilidade e dobramento das diferentes glicoproteínas (PARK *et al*, 2010, SCHJOLDAGER; CLAUSEN, 2012).

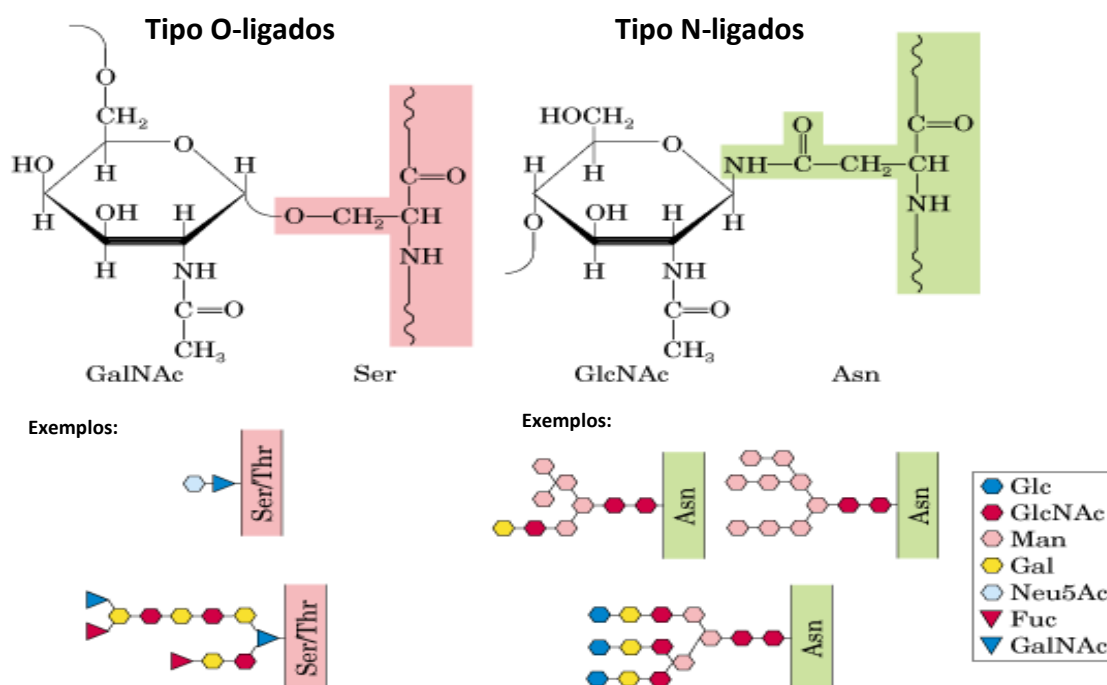


Figura 6: Tipos de ligação que acontecem na glicosilação celular, demonstrando a N-glicosilação e a O-glicosilação (Adaptado de Varkiet *al*, 2009).

Geralmente, a biossíntese de todos os glicoconjugados inicia-se com a formação de um precursor glicídico, ligação ao complexo dolicol-pirofosfato, na membrana do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) formado por duas moléculas de GlcNAc e 5 moléculas de Man, que é internalizado para o lúmen do RER (Figura 8) dando continuidade ao processo de inserção dos resíduos de carboidratos, mediados por enzimas glicosiltransferases codificadas pela família de genes ALG (glicosilação asparagina-ligado). Ainda no RER há um processo de encurtamento dos glicoconjugados e encaminhamento para o complexo de Golgi, passando pelas diferentes cisternas que compõem a organela e sofrendo atuação das enzimas que atuam na glicosilação molecular, finalizando a glicosilação e direcionando o glicoconjugado formado para suas funções específicas no organismo humano (Figura 9) (ROSNOBLET *et al*, 2013).

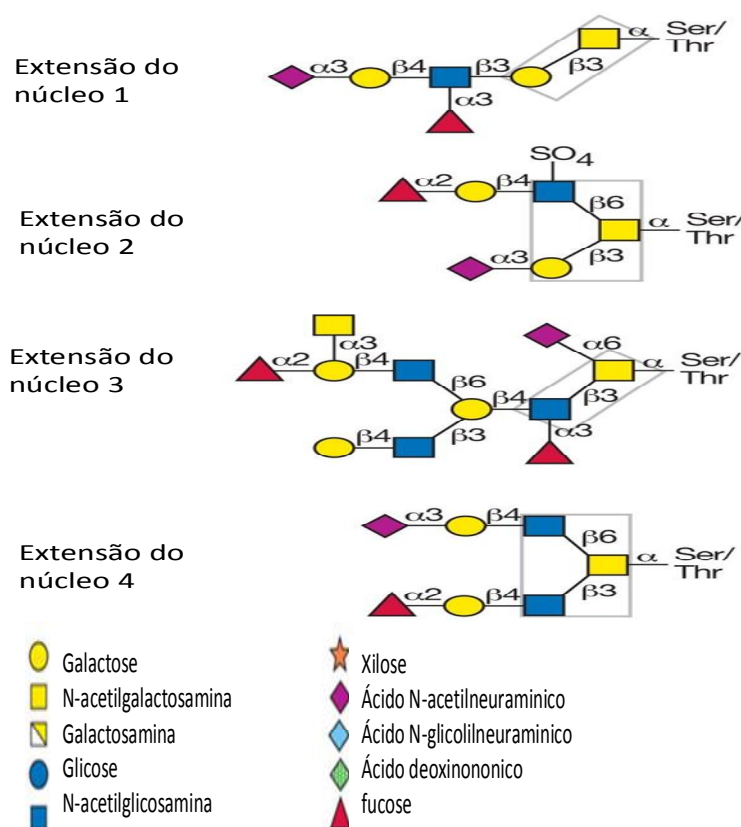


Figura 7. Sequência de carboidratos que constituem o início da O-glisosilação tipo mucina. (Adaptado de Varkiet *al*, 2009).

Porém, na O-glicosilação, o seu início é dado havendo a ligação direta, mediada por GALNACs, no Complexo de Golgi, dos carboidratos GalNACs aos resíduos de aminoácido serina e treonina, não necessitando do complexo Dolicol-pirofosfato para iniciar este tipo de ligação glicídica (CHUNG et al, 2015).

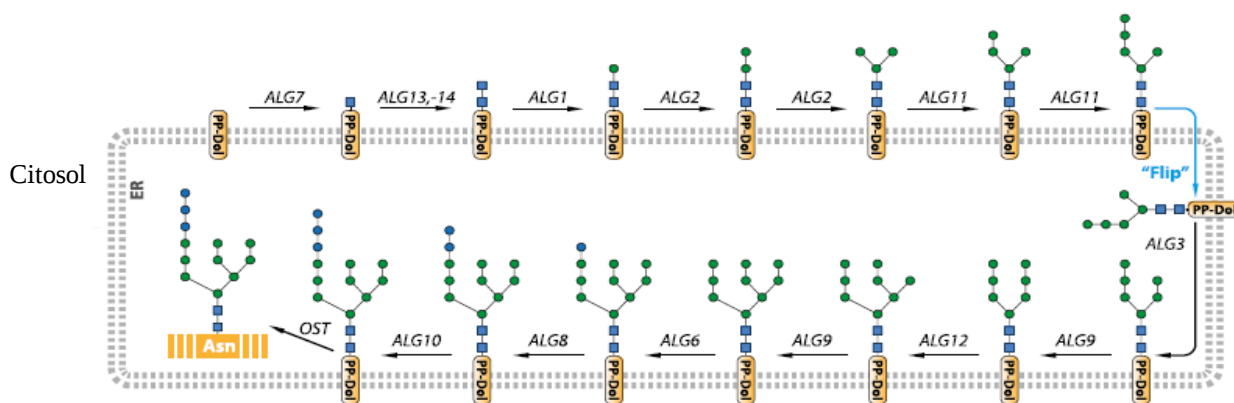


Figura 8. Esquema exemplificando um processo de glicosilação tipo N-ligado de proteínas ainda no Retículo Endoplasmático Rugoso (Adaptado de Potapenko et al, 2010).

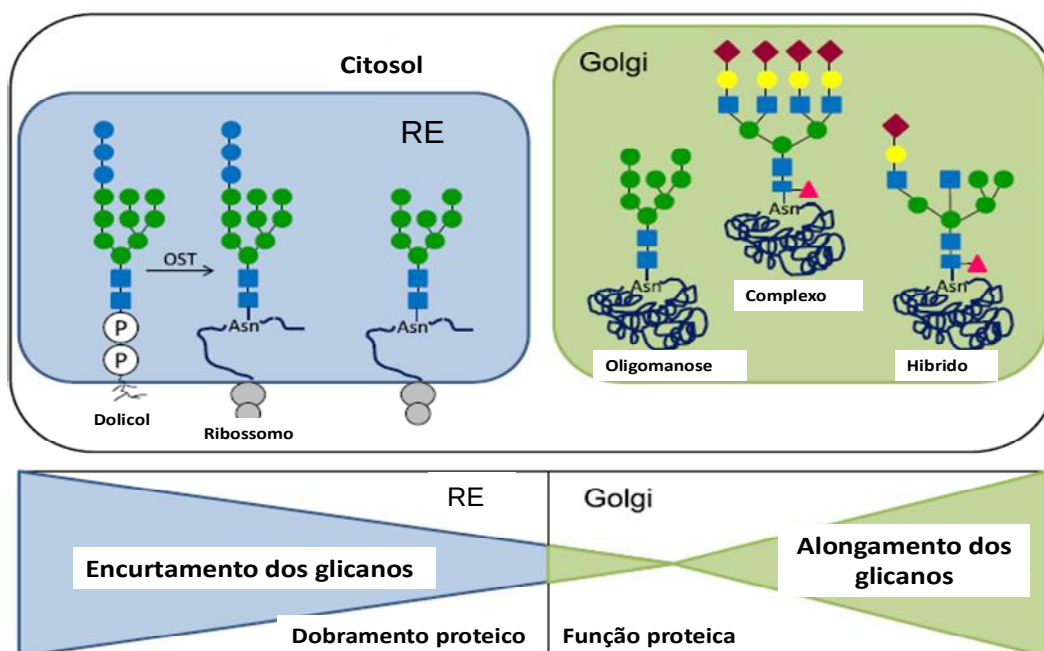


Figura 9. Finalização da N-glicosilação no complexo de Golgi formando glicoconjugados Oligomanose, Complexos e Híbridos (Adaptado de Rosnoble et al, 2013).

2.6.2 O-Glicosilação e progressão tumoral: produção de O-glicoconjugados tipo mucinas.

Diante de alterações pós-tradução no tipo O-glicosilação relacionadas a algumas patologias, as glicoproteínas podem apresentar-se de forma aberrante com o encurtamento (glicosilação truncada) das cadeias de glicanos (JOSHI *et al*, 2014). Estas alterações são mediadas, na maioria das vezes, por desregulação na expressão dos genes da família GALNTs, que codificam as enzimas GALNACs.

Em 1865 foi feito o primeiro relato sobre proteínas O-glicosiladas tipo mucinas, por E. Eichwald, um pesquisador Alemão (BROCKHAUSEN; SCHACHTER; STANLEY, 2009). As mucinas são glicoproteínas presentes em secreções mucosas e na membrana citoplasmática e estão envolvidas na proteção contra proteases (sistema imune), lubrificação, adesividade e diferenciação celular, e viscosidade das secreções (CORFIELD, 2014; CHUGH *et al*, 2015).

Como a maior parte das mucinas são tipo O-glicosilação, as enzimas que atuam diretamente para a produção deste tipo de glicosilação é responsabilidade da família de enzimas N-Acetil- β -D-galactosiltransferases (GALNACs) (POTAPENKO, 2010). Mas também as mucinas podem apresentar O-glicosilação iniciada por O-manose, O-fucose, O-glicose e O-galactose (BENNETT *et al*, 2012).

As estruturas O-glicosiladas truncadas iniciadas por GalNAcs são: (1) o antígeno Thomson-Nouvelle (antígeno Tn) apresentando a ligação GalNAc β -O-Ser/Thr, (2) antígeno de Thomson-Friedrich (antígeno T ou TF) com estrutura Gal β 1-3GalNAc β -O-Ser/Thr e (3) antígenos sialil Tn (antígeno STn) formado por Neu5Ac α 2-6GalNAc β -O-Ser/Thr (KARAVANI, 2013; CHUGH *et al*, 2015). Essas moléculas, quando truncadas, estão envolvidas diretamente na progressão tumoral mediada pela O-glicosilação, que é dado diante de uma alteração que promove o encurtamento das estruturas glicídicas, não formando assim os núcleos alongados O-glicosilados como mostrados na figura 9.

O mecanismo de O-glicosilação como alvo motivador de progressão tumoral é explicado por Varkiet *al*(2009), caracterizado por alterações na expressão das proteínas mucinas que promovem mudanças de carga

molecular em proteínas de adesão como caderinas e interinas, deste modo, desencadeia um mecanismo de repúdia entre as células. Este mecanismo classifica as mucinas truncadas como anti-adesinas, estimulando o desprendimento de células do tumor primário e contribuindo para o aumento do poder de metástase tumoral (Figura 10) (VARKI *et al*, 2009).

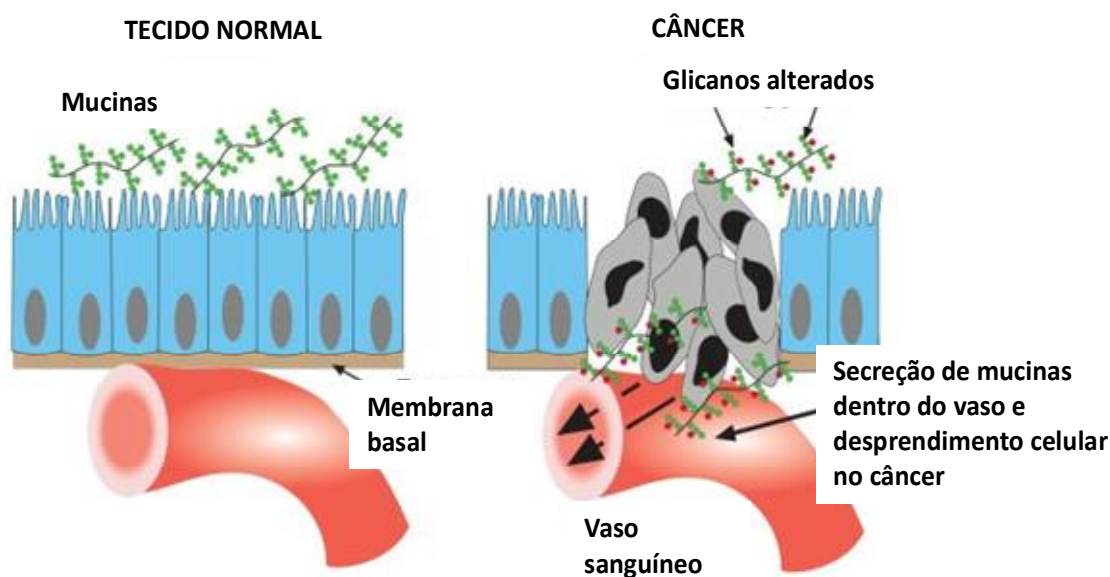


Figura 10. Mecanismo de progressão e metástase tumoral diante de alteração na O-glicosilação tipo mucina versus epitélio com expressão normal de mucinas (Adaptado de Varki *et al*, 2009).

Deste modo, as O-mucinas estão sendo usadas no diagnóstico clínico tumoral com a análise da Glicoproteína MUC1 que está diretamente relacionada à progressão de tumores mamários, principalmente do tipo histológico lobular que apresenta o aumento de expressão destas moléculas a nível intracelular (PARK *et al*, 2010). Além disto, as O-mucinas, tem sido alvo de muitas vertentes de investigação, principalmente com a intenção de novas estratégias para prevenção e terapia contra o câncer, pois algumas células carcinogênicas utilizam cadeias de carboidratos para escapar do reconhecimento imunológico, além de migrar através da corrente sanguínea (JANKOVIC, 2011).

2.6.3 Oncodiagnóstico: uso das lectinas como ferramentas biológicas

O termo lectina, refere-se a sua especificidade da reação, provém do latim *degere* que significa selecionado, escolhido (MAURYA *et al*, 2010). É uma família de proteínas reconhecedora de carboidratos que são classificadas dentro de um número de grupos específicos baseados na afinidade a monossacarídeos, dissacarídeos ou oligossacarídeos (ROSENFELD *et al*, 2007).

O início dos estudos com as lectinas ocorreu em 1888, quando Stillmark durante sua tese de doutorado observou que extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, tinham a capacidade de aglutinar eritrócitos (MORENO, 2008). Posteriormente, foi visto que as lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem estruturas de carboidratos livres ou conjugados, tem distribuição ubíqua na natureza incluindo seres vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus, e é diante deste mecanismo específico que elas favorecem a aglutinação eritrocitária (Figura 11) (WANG; LEE; SU, 2009; MAURYA *et al*, 2010).

