

Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

TIAGO BARROS SANTOS MALTA

**IMUNODETECÇÃO DE SIALILTRANSFERASE E HISTOQUÍMICA DE ÁCIDOS
SIÁLICOS NO CÂNCER DE MAMA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM EM
DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TERAPIA**

Recife

2016

TIAGO BARROS SANTOS MALTA

**IMUNODETECÇÃO DE SIALILTRANSFERASES E HISTOQUÍMICA DE ÁCIDOS
SIÁLICOS NO CÂNCER DE MAMA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM EM
DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TERAPIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Biologia
Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão/UFPE
Co-orientadora: Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha/UFPE

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Malta, Tiago Barros Santos

Imunodeteção de sialiltransferase e histoquímica de ácidos siálicos no câncer de mama e sua possível aplicação em diagnóstico, prognóstico e terapia / Tiago Barros Santos Malta – Recife: O Autor, 2016.

82 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientadora: Cíntia Renata Costa Rocha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

Inclui referências e anexo

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

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-329



Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Parecer da comissão examinadora da dissertação de mestrado de

TIAGO BARROS SANTOS MALTA

**IMUNODETECÇÃO DE SIALILTRANSFERASE E HISTOQUÍMICA DE ÁCIDOS
SIÁLICOS NO CÂNCER DE MAMA E SUA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM
DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TERAPIA**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera o candidato **TIAGO BARROS SANTOS MALTA** como:

APROVADO

Recife, 25 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Orientador

Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Departamento de Patologia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Maria Aparecida Seabra
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que
lutam contra o câncer*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e irmãos pela paciência, incentivo e inspiração.

Aos meus sobrinhos que abastecem o coração de alegria.

À Raíssa Simões por compartilhar muito amor e sorrisos.

Aos meus amigos: Luis Gabriel, Cláudio Leimig, Lucas Bezerra, Marcela Santana, Gustavo Ximenes, pelas cervejas, pelas conversas, pelos conselhos, por ter ajudado a construir quem eu sou.

Ao meu orientador Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão por ter me acolhido no grupo de Biomarcadores no Câncer, por sua dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos. Tem toda minha admiração profissional e pessoal, um exemplo e inspiração.

À professora Cíntia Rocha pela orientação e apoio.

Ao professor Luís Bezerra por suas aulas e histórias encantadoras.

À Marina e Carmel por todo suporte técnico.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do LIKA: Arthur, Amanda, Aline, Cida, Matheus, Igor, Steffany, Jéssica que me deram suporte a todo e qualquer momento.

À todo grupo BmC pelo compartilhamento de conhecimento e experiências.

Ao LIKA e todos seus funcionários.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“...um coelho branco é tirado de dentro de uma cartola. E porque se trata de um coelho muito grande, este truque leva bilhões de anos para acontecer. Todas as crianças nascem bem na ponta dos finos pêlos do coelho. Por isso elas conseguem se encantar com a impossibilidade do número de mágica a que assistem. Mas conforme vão envelhecendo, elas vão se arrastando cada vez mais para o interior da pelagem do coelho. E ficam por lá. Lá embaixo é tão confortável que elas não ousam mais subir até a ponta dos finos pêlos, lá em cima. Só os filósofos têm ousadia para se lançar nesta jornada rumo aos limites da linguagem e da existência. Alguns deles não chegam a concluí-la, mas outros se agarram com força aos pêlos do coelho e berram para as pessoas que estão lá embaixo, no conforto da pelagem, enchendo a barriga de comida e bebida...”

(Jostein Garden)