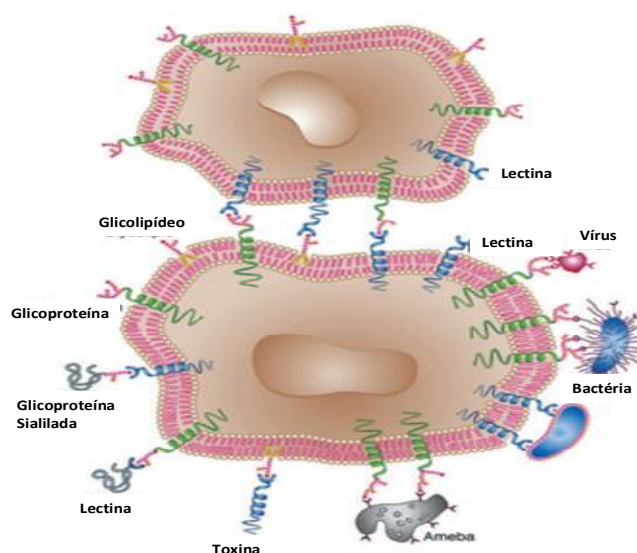


Figura 11. Interação das lectinas e carboidratos na superfície celular e reconhecimento de patógenos (Adaptado de Sharon e Lis, 2004).

O interesse nas lectinas intensificou-se quando se descobriu que elas podem ser sondas bioquímicas para investigação de glicanos de superfície celular, para determinação do papel na diferenciação e crescimento celular, nas interações de células com seu ambiente e também numa variedade de processos patológicos (SHARON, 2007).

As lectinas na oncologia estão sendo estudadas, além de moléculas para diagnóstico, também como alvo terapêutico, havendo aplicações em adenocarcinoma de cólon como molécula guia para medicamentos órgão específico (MAURYA *et al*, 2010; CHRISTIANSEN *et al*, 2014). Essas glicoproteínas têm sido usadas como sondas histoquímicas para caracterização de vários tipos celulares em várias etapas da diferenciação e maturação do câncer (LIMA *et al*, 2010). Também utilizadas para detectar alterações de glicoconjugados associados à hiperplasia e Adenocarcinoma de Próstata, Carcinoma de mama e Carcinomas de Pele (KOROURIAN *et al*, 2008; LIMA *et al*, 2010, FERREIRA *et al*, 2013).

2.6.4 Histoquímica com lectinas

As lectinas podem ser empregadas amplamente no estudo de glicanos através de métodos bioquímicos e histoquímicos (VALBUENA *et al.*, 2010). Em histoquímica, a aplicação das lectinas com diferentes especificidades pode fornecer um sistema de detecção sensível a mudanças na glicosilação e expressão de carboidratos que podem ocorrer durante a embriogênese, crescimento e em diversas doenças como o câncer (SOBRAL *et al*, 2010).

Mudanças na identidade sacarídica de células normais e malignas tem sido avaliada através da histoquímica com lectinas (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001, 2003), com a possibilidade de se estabelecerem como sondas de diagnóstico e/ou prognóstico para cânceres de mama, estômago, cólon, pulmão, próstata, pele, entre outros (BELTRÃO *et al.*, 1998, BELTRÃO *et al*, 2001; MELO JUNIOR *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006; MELO JUNIOR *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; RÊGO; BELTRÃO, 2009; FERREIRA, *et al*, 2013).

A histoquímica com lectinas baseia-se na ligação específica da lectina, geralmente conjugada com diferentes compostos, a uma estrutura glicídica

expressa na superfície celular. A maioria dos estudos utilizando histoquímica com lectinas em biópsias cirúrgicas refere-se a tumores derivados de tecidos epiteliais e mesenquimais, não somente pelo fato destes tumores serem de grande importância clínica, mas também porque a marcação com lectinas é particularmente satisfatória (TSAMBAOS *et al*, 1998; MELO JUNIOR, 2003; LIMA *et al*, 2010).

2.6.5 Lectina *Vicia villosa* Agglutinin (VVA)

A lectina *Vicia villosa* Agglutinin tem origem na semente da planta *Vicia Villosa* e foi descoberta em 1940, pelos pesquisadores William C. Boyd da Universidade de Boston e Karl O. Renkonen da Universidade de Helsinki (SHARON; LIS, 2004). É uma glicoproteína quaternária que apresenta 4 domínios de ligação com íons como Ca^{+} e Mn^{+} em sua estrutura, peso molecular entre 102 a 144 kDa e específica ao carboidrato GalNAc ligada a proteína através da ligação 1 U -O- serina/treonina, caracterizando o antígeno Tn (KAWAGUCHI *et al*, 2006). Essa lectina tem 4 isoformas VVA-B4, VVA-A2, VVA-A2B2, com predominância da isoforma VVA-A4, presentes na membrana dos eritrócitos de indivíduos do grupo sanguíneo tipo A (KAWAGUCHI *et al*, 2006).

VVA é utilizada em diversos estudos, caracterizando o perfil de expressão de carboidratos nos tecidos normais e transformados, averiguando-se uma constante modificação na expressão dos carboidratos 1, 3 N-Acetil- U -D-galactosaminaligados a resíduos de Serina (Ser)/Treonina (Thr), U GalNAc-O-Ser/Thr (antígeno Tn ou Thomsen-Nouvelle) (ITZKOWITZ *et al*, 1991; HIRAO *et al*, 1993; KOROURIAN *et al*, 2008, KHABAZ *et al*, 2010; SHERWANI *et al*, 2003).

Deste modo, essa lectina, apresenta-se como uma ferramenta para diagnóstico, classificação molecular através do perfil de expressão e até mesmo como alvo para fármacos em outros tumores malignos (GUILLOT *et al*, 2004; KAWAGUCHI *et al*, 2006; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

2.7 microRNAs: biogênese e mecanismo de regulação

Através de estudos genômicos, no ano de 1993, houve a descoberta de uma molécula de RNA não-codificadora chamada de Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*), apresentando uma pequena estrutura e que não se sabia ao certo qual sua função, apenas houve a associação com a regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódio (SHI & GUO, 2009; JANSON & LUND, 2012). Com o passar do tempo, foi visto que era uma molécula de fita simples, composta por 19 a 25 nucleotídeos e que não codificava proteínas e foi denominada de microRNA (miRNA) (ZHANG *et al*, 2014).

Há mais de 2.500 moléculas de miRNAs descritos, envolvidas na regulação da expressão gênica em um processo pós-tradução, em células normais e alteradas dos mamíferos, seres multicelulares e plantas (STROYNOWSKA-CZERWINSKA, 2014). Estas moléculas estão envolvidas em inúmeros processos biológicos como proliferação celular, alterações metabólicas, diferenciação e desenvolvimento celular, e apoptose (JANSON & LUND, 2012).

Muitos aspectos dos miRNAs ainda não estão totalmente esclarecidos, porém sabe-se que são provenientes da transcrição de RNAm pela enzima RNA polimerase II a nível nuclear, gerando uma molécula primária de miRNA, chamada de priRNA, contendo uma calda poliA. O miRNA primário tem uma estrutura com inúmeros nucleotídeos e um *hairpin* (grampo de cabelo). Ainda no núcleo há a ação da enzima ribonuclease DROSHA e seu co-fator DGCR8, clivando a molécula e formando um pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. O processo final de formação do miRNA é dado no citoplasma e a molécula é transportada através de transporte ativo pela proteína localizada na membrana nuclear Exportina-5 (Exp 5) (JANSSON & LUND, 2012).

A molécula é novamente processada no citoplasma por outra ribonuclease conhecida como DICER e há formação de uma molécula de fita dupla com o miRNA maduro e sua fita complementar. O miRNA maduro pode ligar-se por complementariedade na região 3' UTRs do RNAm, modulando assim sua expressão através da degradação ou inibição de transcrição proteica (HAYES, PERIZZI, LAWLERET, 2014).

Os miRNAs são evidenciados como moléculas envolvidas diretamente na regulação dos *hallmarks* do câncer evidenciados por Hanahan e Weinberg em 2011. O aumento da expressão de miRNAs pode servir como oncogene, favorecendo a supressão de expressão de genes supressores de tumor, amplificação gênica, desregulação de fator de transcrição ou demetilação das ilhas CpGs das regiões promotoras dos genes. Além destas alterações, os miRNAs podem atuar na regulação da proliferação de células neoplásicas, na apoptose de células tumorais, no poder de replicação sem limites, na angiogênese, na resposta imune, no poder de invasão e metástase, na instabilidade genômica e no metabolismo das células malignas (RUAN, FANG, OUYANG, 2009; HAYES, PERIZZI, LAWLERET, 2014) (Figura 12). Porém, compreende-se que o poder de regulação da expressão dos microRNAs varia de acordo com o tipo de tumor e gene específico (ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006; JANSON & LUND, 2012).

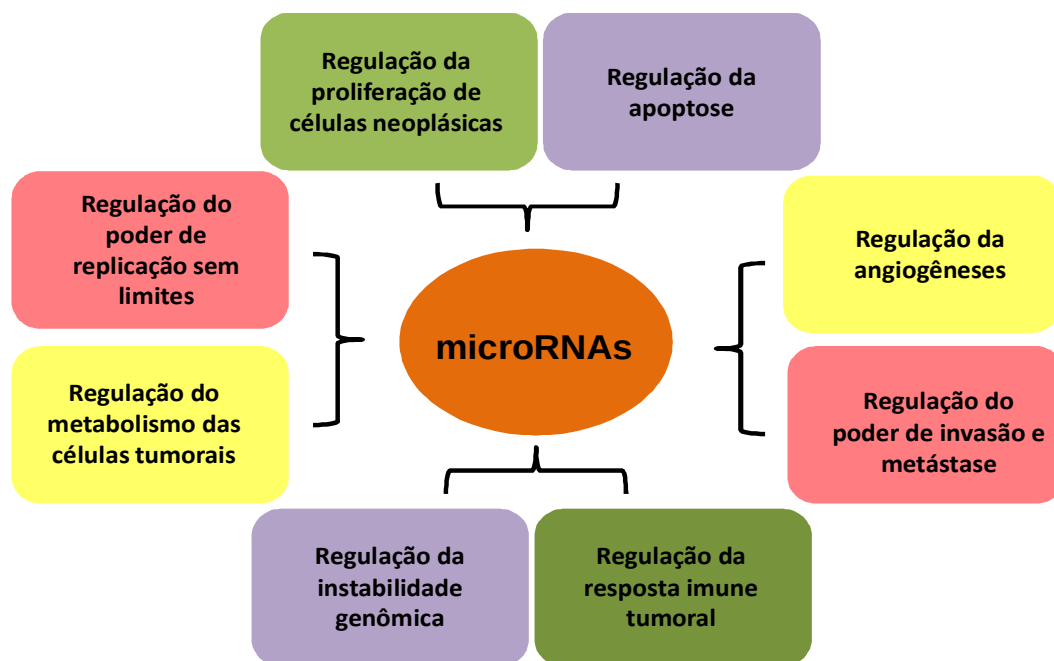


Figura 12. Envolvimento dos miRNAs na regulação dos *hallmarks* do câncer (Adaptado de Ruan, Fang, Ouyang, 2009)

Estas pequenas moléculas são apontadas como biomarcadores promissores teciduais e em fluídos corpóreos para diagnóstico e prognóstico de tumores, avaliação de remissão e recidiva tumoral e metástase. Na perspectiva de serem analisadas no sangue ou urina de pacientes, usadas na rotina clínica e como alvo terapêutico com nanopartículas e exossomos (HAYES *et al*, 2014; SCHWARZENBACH *et al*, 2014).

2.8 GALNT7 versus miRNA 30c: uma análise preditiva

Compreende-se a existência de 20 genes da família das GALNTs, genes que codificam galactosiltransferases e que atuam diretamente na glicosilação celular. Estes são localizados em diferentes *locus* cromossômicos, exceto os genes GALNT7 e GALNT17 que participam do mesmo cluster, separados apenas por 100kb e os genes GALNT11 e GALNT 20 separados por apenas 8,5kb. Eles são agrupados em subclassificações de acordo com sua evolução e estrutura molecular. E subdivididos como mais ubíquos (GALNT1, GALNT2 e GALNT7), mais seletivos (GALNT3, GALNT4, GALNT6, GALNT11, GALNT12, GALNT14, GALNT16 e GALNT18) e os com padrão de expressão mais restrito (GALNT5, GALNT8, GALNT9, GALNT10, GALNT13, GALNT15, GALNT17, GALNT19) (BENNETT *et al*, 2012).

Estes genes estão associados com expressão aberrante e estágios do desenvolvimento de tumores (SCHJOLDAGER, CLAUSEN, 2012), porém o gene GALNT7 especificamente chama a atenção de pesquisas e é evidenciado como molécula diretamente envolvida no processo de O-glicosilação truncada em tumores, promovendo a produção de glicoproteínas tipo O-mucinas alteradas e imunossupressão diante da sua regulação mediada por miRNAs em tumores e linhagens celulares (KAHAI *et al*, 2009; PENG *et al*, 2012). Este gene já é visto como alvo do miRNA 30b/d no melanoma e do miRNA 378 na diferenciação dos osteoblastos (KAHAI *et al*, 2009).

A família de miRNAs 30 tem 6 componentes denominados 30a/b/c/d/e/f. Os miRNAs componentes desta família são relacionados com diversos mecanismos biológicos e patológicos como a superexpressão do miRNA 30b em Câncer Oral de células escamosas (SHAO *et al*, 2012), miRNAs

30a/b/c/d/e nos diferentes tipos moleculares do câncer de mama (IORIO *et al*, 2013; GYPARAKI, BASDRA, PAPAVASSILIOU, 2014; SERPICO, MOLINO, DI COSIMO, 2014; SHUKLA *et al*, 2015), miRNA 30c na diferenciação das células neurais de ratos, miRNA 30b/c na resistência a terapia alvo com gefitinibe em tumores de pulmão (MACDONAGH *et al*, 2015), miRNA 30c como regulação da expressão de genes de hipóxia (XING, 2015), miRNA 30c como regulador de genes da apoptose e supressão tumoral alterando expressão da proteína p53 (RUAN, FANG, OUYANG, 2009; JANSSEN e LUNG, 2012) e miRNA 30c como potencial regulador de tumores de próstata (LING *et al*, 2014).

Porém não há na literatura estudos que abordem a regulação do gene GALNT7 pelo o miRNA 30c em tumores CDI mamários, mas há plataformas online para predição dessa possível correlação molecular de regulação gênica.

Através de análise da plataforma GENE do NCBI o miRNA 30c apresenta sequencias codificadoras nos cromossomos 1p34.2 e 6q13. Ao analisarmos especificamente a correlação do gene GALNT7 como possível alvo de miRNAS, é visto que a família dos miRNAS 30a/b/c/d/e/f estão localizados em sítio com alta probabilidade de regulação gênica, através da plataforma TargetScanHuman, versão 5.2: junho de 2011. Na análise *in silico* de expressão do gene GALNT7 em tumores mamários através da plataforma do Cancer Genome Atlas (TCGA) é visto uma baixa expressão deste gene, apresentando apenas 4% de superexpressão de 960 amostras de tecidos congelados (TCGA, 2015).

Estes dados favorecem novas hipóteses sobre a regulação da O-glicosilação em mucinas através da expressão do gene GALNT7 mediada pela expressão do miRNA 30c e no estudo de Andrade e colaboradores (2015) encontraram uma superexpressão do gene GALNT7 no carcinoma lobular mamário. Assim, diante da ausência de dados relacionando GALNT7 e miRNA 30c em Carcinoma mamário Invasivo de tipo não especial impulsionou o desenvolvimento desta tese.

3OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão do microRNA-30c e do gene GALNT7 em biópsias do tumor diagnosticados como carcinoma ductal invasivo (CDI).

3.2Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão do carboidrato N-Acetil- α -D-galactosamina(GalNAc) através da histoquímica com lectinas utilizando a lectina *Vicia Villosa* Agglutinin (VVA).
- Avaliar a expressão da enzima galactosiltransferase 7 (GALNAC7) em tumores malignos mamários, utilizando imuno-histoquímica com anti-GALNT7.
- Avaliar a expressão do gene GALNT7 e do miRNA30catravés de qRT-PCR;
- Subtipar os casos incluídos na pesquisa utilizando os biomarcadores utilizados na rotina diagnóstica: Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal tipo 2 (HER-2) e o antígeno de proliferação celular Ki-67;
- Correlacionar os resultados de expressão fenotípica e genotípica com os subtipos moleculares encontrados;
- Correlacionar os resultados de expressão genotípica e fenotípica com os dados clínico-histopatológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram analisadas 68 biópsias em parafina (56 amostras de carcinoma ductal invasivo de mama, CDI, e 12 amostras de mama normal obtidas de mastoplastia) oriundas do setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Também foram utilizadas 183 amostras congeladas de CDI mamário e 10 amostras de tecido mamário livre de doença; 95 amostras em parafina de CDI (sendo 41 não pareadas com as amostras do Biobank analisadas), além de 5 amostras de tecido mamário livres de tumor, provenientes do Hospital AC Camargo Cancer Center (SP).