RESUMO

O câncer de mama feminino é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com aumento de incidência de 22% a cada ano. Estudos nas últimas décadas revelaram que a transformação maligna está associada a uma variedade de células com padrões de glicosilação alterados, como por exemplo a sialilação. Os ácidos siálicos tem sido relacionados à iniciação e progressão do câncer, tendo assim implicações potenciais na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. Este trabalho avaliou a expressão fenotípica de ST3Gal-I, através da imunohistoquímica, e o perfil de ácido siálico, através da histoquímica com lectinas usando *Maackia Amurensis agglutinin II* (MAA), em tecidos mamários diagnosticados com fibroadenoma (n=59), carcinoma ductal *in situ* (CDIS, n=40), carcinoma ductal invasivo (CDI, n=50) e carcinoma lobular (CL, n=42). Todos os tipos de lesões de mama apresentaram alta imunopositividade à ST3Gal-I, sendo observada uma expressão em 93,2% dos casos de Fibroadenoma, 92,5% de CDIS, 96% dos casos CDI e 85,2% de CL. As células apresentaram um padrão de marcação citoplasmático e perinuclear com relação à ST3Gal-I. Diferentes distribuições de resíduos de ácido siálico α 2,3-ligados, com um padrão de marcação predominantemente citoplasmático e membranar, foram observados nas lesões de mama estudadas. Os casos de fibroadenoma apresentaram o menor percentual de sialilação entre as lesões analisadas (47,5%), enquanto os de CDI o maior percentual (98%). Embora este estudo não tenha mostrado diferença significativa na expressão de ST3Gal-I entre as lesões de mama, alterações representativas na presença de ácidos siálicos entre fibroadenoma e lesões malignas ($p < 0,0001$), e também entre CDIS e CDI ($p = 0.037$) foram notadas. Não foram encontradas correlações significativas entre as expressões de ST3Gal-I e MAA, os marcadores de rotina e as características clinico-histopatológicas dos pacientes. Os resultados indicam uma distribuição particular de ácidos siálicos α 2,3-ligados nas células mamárias entre as lesões estudadas sugerindo seu envolvimento na progressão/manutenção do câncer de mama.

Palavras-chave: Sialiltransferases. Ácido siálico. Imunohistoquímica. Lectinas. Câncer de mama.

ABSTRACT

The female breast cancer is the second most common type of cancer in the world, with increased incidence of 22% every year. Recent studies in recent decades have revealed that the malignant transformation is associated with a variety of cells with altered glycosylation patterns such as sialylation. Sialic acids have been demonstrated to participate in cancer initiation and progression, thus has potential implications for cancer prevention, diagnosis and treatment. This study evaluated the phenotype expression of ST3Gal-I using immunohistochemistry and the sialic acid residues profile by histochemistry with *Maackia amurensis agglutinin II* (MAA) in mammary tissues diagnosed as fibroadenoma (n=59), ductal carcinoma *in situ* (DCIS, n=40), invasive ductal carcinoma (IDC, n=50) and lobular carcinoma (LC, n=42). All types of breast lesions showed high ST3Gal-I immunopositivity, its expression was observed in 93.2% cases of Fibroadenoma, 92.5% of DCIS, 96% of IDC and 85.2% cases of LC. The cells ST3Gal-I staining pattern was mainly cytoplasmatic and perinuclear. The MAA staining in breast lesions showed a diffuse cytoplasmatic and membrane pattern with different distribution of α 2,3-linked sialic acids among the lesions studied, fibroadenoma cases showed the lowest percentage among the analyzed lesions (47.5%) while IDC showed the highest (98%). Although this study did not show a significant difference in expression of ST3Gal-I among all lesions, representative alterations in sialic acid content between fibroadenoma and malignant lesions ($p<0.0001$), and also between DCIS and CDI ($p=0.037$) were observed. No significant correlations were found between the expressions of ST3Gal-I and MAA, routine markers and clinical-histopathological characteristics of the patients. Results indicate different distribution of α 2,3-linked sialic acids on the cells of the studied lesions which seems to be involved in breast cancer progression and/or maintenance.

Keywords: Sialic acid. Sialyltransferases. Breast cancer. α 2,3-sialyltransferases. Lectins. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progressão tumoral e geração de heterogeneidade. Com a progressão, novos subclones surgem devido a múltiplas mutações e os mais aptos a sobreviver e a evadir das defesas do hospedeiro são selecionados e enriquecem a massa tumoral. 18

Figura 2 - Causas mais comuns de morte por câncer e sua incidência. 22

Figura 3 - Perfil simplificado da anatomia mamária e detalhe do duto mamário no aumento. A: dutos; B: lóbulos; C: dutos dilatados para armazenar leite; D: mamilo; E: tecido adiposo; F: músculo peitoral maior; G: caixa torácica. No aumento: A: células ductais normais; B: membrana basal; C: lúmen. 23

Figura 4 - Tecido mamário com carcinoma ductal in situ (X) e carcinoma ductal invasivo (Y) em uma secção aumentada do duto. No aumento em X: A - célula ductal normal; B - células ductais transformadas; C - membrana basal; D - lúmen. No aumento em Y: A - célula ductais normais; B - células ductais transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal. 27

Figura 5. Tecido mamário com carcinoma lobular in situ (X) e carcinoma lobular invasivo (Y) em uma secção aumentada do lóbulo. No aumento em X: A - célula lobular normal; B - células lobulares transformadas; C - membrana basal. No aumento em Y: A - célula ductais normais; B - células lobulares transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal. 28

Figura 6. Estrutura do ácido siálico Neu5Ac 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores imunohistoquímicos para diagnostico do câncer de mama.	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn	Asparagina
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Cys	Cisteína
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina
Glc	Glicose
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GT	Glicosiltransferase
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidermal humano do tipo 2
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Citoqueratina 67
Man	Manose
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases
Neu5Gc	Ácido N-Glicolilneuramínico
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
ppGalNAc-Ts	UDP-N-acetilgalactosaminil transferases
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
Ser	Serina
Sia	Ácido siálico
ST	Sialiltransferase
Thr	Treonina
UDP-GalNAc	Uridina difosfato-N-Acetilgalactosamina
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CÂNCER	15
2.2	CÂNCER DE MAMA	22
2.3	IMUNOHISTOQUÍMICA NO CÂNCER DE MAMA	30
2.4	GLICOBIOLOGIA	34
2.5	ÁCIDOS SIÁLICOS	37
2.6	LECTINAS	42
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS E SIALILTRANSFERASES EM TECIDOS MAMÁRIOS	46
5	CONCLUSÕES	68
6	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial diretamente relacionada com mutações genéticas no DNA e tem como característica o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Mais de 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer em 2013 (WHO, 2015), sendo o câncer de mama responsável por aproximadamente 600 mil mortes. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil deverá registrar, em 2016, 596 mil novos casos de câncer sendo o câncer de mama o segundo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres com 57.960 casos, perdendo apenas para o câncer de pele não-melanoma (INCA, 2015).

Existem diversas variáveis que atuam no crescimento, desenvolvimento, e apresentação clínica do câncer de mama, exercendo influência direta no tratamento da doença, devido ao grande espectro clínico possível. Alterações genéticas específicas de cada tipo tumoral, como expressão de genes e receptores celulares, são as principais variáveis envolvidas. Essas alterações impactam no curso clínico e são utilizadas para estratificação do tratamento (POLYAK, 2007; BASKIN; YIGITBASI, 2010).

O grau de malignidade do câncer está relacionado à sua habilidade em desorganizar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras de tecidos adjacentes e metastizar para órgãos distantes. Em termos simples, o câncer é uma doença de desenvolvimento resultante da perda dos controles celulares de proliferação normais que conduzem a uma superpopulação de células modificadas morfofuncionalmente com o intuito de desestabilizar a homeostasia e podendo provocar a morte do indivíduo (KOPF ; ZHARHARY, 2007).

O processo que leva células normais a se transformarem em malignas, a carcinogênese, apresenta um mecanismo complexo no qual ocorrem mudanças na expressão de proteínas e glicoconjugados celulares (glicoproteínas e glicolipídios). Essa mudança leva à alterações nas vias de sinalização, induzindo mudanças no microambiente tumoral, causando inflamação e resultando em mudança no perfil das proteínas de superfície e/ou exportação celular, moduladoras da capacidade de adesão e reconhecimento celular (SHIMAA *et al*, 2006; KOPF ; ZHARHARY, 2007; POTAPENKO *et al*, 2010; CHRISTIANSEN *et al*, 2014).

Por muitos anos, os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos chamaram atenção dos pesquisadores mundialmente. Os carboidratos, provavelmente por serem muito complexos e

não estarem codificados no genoma, só têm recebido importância mais recentemente com a expansão do campo da glicobiologia (GHAZARIAN *et al*, 2011).