Hospital das Clínicas de Pernambuco

56 biópsias embebidas em parafina de CDI mamário

12 biópsias embebidas em parafina de tecido livre de doença

Hospital AC Camargo Cancer Center/SP

183 biópsias congeladas de CDI mamário

10 biópsias congeladas de tecido livre de doença

95 biópsias embebidas em parafina de CDI mamário

5 biópsias embebidas de tecido normal

278 CDI e 15 amostras normais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (nº 06586612.9.0000.5208 parecer 305.232) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital AC Camargo Cancer Center (parecer 522.612). Os dados clínico-histopatológicos foram captados dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivamento Médico e Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas da UFPE e da Enfermeira Oncológica do Setor de Mastologia e na plataforma interna do Hospital denominada H₂TCdo

Hospital AC Camargo Cancer Center (SP). Foram listadas as seguintes informações: idade, diagnóstico histopatológico, estadiamento clínico e patológico, grau nuclear, tamanho do tumor (T), presença de invasão linfonodal (N), presença de metástase a distância (M), expressão de Receptor de Estrógeno (RE), de Receptor de Progesterona (RP), do antígeno de proliferação celular Ki-67 e de receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER-2), histórico familiar e último segmento terapêutico do paciente. Como critérios de inclusão foram selecionadas apenas amostras com diagnóstico confirmado de CDI. Amostras normais (livres de tumor) foram oriundas de mastoplastias e livres de metaplasias e/ou qualquer outra alteração morfológica, diante da possibilidade de alterações moleculares precoces na célula com alteração benigna. Os critérios de exclusão adotados foram amostras com diagnóstico histopatológico duvidoso ou com outro tipo de tumor diferente de CDI, dados clínico-patológicos incompletos, amostras normais com metaplasia ou outras alterações benignas.

4.2 Tissue Microarray (TMA)

Foi construído um Tissue Microarray (TMA) com 41 amostras de biópsias mamárias embebidas em parafina diagnosticadas com CDI e 5 amostras de tecido livres de neoplasia, provenientes do Hospital AC Camargo Cancer Center, de acordo com a técnica descrita por Kononen *et al.* (1998).

4.3 Histoquímica com Lectinas

A metodologia empregada foi desenvolvida segundo Beltrão *et al.* (2003). Cortes histológicos (4µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foram tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e incubados com a lectina conjugada a biotina *Vicia Villosa* Agglutinin (VVA - 20 µg/mL - Vector, USA) por 2 horas a 4°C. Posteriormente se incubou com solução de estreptavidina (1:100) por 45 minutos a 25°C. A revelação foi realizada com uma solução de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina. Todas as lavagens, entre as etapas descritas, foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 (PBS) suplementado com NaCl 150mM. O controle da marcação foi realizado com

lectinas inibidas por N-Acetil- β -D-Galactosamina (300mM) e com tecidos sem aplicação de lectina, como controle negativo.

4.4 Imuno-histoquímica

A metodologia utilizada foi segundo Vasconcelos, 2013. Cortes histológicos (4 μ m) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato a 10mM em câmara de vapor d'água (*STIMER*) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução 0,3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em metanol por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com tampão PBS-BSA 1% por 1 h a 25°C. Posteriormente foi realizada a incubação dos tecidos com o anticorpo policlonal anti-GALNAC7 (1:500 ã Sigma, USA), anti-progesterona (1:50 Santa Cruz, USA), anti-estrógeno (1:50 Santa Cruz, USA), anti-HER-2 (1:150, DAKO, USA) e anti Ki-67 (1:50 Santa Cruz, USA), incubados por 16 horas à 4°C, seguindo de incubação com o anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP LINK - DAKO) e terciário (ADVANCE™ HRP ENZIME - DAKO) por 45 minutos cada à 25°C. A revelação foi feita com DAB (diaminobenzidina)- H_2O_2 e realizada a contracoloração com hematoxilina. Todas as lavagens, entre as etapas descritas, foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 (PBS) suplementado com NaCl 150mM. O controle de marcação foi realizado omitindo-se o anticorpo primário e utilizando amostras de carcinoma cervical como controle positivo de marcação, seguindo as recomendações do fabricante do anticorpo.

4.5 Análise digital de imagem

As análises quantitativas e captação de imagens foram realizadas utilizando o equipamento AperioScanScope versão V10.0.36.1808 do Hospital AC Camargo Cancer Center. Utilizando como parâmetros de análise logaritmo com base em contagem positiva de pixel, considerando marcação forte de 0 a 110 pixels de intensidade de marcação, moderada entre 100 a 175 pixels e fraca entre 175 a 220 pixels. Também para aquisição de imagens foi utilizando um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico.

4.6 Extração de RNA e análise de expressão gênica

Os mRNAs e miRNAs foram extraídos com o kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) de acordo com o fabricante. Os RNAs foram quantificados no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop) e tratados com 2U de *Ambion® DNase* (Life Technologies) para um volume de 50 µL, segundo as instruções do fabricante. Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase, HPRT (5'-GGAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' e 3'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-5') foi usado como controle endógeno para a normalização dos mRNAs enquanto RNU6B, um *small-nucleolar* RNA (sequência não revelada pela empresa) foi usado como controle endógeno para a normalização do miRNA. Para a determinação dos valores de expressão relativa dos mRNAs/miRNAs de interesse, foram feitos os seguintes cálculos de $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene normalizador}} \text{ (para miRNA: RNU6B; para mRNA: HPRT)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$$

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Aos controles foram designados no valor 1 para o cálculo da expressão relativa das amostras. Assim, a expressão relativa da amostra foi obtida a partir da comparação dos níveis de expressão de cada um deles em relação ao controle normal.

4.7 qRT-PCR para GALNT7

Para a transcrição reversa (RT), foram utilizados os *Superscript III First Strand* (Life Technologies, USA) para miRNAs utilizando 500 ng de RNA total como molde. As amplificações em qRT-PCR foram feitas utilizando primers para amplificação dos transcritos dos genes GALNT7 (5'-GAGGCTTTGTTGAACTAGGA-3' e 3'-ACTTTCCTGAAGGAATATGAGT-5') e uso do kit *Kapa SYBR® FAST qPCR Master Mix* (Kapa Biosystems, USA), utilizando como controle endógeno o gene HPRT. Para análise dos resultados foram utilizados os cálculos de $\Delta\Delta Ct$ apresentados acima.

4.8 qRT-PCR para miRNA 30c

Foram utilizados para transcrição reversa os kits *miScript Reverse Transcription* (Qiagen, USA) para miRNAs utilizando 500 ng de RNA total. As expressões dos miRNAs foram avaliadas por qRT-PCR utilizando o kit *miScript SYBR Green PCR* (Qiagen, USA), que já contém os iniciadores para o miRNA30c (sequências não divulgadas pela empresa fabricante), segundo as instruções do kit e normalizadas utilizando como controle endógeno para miRNA o gene RNU6B, um *small nuclear RNA* (snRNA). Para análise dos resultados foram utilizados os cálculos de DeltaCt apresentados acima.

4.9 Análise *in silico*

Foi realizada utilizando a plataforma Cancer Genome Atlas (TCGA) para avaliar a expressão do gene GALNT7 em tumores mamários. A possível correlação entre a regulação da expressão do gene GALNT7 por miRNA-30c foi realizada na plataforma TargetScanHuman, versão 5.2.

4.10 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software, USA). As análises foram realizadas com nível de significância $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante da análise de expressão de GalNAc utilizando a histoquímica com a lectina VVA, utilizando 56 casos de tecidos embebidos em parafina, provenientes do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC), de CDI mamários, obtivemos o seguinte resultado: 21 casos (37,5%) com marcação moderada e 35 casos (62,5%) com marcação fraca, todos com heterogeneidade de marcação citoplasmática. Ao passo que os 95 casos de CDI mamário oriundos do Hospital AC Camargo Cancer Center, apresentaram 6 (14,48%) casos com marcação moderada e 89 (89,65%) casos com marcação fraca (Figura 13). Entre os 17 casos de tecido livres de tumor (ambos os hospitais), 100% apresentaram marcação moderada. A inibição da VVA com carboidrato específico aboliu as marcações observadas nos tecidos avaliados.

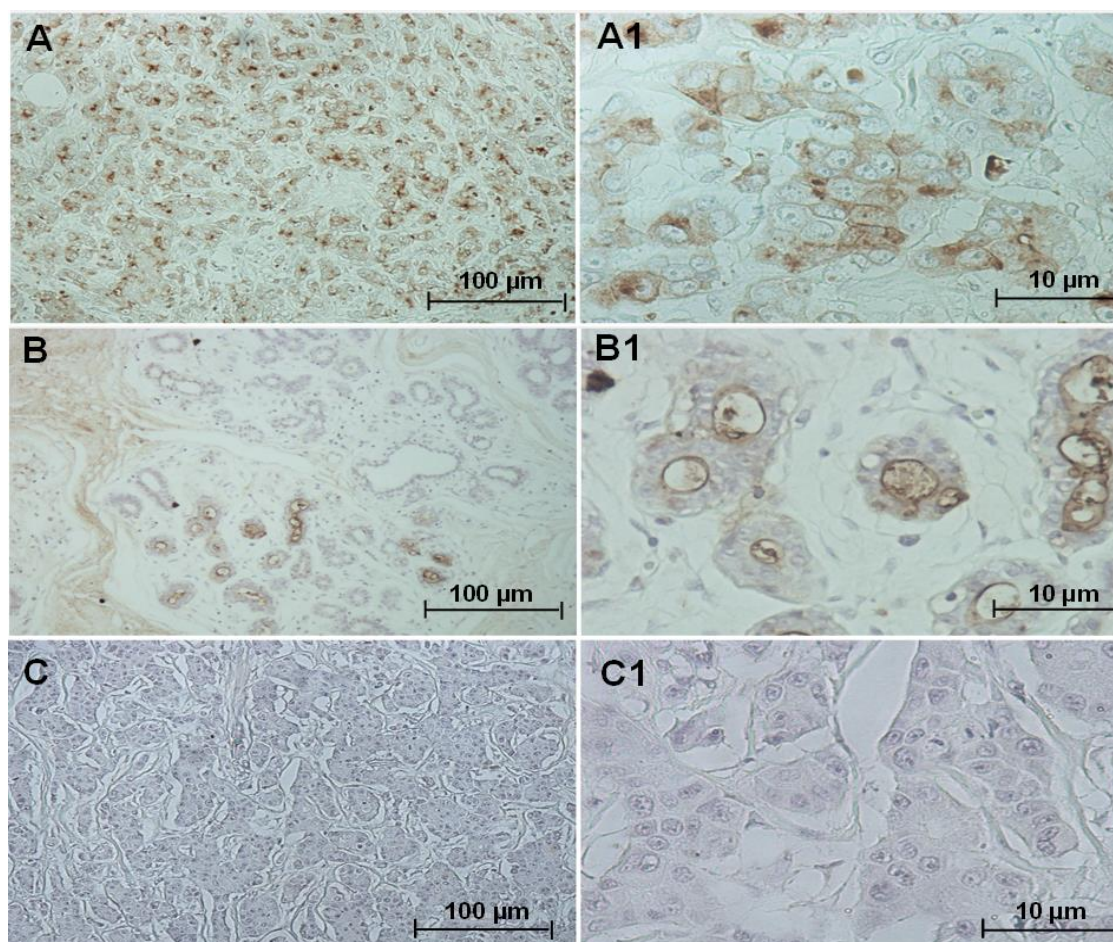


Figura 13. Histoquímica com VVA. A/A1: CDI de grau histológico II apresentou marcação citoplasmática difusamoderada (aumentos 10X e 40X, respectivamente); **B/B1:** tecido normal apresentou marcação

apicalmoderada(aumentos 10X e 40X, respectivamente); **C/C1**: inibição da VVA com GalNAcem CDI (aumentos de 10X e 40X, respectivamente).

A expressão de GALNT7, avaliada usando imunohistoquímica, nas 95 amostras de tecidos do Hospital AC Camargo Cancer Center, apresentou 16 casos com marcação moderada (16,84%) e 79 (83,16%) amostras com marcação fraca. Os cinco casos livres de tumor apresentaram marcação fraca em três casos e marcação moderada em dois casos (Figura 14).

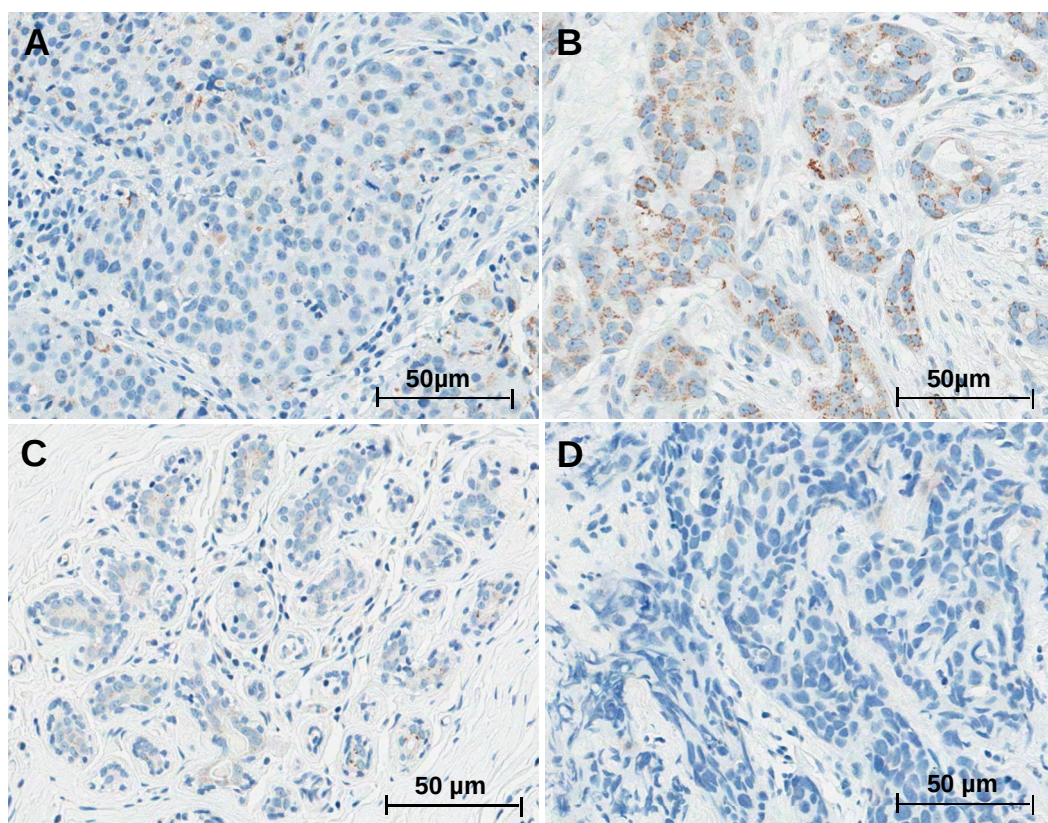


Figura 14. Imuno-histoquímica para GALNT7. **A:** CDI de grau histológico II apresentando marcação citoplasmática fraca (aumento 20X); **B:** CDI de grau histológico II apresentando marcação citoplasmática moderada (aumento 20X); **C:** tecido normal apresentando marcação fraca (aumento 20X); **D:** controle de marcação (ausência de anticorpo) de CDI grau histológico II (aumento 20X).

A correlação entre a expressão do carboidrato GalNAc e da proteína GALNAC 7 e os dados clinicopatológicos não foram significativas (Tabela 3). Exceto a correlação entre o tamanho do tumor e o carboidrato GalNAc ($p=0,036$).

Tabela 3: Correlação entre dados clínico-histopatológicos versus expressão de GalNAc e GALNT7.

CDI (n=151)		Histoquímica com <i>Vicia vilosa</i> (VVA)			Imuno-histoquímica Anti-GALNT7		
Dados Clinicopatológicos		Marcação fraca ^a n=124 (80%)	Marcação Moderada ^b n=27 (18%)	<i>p</i> *	Marcação fraca ^a n=81 (85,3%)	Marcação Moderada ^b n=14 (14,7%)	<i>p</i> *
Idade (anos)	<40	25	05	0,303	21	04	0,301
	≥40	98	21		75	10	
	NI	01	01		0	0	
Grau Histológico¹	I	04	01	0,170	04	0	0,243
	II	45	06		21	07	
	III	75	20		56	07	
Estadiamento tumoral²	I (A/B)	22	03	0,075	18	04	0,087
	II (A/B)	65	17		43	07	
	III(A/B/C)	31	07		15	03	
	IV	05	0		05	0	
Tamanho do tumor³	T1 (<2 cm)	28	07	0,036	24	05	0,075
	T2 (2-5 cm)	57	16		41	08	
	T3 (>5cm)	23	02		07	01	
	T4**	11	02		04	0	
	NI	05	0		05	0	
Invasão linfonodal⁴	Sim	62	17	0,152	35	04	0,318
	Não	56	05		40	09	
	NI	06	02		06	01	
Subtipo Molecular⁵	Luminal A/B	67	05	0,149	50	12	0,102
	Triplo Neg	24	06		14	01	
	LumB/Her2	16	08		10	01	
	Superexpressão						
	HER-2	17	07		07	0	

*Teste ANOVA, $p < 0,05$ ou 95%;

**extensão à parede torácica;

a: marcação fraca (175 a 200 pixels);

b: marcação moderada (100 a 175 pixels);

1: Classificação de Scarff, Bloom e Richardson (Derrosi, 2003);

2: de acordo com AJCC/UICC 2010 (INCA, 2014).

3-5: de acordo com INCA, 2014 e Consenso de Saint Gallen, 2015;

NI: Não Informado.

Os resultados da correlação entre a enzima GALNAC7e o carboidrato GalNAc apresentaram valores similares, ambas apresentando 95% com marcação fraca (175 a 200plxs) e 5% marcação moderada (100 a 175plxs), resultando em uma correlação não significativa estatisticamente (Gráfico 1).

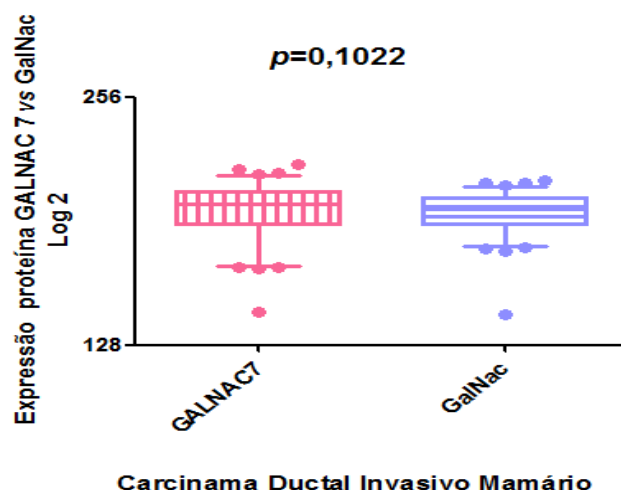


Gráfico 1: Avaliação da correlação entre a expressão da enzima GALNAC7 e a presença do carboidrato GalNAcem CDI (Teste Mann Whitney).

Assim, pesquisamos a expressão do gene GALNT7 por qPCR dos tumores mamários oriundos do biobank do Hospital AC Camargo. Os resultados de qPCR para GALNT7 (CDI, n=183 e tecidos livres de tumor=10) demonstraram 93,44% dos casos (171 amostras) com baixos níveis de expressão e apenas 6,56% (12 amostras) apresentaram maior nível de expressão gênica. Os 10 casos livres de tumor, apresentaram um aumento de expressão do gene GALNT7 em todos os casos.

Quando subdivididas de acordo com os subtipos moleculares (117 casos classificados como Luminal A/B; 34 triplo negativo, 23 Luminal B/HER-2+ e 8 Superexpressão de HER-2), a associação estatística entre os subtipos moleculares e os casos considerados livres de doença (controle normal), apresentou $p < 0,0001$ na variação de expressão do gene GALNT7 (Gráfico 2).

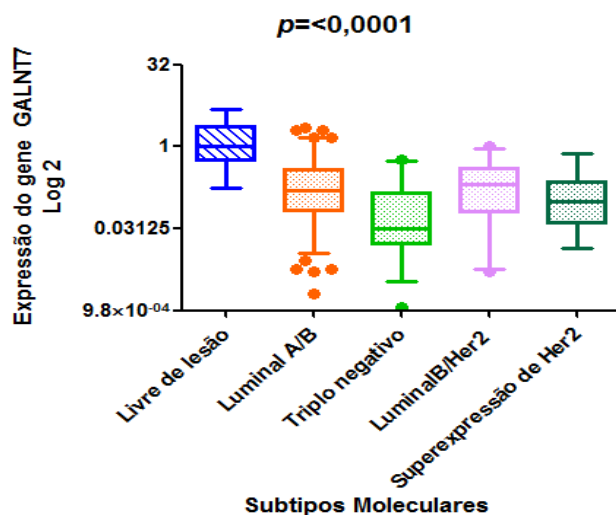


Gráfico 2: Avaliação da expressão do gene GALNT7 entre os subtipos moleculares de CDI e tecidos livres de tumor (controle normal) (Teste Kruskal-Wallis).

A análise apenas entre os subtipos moleculares (intra-CDI) apresentou resultado significativo ($p=0,0002$) quanto à expressão do gene GALNT7 demonstrando a diferença de expressão entre os subtipos moleculares (Gráfico 3).

Os casos Luminal A/B, luminal B/HER-2, triplo negativo e superexpressão de HER-2, quando comparados separadamente com o controle normal (tecidos livres de tumor) apresentaram $p=0,0001$, $p=0,003$, $p<0,0001$ e $p=0,009$, respectivamente.

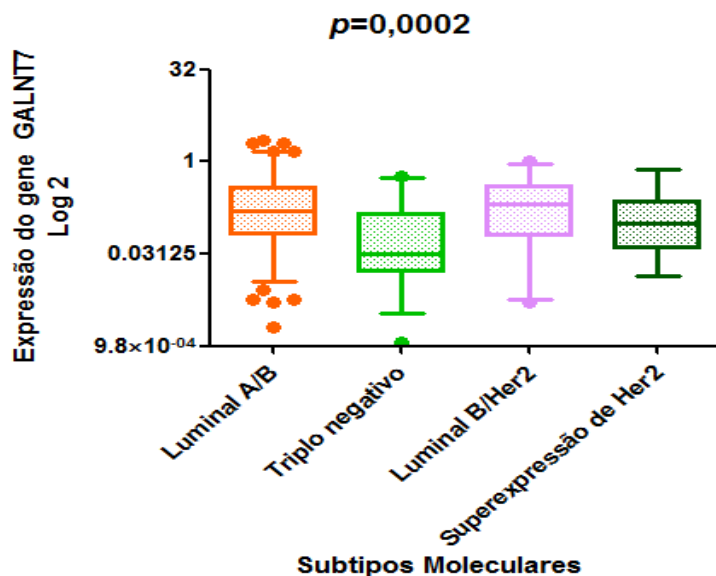


Gráfico 3: Avaliação da correlação da expressão do gene GALNT7 e os subtipos moleculares de CDI (Teste Kruskal-Wallis).

Na avaliação dos dados clínicopatológicos das 11 amostras de CDI que apresentaram aumento de expressão do gene GALNT7 (Tabela 4) não observamos um estadiamento diferenciado indicando um prognóstico reservado e um último segmento clínico com óbito dos pacientes. Foi visto que 10 dos 11 casos são do subtipo molecular Luminal A com estadiamento clínico entre II e os pacientes não apresentam metástase à distância e 66,66% dos pacientes estão vivos sem doença. Já 83,33% dos pacientes com aumento da expressão gênica apresentam estadiamento clínico II, porém apresentando variações em relação ao estadiamento TNM e grau histológico com suas variações de classificação. Pacientes que apresentaram histórico familiar de tumores malignos, 27,2% tem casos de tumores de mama ou ovário em parentes de primeiro grau.

Tabela 4: Apresentação dos dados clinicopatológicos dos casos de CDI com aumento de expressão do gene GALNT7.

Caso/RGH	Subtipo Molecular	I ¹	EC ²	GH ³	Último Segmento clínico	T ⁴	N ⁵	M ⁶	Histórico Familiar
10388520	Luminal A	32	2B	III	Vivo com doença	II	II	Neg	---
11464940	Luminal A	32	2B	III	Vivo com doença	III	0	Neg	---
50029465	Luminal A	44	2	II	Vivo sem doença	I	I	Neg	---
1043412	Luminal A	46	2	II	Vivo sem doença	II	0	Neg	---
50111744	Luminal A	69	2	III	Vivo com doença	II	0	Neg	Irmã: câncer de mama
9230300	Luminal A	58	2	III	Vivo sem doença	Ib	I	Neg	Pai: câncer de estômago
9283010	Luminal A	45	2	II	Vivo sem doença	Ib	0	Neg	---
6003214	Luminal A	55	2	II	Vivo sem doença	I	0	Neg	---
7017707	Luminal A	54	1	II	Vivo com doença	I	0	Neg	Mãe: câncer de bexiga
7088030	Luminal A	44	2	I	Vivo sem doença	II	0	Neg	---
7148840	Luminal A	64	2	I	Vivo sem doença	II	0	Neg	Tia materna: câncer de mama; Irmão: câncer de rins; Irmã: câncer de tireoide; Pai: linfoma de Hodgkin
10423150	Triplo negativo	55	2	III	Vivo sem doença	II	0	Neg	Irmã: câncer de mama

Legenda: 1.idade (anos);2.estadiamento clínico;3.grau histológico;4.tamanho do tumor; 5.envolvimento linfonodal; 6.presença de metástase.

A análise de expressão do miRNA 30c, através de qPCR nos casos que apresentaram os subtipos moleculares triplo negativo, Luminal B/Her2+ e Superexpressão de HER-2, mediante a homogeneidade de expressão do gene GALNT7, foi realizada em 55 amostras pareadas demonstrando associação significativa de diferença de expressão em todos os subtipos moleculares, exceto para o subtipo molecular Superexpressão de HER-2 ($p=0,0650$) (Gráfico 4).

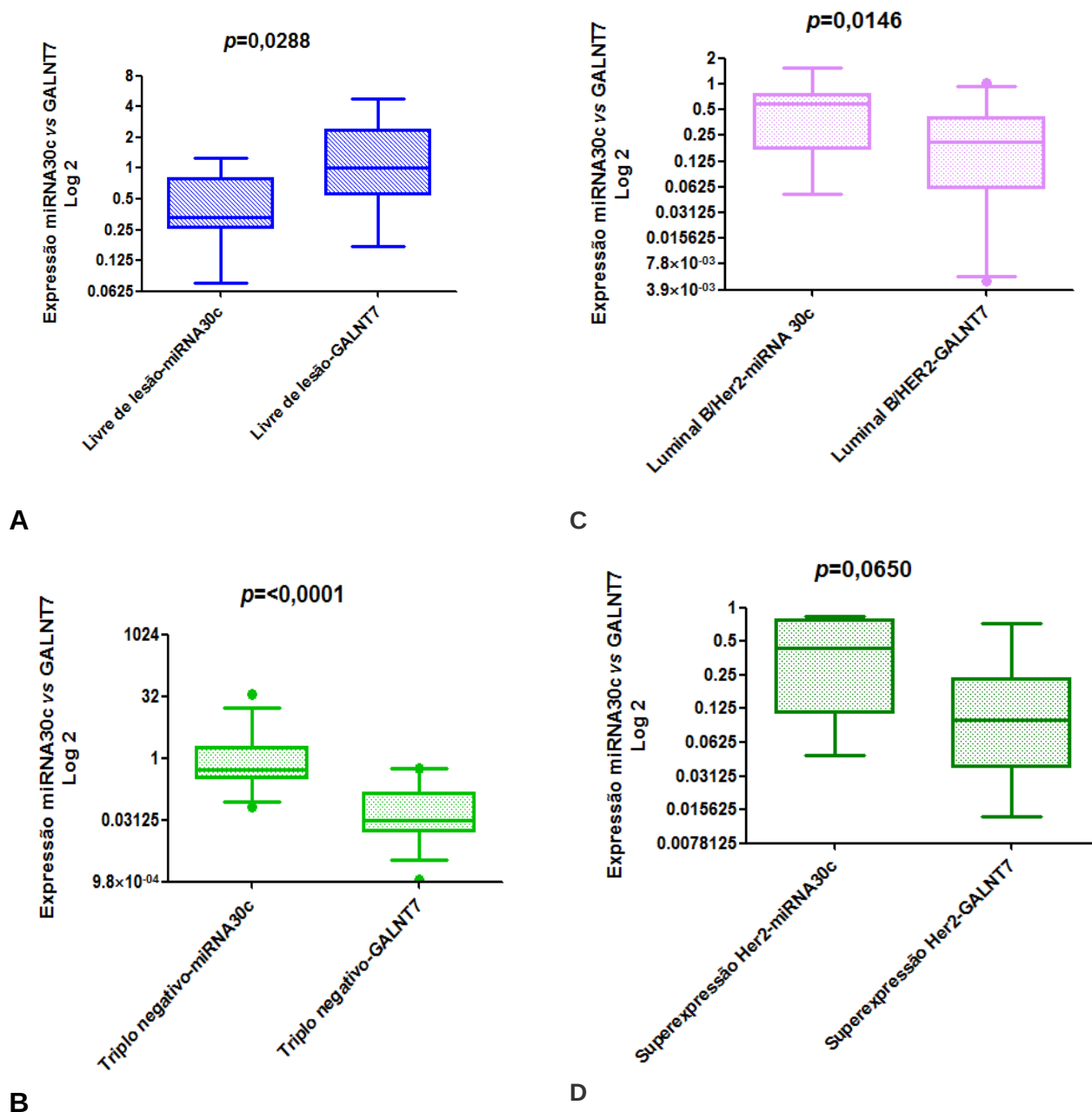


Gráfico 4: Avaliação entre o gene GALNT7 e o miRNA 30c nos subtipos moleculares de CDI. **A.** correlação estatística significativa dos casos livres de doença ($p=0,0288$); **B.** correlação estatística significativa para o subtipo molecular triplo negativo ($p=<0,001$); **C.** correlação estatística significativa para o subtipo molecular Luminal B/Her2+ ($p=0,0146$) e **D.** correlação não significativa para o subtipo molecular Superexpressão de HER-2 ($p=0,0650$). (Teste Mann Whitney).

A análise de todos os 55 amostras pareadas, apresentou correlação estatística significativa entre a expressão do gene GALNT7 e o miRNA 30c com $p < 0,0001$ (Gráfico 5).

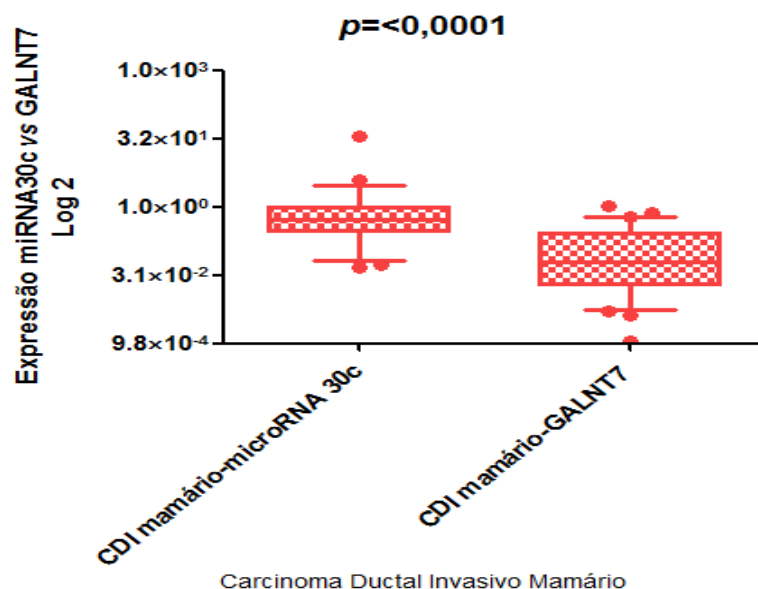


Gráfico 5: Avaliação da correlação entre o gene GALNT7 e miRNA 30c em amostras de CDI mamário (Teste Mann Whitney).

Para a análise da possível correlação da expressão do gene GALNT7, da enzima GALNAC7 e do carboidrato GalNAc usamos 41 casos. Dentre eles apenas 14 apresentam também amostras pareadas para análise de miRNA 30c. A correlação estatística foi significativa entre os grupos analisados (Gráfico 6).

Deste modo, nossos resultados demonstraram que a expressão da enzima GALNAC7 e a presença do carboidrato GalNAc apresentam 95,1 % de fraca e a expressão gênica com valores próximos a zero, demonstrando baixa expressão. Apenas 4,9% apresentaram expressão moderada fenotípica, porém quase 100% dos casos apresentaram baixa expressão gênica, exceto 1 caso que apresentou expressão gênica de acima de 1 (1,19) e expressão fenotípica da proteína e carboidrato moderada.

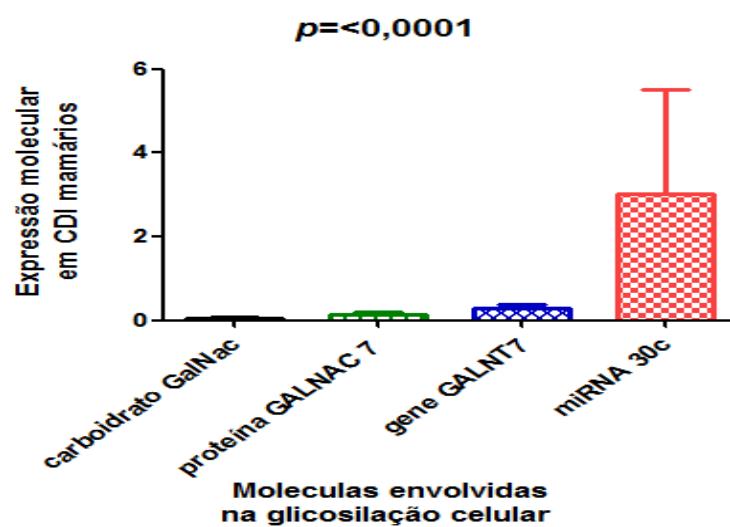


Gráfico 6 Avaliação da correlação entre os quatro tipos de moléculas analisadas em amostras de CDI pareadas (Teste Kruskal-Wallis).

A análise do último segmento clínico, averiguamos a morte de 7 pacientes após o diagnóstico da doença. Ao analisar a sobrevida destes pacientes de acordo com a idade, subtipos moleculares, estadiamento clínico e tamanho do tumor, obtemos as curvas de sobrevida apresentadas no Gráfico 7.

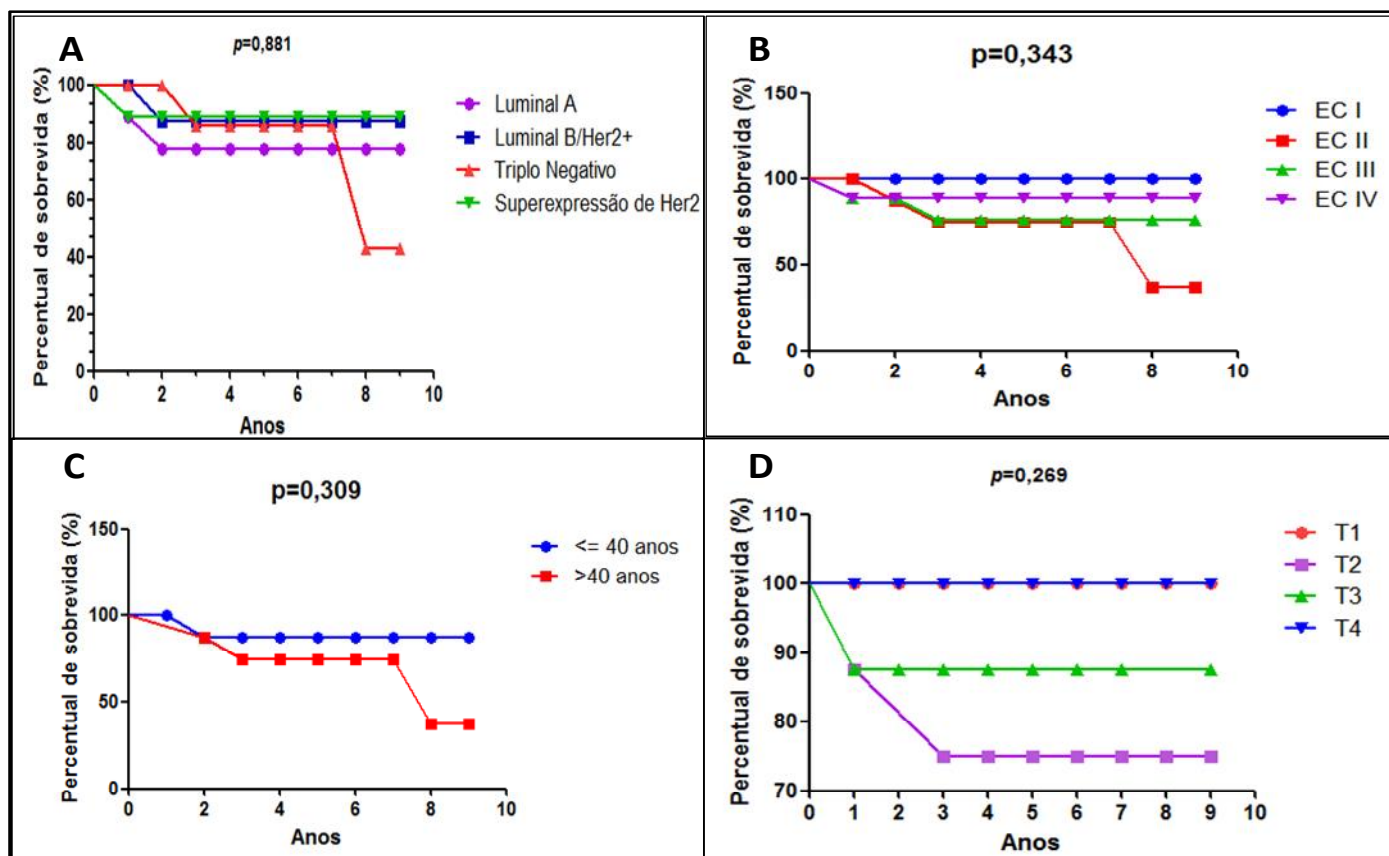


Gráfico 7. Curvas de sobrevivência pacientes diagnosticados com CDI (n=183) com os subtipos moleculares (A), estadiamento clínico (B), Idade (C) e tamanho do tumor (D) apresentando resultados não significativos em todos os casos (Teste Kaplan Meier).

A glicosilação em moléculas de superfície celular é importante para o desempenho de funções como adesão, motilidade, sinalização e eventos bioquímicos intracelulares (SHARON e LIS, 2007). O aumento ou diminuição da expressão dos carboidratos em tumores são mediados por alterações na expressão de glicosiltransferases e glicosidades no processo pós-tradução e maturação proteica (KAVARANI, 2013). Ao estudarmos a presença do carboidrato GalNAc em células neoplásicas de CDI mamário, foi visto que mais de 80% dos casos apresentaram baixa expressão deste carboidrato. Os carboidratos GalNAcs participam da formação de estruturas glicídicas, demonstrando-se uma molécula primordial para o início da O-glicosilação tipo-mucina, formando antígenos Tn, além dos antígenos sialil-Tn e T (Thomson-Friendrich). Os antígenos Tn apresentam um tipo de O-glicosilação truncada que é observada como característica de alterações em células neoplásicas (KARAVANI, 2013).

Apenas cinco estudos publicados entre os anos 1998 e 2008, relacionam a expressão do carboidrato GalNAc e formação do antígeno Tn em tumores mamários e/ou em linhagem de células malignas de câncer de mama utilizando como ferramenta a lectina VVA em diferentes métodos de análise (KONSKA *et al*, 1998; KONSKA *et al*, 2002; KONSKA *et al*, 2006; KAWAGUCHI *et al*, 2006; KOROURIAN *et al*.2008).

Nossos resultados discordam com o estudo de Konksa *et al* (2006) que utilizou a lectina VVA-B4 em tumores de mama invasivos (ductais e lobulares), hiperplasia, fibroadenoma e outras patologias mamárias totalizando sete alterações celulares. Na maioria dos casos a marcação foi de moderada a forte observadas usando um método de análise qualitativo baseado em escala de intensidade (+ até ++++). Ao passo que o método utilizado em nosso estudo foi quantitativo utilizando uma escala de medida de pixels por campo celular avaliado.

Em outro estudo, utilizando 322 casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) houve uma maior porcentagem de casos positivos, considerando um caso positivo na presença de > 5% de células marcadas após análise de 500 células neoplásicas. Diante disto, se nossos resultados fossem analisados com o mesmo método nossos resultados seriam semelhantes, porém com perda de especificidade quantitativa (KAWAGUCHI *et al*, 2006)

Resultados de KOROURIAN *et al*. (2008), utilizando VVA como ferramenta de análise, em 60 casos de CDIS observou o aumento de marcação nos tumores quando comparados com os tecidos normais. Avaliando nossos resultados e comparando-os com o estudo de Korourian *et al*.(2008), utilizando métodos de avaliação diferentes, houve um maior número de casos com marcação moderada nos tumores (50% dos casos), enquanto que em nossos estudos obtivemos apenas 18% de marcação moderada, porém a análise histoquímica apresentou o mesmo tipo de marcação celular do tipo citoplasmática heterogênea.

A marcação celular apresentada em nosso estudo foi similar com os resultados comparados acima. Este resultado é esperado ao compreendermos que o processo de glicosilação inicia-se no Complexo de Golgi e que posteriormente, a glicoproteína madura e funcionalé encaminhada por vesículas para o citoplasma, membrana celular ou meio extracelular, de acordo

com sua função molecular específica. Porém, este processo bioquímico sofre alguns mecanismos de controle celular que pode justificar nossos resultados.

Existem fatores que determinam o controle de expressão das glicosiltransferases O-GALNAc tipo-mucinas. Dentre eles a sobreposição de enzimas nas vesículas Cis e Mediado Complexo de Golgi das células de câncer de mama. Por exemplo, a enzima 2- α -1-6-N-acetilglucosaminiltransferase compete com a α -2-3-sialiltransferase, assim a atividade relativa destas duas enzimas determinante para o tipo de O-glicano sintetizado e sua propriedade antigênica de superfície celular (VARKI, 2009).

Neste cenário de sialilação, a expressão do antígeno Tn tecidual é visto como um cofator relacionado a um prognóstico reservado em vários carcinomas de mama, bexiga, próstata, fígado, ovário, estômago e cólon, envolvendo a expressão modificada e/ou truncada das proteínas mucinas, principalmente mucina 1, MUC 1 (HAUSELMANN, BORSIG, 2014). As mucinas são glicoproteínas relacionadas à proteção, lubrificação e resistência a alterações de pH na célula normal (OSINAGA, 2007). A O-glicosilação truncada apresenta-se como uma das principais alterações pós-tradução no câncer, devido a alteração na expressão das glicosiltransferases da família GALNACs, responsáveis por inserir os carboidratos GalNACs aos glicoconjugados e favorecer a formação do antígeno Thomsen-Nouvelle (Tn) (WU *et al*, 2010; BENNETT *et al*, 2012; HAUSELMANN, BORSIG, 2014).

Diante disto, no nosso estudo, realizamos a avaliação da enzima GALNAC7, que faz parte da vasta família das glicosiltransferases que inserem especificamente o carboidrato GalNAC nos glicoconjugados. Nossos resultados mostraram que o reconhecimento de GalNAC pela VVA e a expressão de GALNAC7 foram compatíveis quando observamos uma baixa expressão de GALNAC7 e o reconhecimento de GalNAC nas células de CDI.

Estes resultados fortalecem a hipótese da correlação direta entre a inserção/utilização de GalNAC na estrutura glicídica em glicoconjugados celulares e a expressão da proteína GALNAC7. Apenas dois estudos que avaliaram a expressão de GALNAC7 em tumores cervicais e hepatocarcinoma, demonstraram um aumento de sua expressão, quando comparados com os respectivos tecidos normais (PENG *et al*, 2012; SHAN *et al*, 2013), sendo

importante destacar que nenhum dos dois avaliaram tecidos mamários nem avaliaram os resultados de forma quantitativa como em nosso estudo.

KAHAI *et al.* (2009) verificaram usando proteômica uma diminuição de expressão do gene GALNT7 em cultura celular de osteoblastos. Também no estudo de SOVRAN *et al.* (2011) a avaliação da expressão do gene GALNT7 em melanoma apresentou uma baixa expressão gênica.

Atualmente se conhecem 20 genes da família das GALNTs, que codificam galactosiltransferases localizados em diferentes *locus* cromossômicos (BENNETT *et al.*, 2012). Compreendendo esta família de genes GALNTs e o compartilhamento da mesma função de inserir carboidrato GalNAc, porém um diferenças de tipos de ligação bioquímica no arcabouço proteico (VARKI, 2009; POTAPENKO, 2010), nossos resultados se apresentam de forma coesa e inédita, demonstrando que a baixa expressão do antígeno Tn nos CDI mamários, pode ser mediada pela baixa expressão da proteína GALNAC7.

Compreendendo que nosso estudo é pioneiro nesta análise, avaliamos além da expressão molecular desta enzima em tecidos mamários transformado (CDI) e normal, a possibilidade de correlação com dados clínicopatológicos. Nosso estudo buscou verificar se a expressão do antígeno Tn e de GALNAC7 estava correlacionada com os seguintes dados clínicopatológicos (idade, grau histológico, estadiamento tumoral, tamanho do tumor, invasão linfonodal e subtipo molecular), contudo não se observou correlação estatística, exceto na correlação entre tamanho de tumor e expressão do carboidrato GalNAc. Estudo recente, aponta a glicosiltransferase GALNAC 4 e o seu respectivo gene GALNT4 estão relacionados com o fator de transcrição FOX2, demonstrando o envolvimento da O-glicosilação em células de tumores mamários estrógeno positivo (NIANG *et al.*, 2016). Também, investigando a expressão de outros tipos de glicosiltransferases como a FUT3, responsável pela fucosilação celular NASCIMENTO, 2015 observou uma correlação significativa com o potencial de malignidade em pacientes que apresentavam aumento de expressão desta enzima, assim relacionada com o pior prognóstico de tumores mamários.

Analises de expressão gênica de glicosiltransferases evidenciam que diversos fatores influenciam o processo de glicosilação nas células influenciando suas funções e interações nos tecidos. Assim alterações genéticas na expressão da família de genes GALNT7 foram observadas (VARKI

et al, 2009; BENNETT *et al*, 2012). Esta família tem 20 genes, porém apenas 17 são mais estudados, sendo o gene GALNT7, localizado na região cromossômica 4q34.1, pouco estudado(BENNETT *et al*, 2012).

A expressão de GALNT7 foi vista apenas em três estudos que utilizaram tecidos humanos ou linhagem de células humanas. KAHAI *et al* (2009) observaram uma diminuição de expressão do gene em cultura de células de osteoblastos. Resultados semelhantes foram observados em câncer cervical (PENG *et al*, 2012) e em melanoma (SOVRAM *et al*, 2011). Nossos resultados quanto a expressão de GALNT7 em carcinoma ductal invasivo mamário aumentam o número de neoplasias que apresentam baixa expressão deste gene.

Estudos reportam a relação da expressão do gene GALNT7 com a superexpressão de miRNA-378 (KAHAI *et al*, 2009), miRNA-214 (PENG *et al*, 2012) e miRNA 30b/30d (SOVRAM *et al*, 2011) em vários tecidos. Rodríguez-González *et al*, (2011) observaram uma alta expressão do miRNA-30c em 246 amostras de tumores mamários receptor de estrógeno (RE) positivo. Nossos resultados não corroboram os achados de Rodríguez-González *et al*, (2011). Observamos em nosso estudo que 127 amostras positivas para RE (69,4%), das 140 amostras luminais apresentaram baixa expressão de miRNA-30c. SHUKLA *et al*, 2015, utilizando cultura de células mamárias, observaram uma baixa expressão em células receptor de estrógeno (RE) negativas. Estudos em câncer endometrial e hepatocarcinomas, apresentam também o miRNA-30c como molécula reguladora envolvida nestas patologias malignas (KONG *et al*, 2014; LIU *et al*, 2015). Porém não existem estudos destacando seu papel na regulação da glicobiologia celular como abordado em nosso estudo.

Quando relacionamos os resultados de expressão do gene GALNT7 e do miRNA-30c, verificamos uma correlação significativa em todos os subtipos moleculares. No estudo de Hayes, Peruzzi, Lawler, 2014, demonstra que os miRNAs podem atuar de diferentes formas na regulação gênica, podendo atuar diretamente na modulação de expressão de um RNAm específico, modulando a expressão de três RNAm para favorecer o efeito modulador e dois miRNAs podem atuar juntos na modulação de expressão de determinado RNAm. Em nosso estudo pode haver uma modulação direta sobre o gene GALNT7, indicando o papel do miRNA-30c como regulador da O-glicosilação, diante da

regulação negativa de expressão do gene GALNT7, favorecendo assim a baixa expressão de GALNAC7.

Vimos também que o tempo de sobrevida dos pacientes de acordo com sua idade, subtipo molecular, estadiamento clínico e tamanho do tumor não apresentou resultado significativo. A curva de sobrevida é um indicador importante para estudos dos aspectos clinico-patológicos, compreendendo também, que a glicobiologia dos tumores é bastante atual e se faz necessário diante da grande complexibilidade dos mecanismos glicobiológicos alterados em tumores, que estão correlacionados com a progressão e desenvolvimento de malignidade (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Deste modo, nosso estudo evidenciou de forma linear a possível relação da baixa expressão fenotípica do carboidrato GalNAc e da proteína GALNT7 com a regulação do gene de glicosilção GALNT7, mediada provavelmente, pelo aumento da expressão do miRNA 30c em CDI de mama.

6 CONCLUSÕES

- A presença do antígeno Tn, através da análise da expressão do carboidrato GalNAc, em tumores mamários apresentou baixa juntamente com a enzima de O-glicosilação GALNAC7, demonstrando assim que a formação de antígenos Tn está deficiente nos tumores mamários e ou há um processo bioquímico mascarando as moléculas de GalNAc;

- A análise de expressão da proteína GALNAC 7 demonstrou também uma baixa expressão nos CDI mamários estudados, sugerindo que há baixa expressão do gene GALNT7;

- Através da subtipagem molecular, foi visto que a maior quantidade de casos são Luminais, corroborando com a literatura e prática clínica;

- Nosso estudo evidenciou que o gene GALNT7 apresenta baixa expressão, corroborando com os resultados da imuno-histoquímica;

- Realizando a correlação estatística com dados clínico-histopatológicos e expressão de moléculas, não houve resultado com correlação estatística significativa, exceto em relação a tamanho do tumor e o carboidrato GalNAc nos pacientes com CDI mamário;

- Foi visto que GALNT7 pode ser um possível alvo para a ação do miRNA 30c, atuando como molécula inibidora de expressão gênica e levando a um processo mais lento de desenvolvimento e poder de metástase;

- Fica evidente a necessidade de mais estudos *in vitro* para superexpressão e knockdown do gene GALNT7 e miRNA30c na busca da compreensão completa deste possível mecanismo de regulação molecular.

7REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.C., PEDROSA, N.L., LEITE, J.B., FLEMING, T.R.P., CARVALHO, V.H., CARDOSO, A.A.A. Marcadores Tumoriais: revisão de literatura, **R Bras Canc**, v.53, n.3, p. 305-316, 2007.

ANDORFER, C.A., NECELA, B.M., THOMPSON, E.A., PEREZ, E.A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. **Trends Mol Med**. v.17, p. 313-319, 2011.

ANDRE, F., McSHANE, L.M., MICHIELS, S., RANSOHOFF, D.F., ALTMAN, D.G., REIS-FILHO, J., S., HAYES, D.F., PUSZTAI, L. Biomarker studies: a call for a comprehensive biomarker study registry. **Nature**, v. 8, p. 171-176, 2011.

BELTRÃO, E.I.C., AMARAL, T., SILVA, J.S., COELHO, L.C.B.B., CARVALHO JUNIOR, L.B. Infiltrating ductal carcinoma: a lectin histochemistry study. **Anais Fac Méd Univ Fed Pernambuco**, v. 46, p.32-35, 2001.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., FIGUEIREDO-SILVA, J., COELHO, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 74, p.125-134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C., MEDEIROS, P.L., RODRIGUES, O.G., SILVA, J.S., VALENÇA, M.M., COELHO, L.C.B.B.B, CARVALHO JUNIOR, L.B. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumores. **Eur J Histochem**, v.27, p.139-142, 2003.

BENEDETTINI, E., NGUYEN, P., LODA, M. The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. **Diag Histopath**, Estados Unidos, v. 14, p. 195-201, 2008.

BENNETT, E. P., MANDEL, U., CLAUSEN, H., GERKEN, T.A., FRITZ, T. A., TABAK, L.A. Control of mucin-type O-glycosylation: sa classification of the

polypeptide GALNAC-transferase gene family. **Glycobiology**, v., 22, n. 6, p. 736-756, 2012.

BROCKHAUSEN, I., SCHACHTER, H., STANLEY, P. **O-GalNAc Glycans**. Essent Glicobiol, 2ed, 2009.

CAZET, A., JULIEN, S., BOBOWSKI, M., BURCHELL, J., DELANNOY, P. Tumor-associated carbohydrate antigens in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 204, n. 12, p. 1-13, 2010.

CHRISTIANSEN, M.N., CHIK, J., LEE, L., ANUGRAHAM, M., ABRAHAMS, J.L., PACKER, N.H. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomisc**, v. 14.P. 525-546, 2014.

CHUGH, S., GNANAPRAGASSAM, V.S., JAIN, M., RACHAGANI, S., PONNUSAMY, M.P., BATRA, S.K. Pathobiological implications of mucin glycans in cancer: Sweet poison and novel targets, **Biochim Biophys Acta**. v. 1856, p. 211-225, 2015.

CIQUEIRA, M.B., MOREIRA, M.A.R., SOARES, L.R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CORFIELD, A.P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. **Biochim Biophys Acta**. v. 1, p. 1-17, 2014.

COYLE, V.M., JOHNSTON, P.G. Genomic markers for decision making: what is preventing us from using markers? **Nature**, v. 7, p. 90-97, 2010.

CUNHA, G.R., RICKE, W., THOMSON, A., MARKER, P., RISBRIDGER, G., HAYWARD, S. W., WANG, Y.Z., DONJACOUR A.D., KURITA, T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 94, p. 221-236, 2004.

DENOIX, P.F. **Bull. Inst. Nat. Hyg** .v. 7, n. 743, 1952.

DEROSSI, D.R., ITO, K., FILHO, J.O.C., BACCHI, C.E. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina. **Rev Bras Pat Med Lab**, v. 39, n. 3, p. 229-235, 2003.

DUFFY, M. Serum tumor markers in Breast Cancer: are they of clinical value? **Clinical Chemistry**.v. 52. P.345-351, 2006.

FERREIRA, S.A., VASCONCELOS, J.L.A., CAVALCANTI, C.L.B., RÊGO, M.J.M.B., BELTRÃO, E.I.C. Sialic acid differential expression in non-melanoma
FURUTA, E., OKUDA, H., KOBAYASHI, A., WATABE, K. Metabolic genes in cancer: Their roles in tumor progression and clinical implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1805, p. 141-152, 2010.

GHAZARIAN, H., IDONI, B., OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**. v. 113, p. 236-247, 2011.

GHUNG, L., SHIBLI, S., MOORE, K., ELDER, E.E., BOYLE, F.M., MARSH, D.J., BAXTER, R.C. Tissue biomarkers of breast cancer and their association with conventional pathologic features. **Brist J Cancer**. v.108, p.351-360, 2013

GOBBI, H., Classificação dos tumores de mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.

GOLDHIRSCH, A., WOOD, W.C., COATES, A.S., GELBER, R.D., THURLIMANN, B., SENN, H.J. et al. 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 cancer, **Ann Oncol**, Annals of Oncology, v. 22, p. 1736-1747, 2011.

GOLDHIRSCH, A., WOOD, W.C., COATES, A.S., GELBER, R.D., THURLIMANN, B., SENN, H.J. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the Gallen International Expert

Consensus on the primary therapy of early Breast Cancer 2011. **Annals Onco.**v.22, p-1736-1747, 2011.

GONZALEZ.F.G.R, SIEUWERTS, A.M. SMID, M.,MicroRNA-30c expression level is an independent predictor of clinical benefit of endocrine therapy in advanced estrogenreceptor positive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** v. 127, p. 43-51, 2011.

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

GYPARAKI, M.T., BASDRA, E.K., PAPA VASSILOU, A.G, MicroRNAs as regulatory elements in triple negative breast cancer. **Cancer Letters.** v.354, p.1-4,2014.

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

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation
HANASH, S. M., BAIK, C. S., KALLIONIEMI, O. Emerging Molecular Biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer. **Nature**, v. 8, p. 142-150, 2011.

HANASH, S., BAIK, C.S., KALLIONIEMI, O. Emerging molecular biomarkers-blood-based strategies to detect and monitor cancer.**Nature.**v. 8, p. 142-150, 2011.

HAUSELMANN, I., BORSIG, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis.**Frontiers in Oncology.**v.4.p.1-15, 2014.

HAYES, J., PERUZZI, P. P., LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **CellPress.**p. 1-10, 2014.

HAYES, J., PERUZZI, P.P., LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy, **Trends Mol Med**.v.20, 2014.

HERSCHKOWITZ J., SIMIN, K., WEIGMAN, V., MIKAELIAN, I., USARY, J., HU, Z., et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome biology**. v. 8, n. 5, 2007.

HIRAO, T., SAKAMOTO, Y., KAMADA, M., HAMADA, S., AONO T. Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells. **Cancer**, v.72, p. 154ñ159, 1993.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2015.

IORIO, M.V. et al. MicroRNA gene expression. Deregulation in human breast cancer. **Cancer Res**.v.16, p.7065-7070.

ITZKOWITZ S., KJELDSSEN T., FRIERA, A., HAKOMORI, S.I., KIM, Y.S. Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in humanpancreas. **Gastroenterology** , v.100, p. 1691ñ1700, 1991.

JANKOVI, M., Glycans as biomarkers: status and perspectives. **J Med Biochem**.v.30, p. 213ñ223, 2011.

JANSSON, M.D., LUND, A.H. MicroRNA and cancer. **Mol Onco**.v.6, p. 590-610, 2012.

JOSHI, S., KUMAR, S., CHOUDHURY, A., PONNUSAMY, M.P., BATRA, S.K. Altered mucins (MUC) trafficking in bening and malignant conditions. **Oncotarget**.v. 5, p. 7272-7284, 2014.

KAHAI, S., LEE, S.C., LEE, D.Y., YANG, J., LI, M., et al. MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating Osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. **PLOS ONE**.v.4, p. 1-11, 2009.

KANG, K., PENG, X., LUO, J., GOU, D. Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. **J Anim Sci Biothech**, v.3,p.1-9, 2012.

KARAVANI, V.P., Aiming at the sweet side of cancer: aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine. **Cancer Letters**, p. 1-11, 2013.

KASPER.B.T.; KOPPOLU, S., MAHAL, L.K. Insights into miRNA regulation of the human glycome.**Biochem Biophys Res Comm**. v.445, p.774-779, 2014.

KAWAGUCHI, T., TAKAZAWA, H., IMAI, S., MORIMOTO, J., WATANABE, T., KANNO, M., IGARASHI, S. Expression of Vicia Villosa Agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cell in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC 1 bearing Tn antigen a receptor of VVA? **Breast Cancer Res trat**, v. 98, p. 31-43, 2006,

KHABAZ, M.N., McCLURE, J., McCLURE, S., STODDART, R.W. Glycophenotype of prostatic carcinomas, **Folia Histo Cytobiol**.v. 48, n. 4, p. 637-645, 2010.

KONG, X., XU, X.F., YAN, Y., GUO, F.,LI, L., HU, Y., ZHOU, H.,XUN, Q., Estrogen Regulates the Tumour Suppressor MiRNA-30c and Its Target Gene, MTA-1, in Endometrial Cancer. **PLOS ONE** .v. 9, 2014.

KONONEN, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.**Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.

KONSKA, G., GUERRY, M., CALDEFIE-CHEZET, F., DE LATEUR, M., GUILLOT, J. Study of the expression of Tn antigen in different types of human

breast cancer cell using VVA-B4 lectin. **Oncology Reports**. v. 15, p.305-310, 2006.

KONSKA, G., GUILLOT, J., DE LATOUR, M., FONCK, Y. Expression of Tn antigen and N-acetylglucosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83D4. *Int J Oncol*. v. 12, p. 361-367, 1998.

KONSKA, G., VISSAC, C., ZAGLA, K., CHEZET, F., VASSON, M.P., BERNARD-GALLON, D., GUILLOT, J. Ultrastructural localization of binding sites for PNA and VVA-B(4) lectins in human breast cancer cell lines detected by confocal fluorescence microscopy. *Int J Oncol*. v.21, p. 1009-1014, 2002.

KOPF, E. & ZHARHARY, D. Antibody arrays- An emerging tool in cancer proteomics. *Intern J Biochem Cell Biol*. Londres, v. 39, p. 1305- 1317, 2007.

KOROURIAN, S., SIEGEL, E., KIEBER-EMMONS, T., KARBASSI, B.M. Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma *in situ* of the breast by lectin histochemistry. **BMC Cancer** , v.8, n. 136, p.1-9, 2008.

KULASINGAM, V., DIAMANDIS, E., Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature Clinical P Oncol**, v.5, n. 10, p. 588-599, 2008.

LEVENSON, V.V. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when and where? **Bioch Bioph Acta**, v. 1770, p. 847-856, 2007.

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

LING, X.H., HAN Z.D., XIA D., HE H.C., JIANG F.N., LIN Z.Y., FU X., DENG Y.H., DAI Q.S., CAI C., CHEN J.H., LIANG Y.X., ZHONG W.D., WU C.L. MicroRNA-30c serves as an independent biochemical recurrence predictor and potential tumor suppressor for prostate cancer. **Mol Biol Rep.** v. 41, p.2779-2788, 2014.

LIU, D., WU, J., LIU, M., YIN, H., HE, J., ZHANG, B. Downregulation of miRNA-30c and miR-203a is associated with hepatitis C virus core protein-induced epithelial-mesenchymal transition in normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells. **Biochem Bioph Res Comm**, v. 464, p. 1215-1221, 2015.

MACDONAGH L., GRAY, S.G., FINN, S.P., CUFFE, S., O'BYRNE, K.J., BARR, K.P., The emerging role of microRNAs in resistance to lung cancer treatments. **Cancer Treat Rev.** v.41, p. 160-169, 2015.

MAEDA, T., NISHIMURA, S.I. FRET-Based Direct and Continuous Monitoring of Human Fucosyltransferases Activity: An Efficient synthesis of Versatile GDP-I- Fucose Derivatives from Abundant d-Galactose. **Chem Eur J**, v. 14, p.478 - 487, 2008.

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

MELO-JÚNIOR, M. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-FILHO, N. T.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter pylori*. **Brazilian J Microbiol**, v. 39, p.238-240, 2008.

MELO-JÚNIOR, M. R; TELLES, A. M. S.; ALBUQUERQUE, F.E. B. ; PONTES-FILHO, N. T. ; CARVALHO JR., LUIZ B. ; BELTRÃO, E. I. C. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **J Brasil Patol Medic Laborat**, v. 40, p. 123-125, 2004.

MELO-JUNIOR, M.R. **Histoquímica e análise digital e imagens em neoplasias cutâneas**. Dissertação de Mestrado. Recife, 2003.

MISHRA, A., VERMA, M., Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? **Cancers**,v.2, p. 190-208, 2010.

MORENO, F.B.M.B. **Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus tetragonolobus***. Tese de Doutorado. São Paulo, 2008.

MUNGRUE, K., RAMDATH, J., ALI, S., CUFFIE, W.A., DODOUGH, N., GANGAR, M., MOHAMMED, L., MUNGROO, V., RAMSAHAI, J., SHAH, M. Challenges to the Control of Breast Cancer in A Small Developing Country, **Breast Cancer: Bas and Clin res**, v. 8, 2014.

NASCIMENTO, J.C.F., FERREIRA, S.A., VASCONCELOS, J.L.A., SILVA-FILHO, J.L.Q., BARBOSA, B.T., BEZERRA, M.F., ROCHA, C.R.C., BELTRÃO, E.I.C. Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. **Exp Mol Path**. v. 99, p. 409-415, 2015.

NIANG, B., JIN, L., CHEN, X., GUO, X., ZHANG, H., WU, Q., PADHIAR, A.A, XIAO, M., FANG, D., Z.J. GalNAc-T4 putatively modulates the estrogen regulatory network through FOXA1 glycosylation in human breast cancer cells. **Mol Cell Biochem**.v. 411, p. 393-402, 2016.

OLIVEIRA.C., TEIXEIRA, J. A., SCHMITT, F., DOMINGUES, L.A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnol**, v. 8, p. 1-7, 2009.

OMS: **World Health Organization** [webpage on the Internet]. Global status report on NCDs. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. Available from: www.who.int/chp/ncd_global_status_report/. Acesso em fev,2015.

OSINAGA, E. Expression of cancer ñassociated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. **IUBMB Life**.v.59, p. 269-273, 2007.

PARK, J. W. *et al.* Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. **Clin. Cancer Res.** 10, 3885ñ3896, 2004.

PARK, J.H., NISHIDATE, T., KIJIMA, K. *et al.* Critical Roles of Mucin 1 Glycosylation by Transactivated Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 6 in Mammary Carcinogenesis. **Cancer Res.** v.70, p.2759-2769, 2010.

PARK, S., KOO, J.S., KIM, M.S., PARK, H.S., LEE, J.S., LEE, J.S. KIM, S., PARK, B.W. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry, **The Breast.** v. 21, p. 50-57, 2012.

PENG, R., WAN, H.Y., LI, H.F., LIU, M., LI, X., TANG, H. MicroRNA-214 suppresses growth and invasiveness of Cervical Cancer Cell by targeting UDP-N-acetyl-alpha-D-galatosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminytransferase 7. **J Bio Chemi**, v.287, p. 14301-14309, 2012.

PEROU C.M., SORLIE, T., EISEN, M.B., RIJIN, M., JEFFREY, S.S., REES, C.A., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

POTAPENKO, I.O., HAAKENSEN, V.D., LUDERS, T., HELLAND, A., BUKHOLM, I., SORLIE, T., KRISTENSEN, V.N., LINGJOERDE, O.C., BORRESEN-DALE, A.L. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Mol Oncol**, Holanda, v. 4, p. 98-118, 2010.

RAKHA, E.A., EL-SAYED, M.E., REIS-FILHO, J.S., ELLIS I.O. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopat.** v. 52, n., 1, p. 67-81, 2008.

RÊGO, M.J.B.M., BELTRÃO, E.I.C. Avaliação do glicocódigo do carcinoma ductal mamário e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. **Ver Bras Ginecol Obst (Impresso)**, v. 31, p. 626-626, 2009.

ROSENFELD, R., BANGIO, H., GERWIG, G.J., ROSENBERG, R., ALONI, R., COHEN, Y., AMOR, Y., PLASCHKES, I., KAMERLING, J. P., MAYA, R.B.Y. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **J Biochem Biophys Methods**, v. 70, p. 415-126, 2007.

ROSNOBLET, C., PEANNE, R., LEGRAND, D., FOULQUIER, F. Glycosylation disorders of membrane trafficking. **Glycoconj J**.v.30, p. 23-31, 2013.

RUAN, K., FANG, X., OUYANF, G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. **Cancer Letter**, v. 285, p. 116-126, 2009.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; MENEZES, F. D.; FERREIRA, R. C.; JÚNIOR, S. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CARVALHO, L. B.; BELTRÃO, E. I. C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with concanavalin A lectin for recognition of mammary tumor. **Physica Status Solidi A Appl Res**, v. 3, p. 4017-4022, 2006.

SCHJOLDAGER, K.T.B.G., CLAUSEN, H. Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - Deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Biochim Biophys Acta**.v.1820, p. 2079-2094, 2012.

SCHWARZENBACH, H, NISHIDA, N., CALIN, G.A., PANTEL, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. **NatureRev**.p. 1-12, 2014.

SERPICO, D., MOLINO, L., Di COSIMO, S. microRNAs in breast cancer development and treatment. **Cancer Treat Rev**, v. 40, p. 595-604, 2014.

SHAN, S. W., FANG, L., SHATSEVA, T., JEYAPALAN, Z.R, YANG, X., DU, W.W., LU, W.Y. Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce

hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways .**J Cell Sci**, v. 126, 2013

SHAO, C., YU, Y., YU, L., PEI, Y., FENG, Q., CHU, F., FANG, Z., ZHOU, Y. Amplification and up-regulation of microRNA-30b in oral squamous cell cancers Arch Oral Bio, v. 57, p. 1012-1017, 2012.

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

SHARON, N.; Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **J Biolog Chemist**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

SHERWANI, A.F., MOHMOOD, S., KHAN, F., KHAN, H.R., AZFER, A. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas an appraisal..**Indian J Clin Biochem**, v.18, n. 2, p. 169-180,2003.

SHI, M., GUO, N. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutics strategies of breast cancer.**Cancer Treat Rev**, v.35, p.328-334, 2009.

SHIMMA, Y.I., SAITO, F., OSAWA, F. and IGAMI, Y. Construction of a Library of Human Glycosyltransferases Immobilized in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*.**Appl Environm Microbiol**, Estados Unidos, v. 72, p. 7003-7012, 2006.

SHUKLA, K., SHARMA, A.K., WARD, A., WILL, R., HIELSCHER, T., BALWIERZ, A. MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF-kB signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer. **Mol Onco**, v.9, p. 1106-1119, 2015.

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

SONNENSCHN, C., SOTO, A.M. Theories of Carcinogenesis: an emerging perspective. **Semin Cancer Biol**, v. 18, p. 372-377, 2008.

SOVRAN, A.G., SEGURA, M.F., DI MICCO, R. et al. MiR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. **Cancer Cell**.v.20, p. 104-118, 2011.

STROYNOWSKA-CZEWINSKA, A. FISZER, A., KRZYZOSIAK, W.J.The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells.**Cell Mol Life Sci**, v. 2, p. 2-18, 2014.

TSAMBAOS D., PASMATZI, E., MANOLOPOULOS, L., KAPRANOS, N., GOUMAS, P., ADAMOPOULOS, G. Lectin histochemistry of laryngeal squamous cell carcinomas.**Otolaryng Head Neck Surg**, v.118, n. 6, 1998,

VALBUENA, G., MADRID, J. F., HERNÁNDEZ, F., SÁEZ, F. Identification of fucosylated glycoconjugates in *Xenopus laevis* testis by lectin histochemistry.**Histochem. Cell Biol**, v. 1, p. 215-225, 2010.

VARKI A., CUMMINGS R.D., ESKO J.D., et al.,**Essentials Glycob**. 2nd edition Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VASCONCELOS, J.L.A., FERREIRA, S.A., LIMA, A.L.R., RÊGO, M.J.B., BANDEIRA, A.R.G., CAVALCANTI, C. L.B., LIRA, BELTRÃO, E.I.C. Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. **Acta Histochem Cytochem**.v.46, n. 3, p. 105-109, 2013.

WANG, T. H., LEE, M. H., SU, N. W.; Screening of lectins by an enzyme-linked adsorbent assay.**Food Chem**, v. 113, p. 1218-1225, 2009.

WU, C., GUO, X., WANG, W., WANG, Y., SHAN, Y, ZHANG, B., SONG, W., MA S., GE, J., DENG, H., ZHU, M. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a

potencial biomarkers for breast cancer by immunohistochemistry. **BMC Cancer**, v.10, p. 1-8, 2010.

XING, Y., ZHENG, X., LI, G.,LIAO, L., CAO, W.,XING, H.,SHEN, T., SUN, L., YANG, B., ZHU, D.MicroRNA-30c contributes to the development of hypoxia pulmonaryhypertension by inhibiting platelet-derived growth factor receptor _ expression. **Internat J Biochem Cell Bio**.v.64, p. 155-166, 2015.

ZHANG, Y., YANG, P., WANG, X.F. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. **Trends Cell Biol**, v.24, 2014.

8ANEXOS

8.1 Artigo Publicado

Experimental and Molecular Pathology 98 (2015) 489–495



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymmp



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 Bioprocessos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Filho, s/n, CxP, Recife, PE 50670-901, Brazil^b Laboratório de Imunopatologia Santa Anna (LISA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Filho, s/n, CxP, 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 26 August 2015

Keywords:
Fut3-8
Breast
Immunohistochemistry
Protein expression
Single nucleotide polymorphism
Regulatory region

ABSTRACT

Fucosylated glycans, synthesized by α 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 Agg2L-TRAIL. This study aimed to investigate the expression pattern of FUT3 in invasive breast carcinoma (IBC) from patients of Pernambuco state, Northeast of Brazil, and genotype FUT3 promoter region to identify possible SNPs that could be associated with variation in FUT3 expression. Immunohistochemistry assay was used to assess the FUT3 expression in normal (n = 11) and tumor tissues (n = 82). DNA sequencing was performed to genotype the FUT3 promoter region in patients with IBC (n = 109) and healthy controls (n = 110). Our results demonstrated that the absence of FUT3 enzyme is related to breast IBC. The non-expression of FUT3 was more frequent in larger lesions and also in HER2 negative IBC tumors. Genomic analysis showed that two variations localized in FUT3 promoter region are possibly associated with IBC. Our results suggest that minor allele T of SNP rs73938376 (–GGG C > T) confers protection whereas minor allele T of SNP rs2469669 (–GGG C > T) triggers susceptibility to IBC 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; Zou 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 FUT13, FOFUT2 and O-FUT2 (Becker and Lowe, 2003). FUT3 gene encodes a fucosyltransferase with α 1,3 and α 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 (Sierpa et al., 2006) and is regulated by transcription factors, such as NF15a (Lisc et al., 2010), p53 (Kulkarni et al., 2012) and c-Myc (Sakuma et al., 2013), and interleukins IL-8, TNF- α (Groux-Degroene et al., 2008), IL-1 β and IL-30 (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-selectin, involved in ahesion 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 Tjst1 and Tjst2 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^a 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., 2008;

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Filho, s/n, CxP, 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 (IBC) 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 65 IDC patients and 11 healthy controls were sliced in sections of 4 µm 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 H₂O₂ 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 (QEL, 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× 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 µm) 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 µL of cell lysis buffer (0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 1 M Tris), 36 µL of 20% SDS solution, 24 µL of proteinase K (20 mg/mL) and 480 µL of deionized water at 65 °C for 18 h. Proteins were precipitated with 420 µL of 5 M NaCl followed by centrifugation at 14,000 g for 20 min. Supernatant was transferred to a microtube containing 800 µL of cold isopropyl alcohol. After centrifugation at 14,000 g for 30 min, supernatant was discarded and 500 µL 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 µL 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 healthy 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'-CTGGGCTCTGGTATGCAAT-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 µL of each primer, 0.2 µL of each dNTP and 200 ng of DNA template for a final reaction volume of 25 µL. 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 µg/mL). Amplicons' purification was performed using Exonuclease I 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 (Qiagen, 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 Algen 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).

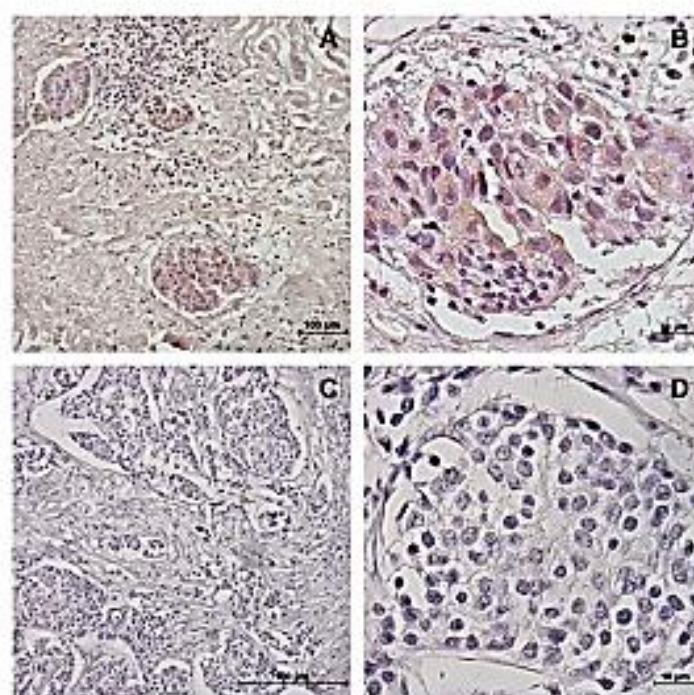


Fig. 1. Immunohistochemical staining patterns of FUT3 in breast invasive ductal carcinoma (IDC): positive staining – magnification of 100× (A) and 400× (B); negative staining – magnification of 100× (C) and 400× (D).

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 (1.97–28.23)
Metastological grade				
I	0 (0)	7 (1)	Ref.	
II	8 (0.25)	24 (0.75)	0.3077	
III	7 (0.19)	30 (0.81)	0.5752	
Lymph node metastasis				
Absent	2 (0.08)	21 (0.81)	Ref.	
Present	11 (0.22)	26 (0.77)	0.1929	
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 (0.22)	28 (0.8)	Ref.	
Negative	6 (0.22)	21 (0.78)	1.00	
Progesterone receptor				
Positive	7 (0.22)	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 (0.02)	25 (0.87)	0.006*	18.2 (2.23–148.4)
EGFR				
Positive	5 (0.28)	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 (–6033 C > T) and rs2306969 (–6951 C > T) showed statistically significant differences in their genotype frequency between IDC patients and healthy controls. At position –6033 (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 healthy 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 shown in Table 2. Blood samples from 15 IDC patients were genotyped to confirm whether the variations observed in this study were really genuine polymorphisms. The blood genotype for all SNPs from all samples analyzed matched with those obtained from the respective 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 Alggen 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 (0.98)	211 (0.98)	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 (0.52)	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	60 (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	65 (0.60)	52 (0.48)	9.77 (4.73–20.22)	<0.0001***
Recessive				
C/C + C/T	104 (0.95)	94 (0.86)	Ref.	
T/T	5 (0.05)	15 (0.14)	0.36 (0.11–0.85)	0.018*
Overdominant				
C/C + T/T	16 (0.15)	72 (0.66)	Ref.	
C/T	60 (0.85)	37 (0.34)	13.02 (5.83–21.04)	<0.0001***

Statistical significance and odds ratio measured by two-sided 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, TFI-1, 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 FUT 8/9. Involved in the leukocyte diapedesis, sialyl Lewis X antigen (sLe^x, Neu5Ac2-3Galact-4(Fuc1-3)GlcNAc) and its isomer sialyl Lewis A antigen (sLe^a, Neu5Ac2-3Galact-3(Fuc1-4)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 (Czerwikowski et al., 2013), renal (Borzym-Kuczyk and Radziejewska, 2013), lung (Komatsu et al., 2013), colon (Mare et al., 2013), gastric (Kim et al., 2011),

pancreatic (Ballesteros 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 (Padr6 et al., 2011a; S6s6rivanir 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 RI and T β RII 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 analyses 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^a 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^a 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 cell 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 (Vargo-Gogola and Ruzien, 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 (Petreni 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^a antibody addition. The recognition of tumor cells via sLe^a by NK cells and triggering of cytotoxicity is mediated by C-type lectin receptors, such as CD-94 and NKG2D (Higai et al., 2006; Ohya et al., 2002). Another death pathway against tumor cells stimulated by NK cells and influenced by the fucosylation is the Apo2L/TRAIL. The TNF-related apoptosis-inducing ligand (also known as Apo2L/TRAIL) mediates an extrinsic apoptosis pathway started 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 Algen ProDMO *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-D, 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

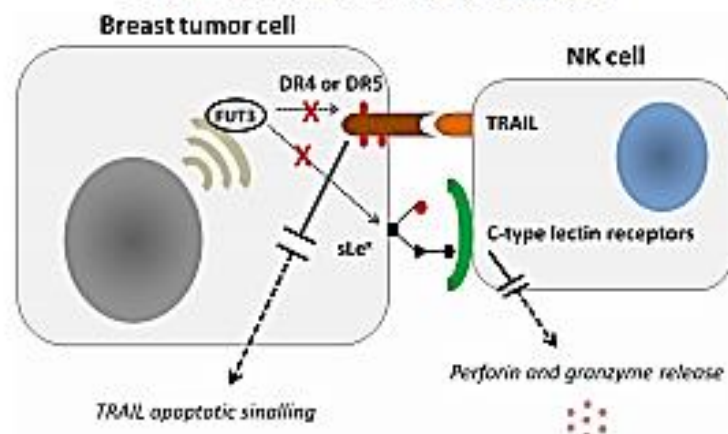


Fig. 2. Schematic representation of a breast tumor cell and an NK cell. The lack of FUT3 enzyme by breast cancer cells could result in no fucosylation of DR4 and DR5 receptors, blocking the TRAIL apoptotic signaling. FUT3 absence would also reduce fucosylated antigens in cell surface leading to non-recognition of Lewis antigens in tumor cell surface by C-type lectin receptors, preventing release of perforin and granzyme by NK-cells. Both mechanisms could promote the immunoresistance of breast tumor cell. NK: Natural killer; DR4: Death receptor 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 rs73020070 (–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 rs73020070 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.eump.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., Paricio-Dubois, L., Crous, C., Barra, V., Lombardi, D., Sadoul, M.O., May, E., 2003. Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by asialoglycans. *Int. J. Cancer* 98, 558–565.
- Ballesteros, 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. Gastroenterol. Oncol.* 3, 105–119. <http://dx.doi.org/10.4236/jgo.2012.31011>.
- Bartel, S.L., Wiley, G.K., Cho, J., Opperman, M.J., Hays, D.J., Siddiqui, J., Perma, E.J., Furie, B., Dimsdale, C.J., 2006. Alpha 1,3 fucosyltransferase are major regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10491–10496. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600741103>.
- Becker, D.J., Lowe, J.B., 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13, 41R–52R. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg054>.
- Bermyan-Ikanyt, M., Radziejewski, L., 2013. Changes of the expression of Lewis blood group antigens in Glypcomics of Breast Cancer Tissues. 63, 223–236.
- Burdick, M.M., Hanson, K.A., Delgadillo, L.F., Choi, Y.E., Geyer, D.J., Tang, D.F., Benavides, 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., Shohr, O., Papadimitrakou, P., Papadimitrakou, M.C., Owen, J.H., Acharanov-Papadimitrakou, M., Zheng, L., Papadimitrakou, G., Prince, M.E., Papadimitrakou, S., 2013. In vivo evaluation of sialyl Lewis X relationship with head and neck cancer stem cells. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 149, 97–104. <http://dx.doi.org/10.1177/0145568113482676>.
- Dierdorf, C., Lechmann, M., Long-Woodward, D., Knack, 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.
- Doki, T., Hashiguchi, M., Yamamoto, S., Morita, H., Oshima, M., 1994. Fucosyltransferase-producing sialyl Lea and sialyl Le^x carbohydrate antigen in benign and malignant gastrointestinal mucosa. *Cancer* 71, 1552–1561.
- Dube, D.H., Baroni, C.R., 2005. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutic and diagnostic. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 477–488. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1751>.
- Duval, E.J., Bener, C., Luján-Barroso, L., Weidenbach, C., Rousson-Ruault, M.C., Racine, A., Severt, C., Carlier, F., Rizzuto, C., Boelke, H., Overvad, K., 2014. Variation at ABO 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.28014>.
- Facchini, C., Machado, E., Bria, C., Reis, C.A., Serech, A., Bura, S., Marmé, A., Abenav, P., Costa, J., 2006. Different expression levels of alpha 1,3 fucosyltransferase and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines. *Int. J. Oncol.* 29, 557–566.
- Farré, D., Bower, R., Harris, M., Adams, J.L., Roelke, L., Albi, M.M., Munnings, K., 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MAUGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651–3652. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg005>.
- 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.28932>.
- Fountzilas, G., Dafni, U., Bihou, N., Barakou, A., Kozola, V., Tshia, H., Malamos-Mini, V., Mikras, S., Christaki, S., Papadimitrakou, S., Sotiropoulos, M., Filippidis, T., Gogos, H., Koloma, T., Rafailidis, D., Tziavara, D., Kakogeris, K.T., Pectoudis, D., Skarlatos, D.V., Kouras, A., Dimitrakou, M.A., 2012. Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* 7, 1–12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037946>.
- Gruze-Ogrynow, S., Krawinkel-Koch, M.-A., Cuvé, A., Vinken, A., Lehoucq, S., Lefebvre, J.-J., Van Seuningen, L., Delannoy, P., 2008. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferase and sulfotransferase involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem. J.* 410, 213–223. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20070558>.
- Hammond, M.E.H., Hayes, D.F., Wolff, A.C., Mangos, P.J., Terisa, 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, 185–197. <http://dx.doi.org/10.1200/JOP.777003>.
- He, M., Wu, C., Xu, J., Guo, H., Yang, H., Zhang, X., Sun, J., Hu, D., Zhou, L., Peng, T., He, Y., Gao, Y., Yuan, J., Ding, Q., Dai, X., Tan, A., Feng, Y., Zhang, H., Mao, X., Yang, X., Zhu, J., Zhu, K., Chang, J., Qiu, X., Tan, W., Hu, Y., Long, M., Tao, S., Li, Y., Li, Y., Peng, J., Li, D., Kim, S.-T., Zhang, S., Zhang, H., Zhang, S.J., Gu, L., Wang, Y., Wei, S., Wang, F., Fang, W., Liang, Y., Zhu, Y., Chen, W., Miao, X., Zhou, C., 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. *Clin. Chim. Acta* 343, 143–151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.014>.
- Higa, K., Ishikawa, A., Matsunaga, K., 2006. Binding of sialyl Lewis X antigen selectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1760, 1355–1362. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.015>.
- Hikawa, M., Takimizu, R., Tanaka, F., Yoshida, M., Ono, M., Murase, K., Sano, Y., Ogasu, T., Sano, T., Iwata, S., Miyazaki, K., Takada, K., Hayashi, T., Kobayashi, M., Kato, J., 2014. Fucosylated TGF- α receptors transduce a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* 110, 156–163. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.269>.
- Sellers, T.A., Huang, Y., Cunningham, J., Goode, G.L., Stephen, R., Vierkant, R.A., Kolesar, L.E., Fredericson, S.S., Leshem, M., Farkas, V.S., Hartman, L.C., Myers, J., Herman, J.S., Scholtz, J.M., Phelan, C., 2008. Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylase genes with risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 17, 387–404. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0505>.
- Jochims, U.D., Nijman, I., Shabat, N., Kusen-Hell, C., Sialyl Lewis X, 2005. Expression of sialyl Lewis X. 1622, 1615–1622.
- Johnson, R.W., Rowe, A.J., Smyth, M.J., 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression, and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 732–748. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2465>.
- Kajant, E., Taniuchi, Y., Ashiro, K., Katsuka, T., Ohda, 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-z>.
- Kanngi, R., 2004. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis X expression – the warburg effect revisited. *Cytocrit. J.* 20, 253–264.
- Karim, M.R., Sharmah, C., Ju, X., Vira, S.P., Schmitt, M., Calles, T., Nemes, L., Chen, D., Zhang, B., Ruppert, H.J., Samad, T., Manne, U., 2012. Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. *PLoS One* 7, e40620. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070130>.
- Kikawa, S., Sogawa, K., Saito, M., Umemura, H., Kodera, Y., Matsubara, K., Tomonaga, T., Miyazaki, M., Yokoyama, 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/10.1155/2012/136202>.
- 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 relationship between preoperative 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.21810>.
- Komatsu, H., Mizuguchi, S., Izumi, M., Chang, K., Hanada, S., Inoue, H., Saitoh, S., Nishiyama, N., 2013. Sialyl Lewis X as a predictor of deep 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-Latala, J.F., Langer, B.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 antigen (I^a/I^b) α -fucosyltransferase. *Gene Dev.* 4, 1288–1293. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.4.8.1288>.
- Lathuier, S.B., Ellis, L.O., Schmitt, S.J., Tan, P.-H., van de Vijver, M.J., 2012. Tumors of the breast. In: WHO Classification of Tumors of the Breast, 4th ed., pp. 1–112.
- Lee, C., Gault, A., Hoffman, J.L., Hayward, C., Kaelin, A., Karia, J.J., Polakoff, O., Gersht, O., Vitar, V., Abraham, J.L., Pu, M., Nevozhin, M., Reddy, I., Campbell, S., Wild, S.J., Barowski, F., Wang, W., Kolitz, I., Zeng, L., Cyllenen, L., Wilson, J.F., Wright, A.F., Huxley, M.D., Campbell, H., Budd, P.M., Rudin, I., 2010. Genomics reveals glycomics—the first CNV study of human N-glycome identifies HNF1a as a master regulator of plasma protein glycosylation. *PLoS Genet.* 6, e1001256. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001256>.
- Lim, J.H., Singh, G.P., Lantieri, C.M., 2011. The Emerging Importance of α -L-Fucose in Human Breast Cancer: A Review. 1, 282–323.
- Ma, H., Xiao, X., Ma, Q., Zheng, W., Zhou, H., Ju, L., 2012. Functional roles of glycogen and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 45, 409–422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.011>.
- Mare, L., Carver, A., Albertini, R., Trinchera, M., 2013. CA15.8 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, 725–738. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mv011>.
- Moriwaki, K., Mada, K., Furukawa, Y., Ohtsuka, K., Uchiyama, A., Nakagawa, T., Taniguchi, N., Dango, Y., Nakamura, Y., Hayashi, M., Miyoshi, E., 2008. Deficiency of CD63 leads to escape from NK cell-mediated tumor surveillance through modulation of TRAIL signaling. *Carcinogenesis* 29, 188–198. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn200>.
- Ogawa, C., Kato, 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, 13769–13774. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.124555999>.
- Padró, M., Coble, L., García, M., de Bakke, C., 2011a. Down-regulation of FUT3 and FUT6 by shRNA alters Lewis antigen expression and reduces the adhesion capacity of gastric cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 1141–1148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.011>.
- Padró, M., Mejías-Luque, R., Coble, L., 2011b. Regulation of glycosyltransferase and Lewis antigen expression by H-1 and H-2 in human gastric cancer cells. *Glycosci. J.* 29, 90–110. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-011-9223-4>.
- Petroni, T., Krenn, W., Schulze, R., Schlag, P.M., 2006. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinoma and liver metastases. *Curr. Mol. Med.* 6, 259–268. <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-006-2356-6>.
- Ramalh, C.A.V.F., Silva-Filho, J.L.Q., Caruso, M.F.S., Cavalcanti, C.R.L., Rêgo, M.J.B.M., Oliveira, M.B.M., Beltrão, E.L.C., 2014. Assessment of changes in the bcl2 and p53 genes in breast invasive ductal carcinoma in northeast Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 47, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-8761-2013-0287-47-1>.
- Sakuma, K., Ashi, M., Kanngi, R., 2012. Transcription factors c-Myc and CD22 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/EGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1111135109>.
- Serpa, J., Mesquita, F., Mendes, M., Oliveira, C., Almeida, R., Santos-Silva, F., Reis, C.A., Leão, J., David, I., 2006. Expression of bcl-2 in gastric cancer cell lines depends on FUT3 expression regulated by promoter methylation. *Cancer Lett.* 242, 181–197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.009>.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Khodolov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Stokich, B., 2001. DBNP: the NCB database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29, 208–211. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.1.208>.
- Shrivastava, A., Araki, N., Wongkham, C., Vannawongkham, C., Pongkajorn, C., Kawahara, K., Marumoto, Y., Sawada, H., Nishimura, H., Ohada, S., Sakaguchi, M., Wongkham, S., 2013. CA-529: a novel Lewis x associated carbohydrate epitope in diagnosis and prognosis for cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* 104, 1278–1284. <http://dx.doi.org/10.1111/cas.12232>.
- Terris, D.B., Santos, R.A., Takahashi, C.S., Caruso, M.F.S., Moreira, H.W., Moraes, L.C., Liu-Neto, M., Cunha, L.A., Rami, C.L., Soares, E.C., Donadi, E.A., Mello, E.B., Soares, C.P., 2010. Polymorphisms of Lewis and sialosyl genes are related to human cancer and metastasis in colonic lymph nodes. *Tumour Biol.* 31, 401–409. <http://dx.doi.org/10.1007/s12277-010-0048-2>.
- Uhlen, M., Olsson, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zetterberg, M., Kampf, C., Weiser, K., Hober, S., Werners, H., Björk, L., Poström, F., 2010. Towards a knowledge-based human proteome atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1210-1248>.
- Vargo-Cogola, T., Rosen, J.M., 2007. Modeling human cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer* 7, 658–672. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1501>.
- Vasconcelos, J.L.d.A., Ferreira, S.d.A., Lima, A.L.B., de Rêgo, M.J.B.M., ABC, B., Cavalcanti, C.d.L.B., Ura, M.M.d.M., Beltrão, E.L.C., 2013. Comparing the immunosuppression of FUT3 and FUT6 between pancreatic adenocarcinoma and benign pancreatic hyperplasia. *Ann. Hematol. Oncol.* 46, 105–108. <http://dx.doi.org/10.1357/hnc.13610>.
- Wagner, K.W., Puntoso, E.A., Januario, T., Lawrence, D.A., Pitt, R.M., Lincicum, E., Lee, D., von Gers, M., Wu, S.F., Topol, K., Hsu, L., Kato, V., Caves, G., Hynes, S.C., Amler, L., Ackland, A., 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2/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.
- Werners, H.W., Hiller, K.M., Mayhew, J.P., Manosue, G.A., Smith, K.M., Liu, R., Cusack, J.C., 1996. Expression of human α (1,3)fucosyltransferase antennase sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 2127–2135.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.C., Dowsett, M., McShane, L.H., Allison, K.H., Allred, D.C., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Fitzgibbon, P., Hanna, W., Jenkins, B.B., Mangu, P.B., Paik, S., Peris, E. A. P., Finn, M.F., Sparano, A., Vanna, C.H., Vu, C., 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, 3977–4037. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.50.0884>.
- Xie, Y., Ju, 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.
- Xie, Y., Liu, Y., Liu, S., Xie, F., Yan, Q., 2015. Fucosyltransferase IV (FUT4) as an effective biomarker for the diagnosis of breast cancer. *Biomol. Pharmacother.* 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.048>.
- Yin, X., Rana, R., Ponnudurai, V., King, M.B., 2010. Knockdown of fucosyltransferase II disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hemopoietic cell adhesion. *Carbohydr. Res.* 345, 2334–2342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.07.008>.
- Yuan, K., Kurik, D., Singh, R.K., Lintsky, C.M., Lim, J.H., Singh, G.P., 2008. Alterations in human breast cancer adhesion-molecule in response to changes in cell surface glycoproteins displaying α -L-fucose moieties. *Int. J. Oncol.* 32, 797–807. <http://dx.doi.org/10.1006/ijoc.2008.0223>.
- Zen, K., Liu, D.Q., Gao, 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>.

8.2 Parecer Consubstanciado Centre de Ciências da Saúde ãCCS/UFPE

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	 Plataforma Brasil
--	---	---	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PRÓGNOSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS.

Pesquisador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 06586612.9.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISU ASAMI

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 672.083

Data da Relatoria: 09/06/2014

Apresentação do Projeto:

Verifica-se que, na carcinogênese, ocorrem mudanças na expressão de proteínas celulares que levam à alterações nas vias de sinalização induzindo, frequentemente, mudanças no microambiente tumoral, causando inflamação e resultando em mudança no perfil das proteínas teciduais que podem ser secretadas (Kopfi & Zharhary, 2007). O grau de malignidade do câncer está relacionado à sua habilidade em desorganizar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras de tecidos adjacentes e metastatizar para órgãos distantes. Em termos simples, o câncer é uma doença de desenvolvimento resultante da perda dos controles normais que conduzem as células para acumular-se nos tecidos e que as matem dentro dos limites dos seus órgãos (De Melja et al., 2003). O padrão de glicosilação de proteínas de tecidos pode ser influenciado por diversas mudanças fisiológicas, tais como papéis em diversos processos biológicos como, sinalização celular, reconhecimento imunológico, metástase, diferenciação celular entre outros (Ambrosi et al., 2005; Rosenfeld et al., 2007). Lectinas, proteínas ligadoras de carboidratos e de distribuição ubíqua na natureza, possuem a

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS			
Bairro: Cidade Universitária		CEP: 50.740-600	
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2126-8588	Fax: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br	

Continuação do Parecer: 071183

capacidade de agir como moléculas de reconhecimento dentro de células e na superfície celular (Geimeiner et al, 2008).

Objetivo da Pesquisa:

1) Identificar novos biomarcadores de uso potencial no diagnóstico e prognóstico de alterações mamárias e prostáticas humanas utilizando sondas tradicionais e inovadoras;

2) Objetivo Secundário:

- Obter amostras clínicas (tecido e sangue) de pacientes submetidos a cirurgias realizadas nos setores de Urologia e Mastologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco, UFPE; - Obter blocos de tecidos mamários e prostáticos embebidos em parafina pertencentes ao setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco, UFPE; -

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios citados estão adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verifica-se que, o Grupo Biomarcadores no Câncer (BmC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) tem empregado a histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e biologia molecular para avaliar o perfil fenotípico e genotípico de carboidratos em glicoconjugados de superfície celular e a expressão de glicosiltransferases em tecidos humanos normais e transformados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão adequados.

Recomendações:

S/Recomendação;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

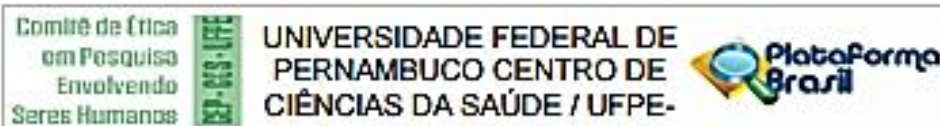
Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS		
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600	
UF: PE	Município: RECIFE	
Telefone: (81)2126-8588	Fax: (81)2126-8588	E-mail: cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 071.063

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 03 de Junho de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (011)2126-8568 Fax: (011)2126-8568 E-mail: cepccs@ufpe.br

8.3 Parecer Consubstanciado AC Camargo

 A.C. Camargo Cancer Center	FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE-HOSPITAL DO CÂNCER A C CAMARGO													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
Elaborado pela Instituição Coparticipante														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS.														
Pesquisador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão														
Área Temática:														
Versão: 5														
CAAE: 06586612.9.0000.5208														
Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI														
Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 522.612														
Data da Relatoria: 21/01/2014														
Apresentação do Projeto: O câncer de mama acomete grande número de mulheres no mundo todo levando a óbito um número considerável desta população, principalmente em países com baixa renda, onde a diagnóstico ocorre de maneira tardia. Para identificar esta neoplasia muitos biomarcadores foram propostos, no entanto, não há um consenso sobre o uso de marcadores efetivos principalmente para melhor diferenciação no diagnóstico histopatológico e para avaliação de melhor e pior prognóstico do desenvolvimento do tumor. Além disso, o envolvimento das glicosiltransferases e dos microRNAs já são vistos como possíveis biomarcadores para Melanoma e câncer cervical. Deste modo, tornam-se importantes a busca de novos biomarcadores para o câncer de mama a partir de estudos genotípicos e fenotípicos.														
Objetivo da Pesquisa: Avaliar a expressão do microRNA-30d e microRNA-214 e da Galnac 7 em biópsias do tumor diagnosticados como Carcinoma Ductal Invasivo (CDI).														
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:														
- Extrair RNAm e o microRNA de tecidos frescos diagnósticos com CDI; - Realizar protocolos para pesquisa de controles endógenos para as amostras estudadas;														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211</td> <td>CEP: 01.509-000</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Liberdade</td> <td>Município: SÃO PAULO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)2189-5020</td> <td>Fax: (11)2189-5020</td> <td>E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211		CEP: 01.509-000	Bairro: Liberdade	Município: SÃO PAULO		UF: SP			Telefone: (11)2189-5020	Fax: (11)2189-5020	E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211		CEP: 01.509-000												
Bairro: Liberdade	Município: SÃO PAULO													
UF: SP														
Telefone: (11)2189-5020	Fax: (11)2189-5020	E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br												



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO



Continuação do Parecer: 522-612

- Quantificar a expressão do microRNA-30d e microRNA-214 e do gene da glicosiltransferase GalNac 7 através de PCR em tempo real;
- Correlacionar os resultados de expressão de RNA e MicroRNA com os biomarcadores utilizados na rotina diagnóstica (Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona, HER-2, Ki67, p53, e-caderina) através de Imunohistoquímica;
- Avaliar a expressão da proteína GalNac 7 utilizando anti-GALNT7 através da imunohistoquímica e Western Blot;
- Avaliar a expressão dos carboidratos alpha 1,3 N-acetilgalactosamina através da histoquímica com lectinas utilizando a lectina Vicia villosa agglutinin (VVA-Vector).
- Correlacionar os resultados de expressão genotípica e fenotípica com os dados clínico-histopatológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica; estudo retrospectivo, sem riscos ou benefícios diretos aos participantes que serão incluídos no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pode trazer informações relevantes para o entendimento do câncer de mama.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios exigidos por este CEP foram adequadamente apresentados pelos pesquisadores. Esta Instituição está ciente da realização deste estudo em nossas dependências, conforme consta em Declarações de Ciência de Instituição Coparticipante e o estudo conta com a responsabilidade de pesquisadores Institucionais (Dr. Victor Plana de Andrade e Dr. Emmanuel Dias-Neto).

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do protocolo de estudo proposto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica; não há pendências ou questionamentos do ponto de vista ético.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hccancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE-HOSPITAL DO
CÂNCER A C CAMARGO



Continuação do Parecer: 522.6/12

Análise da Comissão de Pesquisa (COPE): Aprovado.

NOTA: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

SAO PAULO, 05 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Lutz Paulo Kowalski
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade CEP: 01.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Página 03 de 03