A ocorrência do câncer pode, portanto, influenciar mudanças no padrão dos carboidratos de glicoconjugados celulares, principalmente proteínas. Desta forma aumentam-se as evidências de que os carboidratos têm papéis em diversos processos biológicos como, sinalização celular, reconhecimento imunológico, metástase, diferenciação celular, entre outros (ROSENFELD *et al*, 2007; PINHO ; REIS, 2015). Essas diferenças são dadas através de um mecanismo denominado de glicosilação, um dos mais importantes processos biológicos de modificações pós-traducional na estrutura final e função de proteínas e lipídios, mediado por glicosiltransferases, enzimas com função de inserir resíduos de carboidratos especificamente nos glicoconjugados (MAEDA ; NISHIMURA, 2008; CRESPO *et al*, 2013).

Dentre as glicosiltransferases, as sialiltransferases - enzimas que transferem resíduos de ácidos siálicos à proteínas - desempenham um papel fundamental em uma variedade de processos biológicos, incluindo a comunicação célula-célula, interação célula-matriz, adesão e direcionamento de proteínas. Uma sialilação aberrante pode mediar eventos fisiopatológicos-chave durante a progressão tumoral, incluindo a invasão e metástase (CAZET *et al*, 2010; FERREIRA *et al*, 2013; CHRISTIANSEN *et al*, 2014).

O reconhecimento dos glicanos como mediadores de processos biológicos importantes estimulou o interesse crescente na pesquisa em glicobiologia (ADAMCZYK, 2012). A utilização de lectinas, (glico)proteínas de origem não imunológica que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos livres e glicoconjugados (MELO-JUNIOR *et al*, 2011; LEAL *et al*, 2012), surge como uma importante ferramenta para detectar mudanças no padrão de glicosilação na superfície das células transformadas (CHANDRASEKARAN *et al*, 2006).

A glicobiologia, aliada à genômica e proteômica, voltada para a oncologia experimental tem recebido destaque internacional. O presente projeto objetiva a análise do fenótipo de sialiltransferases e perfil de carboidratos em tecidos mamários transformados benigna e malignamente buscando contribuir com o esclarecimento da biologia tumoral e com possíveis aplicações de moléculas-alvo no diagnóstico, prognóstico e terapia destas doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Câncer, neoplasia ou tumor são termos utilizados para designar um grande grupo de doenças que compartilham uma profunda desregulação de importantes funções celulares. O câncer é uma doença multifatorial frequentemente associada a uma desordem genética causada por mutações no DNA que são adquiridas espontaneamente ou induzidas por agentes externos. Além disso, os cânceres geralmente mostram alterações epigenéticas, como o aumento focal da metilação de DNA e alterações nas modificações da histona. As alterações genéticas e epigenéticas modificam a expressão ou função de genes-chave que regulam os processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência e senescência (GREAVES ; MALEY, 2012; INCA, 2015; WHO, 2015).

As neoplasias podem ser divididas em benignas e malignas, essa divisão se baseia nas características e comportamento clínico potencial de um tumor. Em geral, os tumores benignos parecem ser geneticamente “simples”, contendo menos mutações que os cânceres, e geneticamente estáveis, com poucas alterações no genótipo com o passar do tempo. Na prática, a classificação dos tumores em benigno ou maligno é feita utilizando-se critérios clínicos e anatômicos, algumas características podem indicar alto grau de diferenciação e outras malignidade. A distinção pode ser feita com base em quatro características fundamentais: grau de diferenciação, velocidade de crescimento, invasão local e metástase (KREEGER ; LAUFFENBURGER, 2010; HANAHAN ; WEINBERG, 2011).

Com relação ao grau de diferenciação, as neoplasias benignas são compostas por células bem diferenciadas que se assemelham ao tecido de origem. Quanto mais diferenciada for a célula tumoral, mais ela mantém a forma e capacidade funcional de sua contraparte normal. Os tumores malignos se caracterizam por uma gama de diferenciações celulares, desde bem diferenciadas até as completamente indiferenciadas (anaplásicas) (HANAHAN ; WEINBERG, 2000; HANAHAN ; WEINBERG, 2011).

Os tumores benignos, em geral, crescem lentamente e a maioria dos cânceres cresce muito mais depressa. Devido ao crescimento lento, nas neoplasias benignas é possível a formação de uma estrutura capilar ao redor do tumor para sua nutrição, e o desenvolvimento

de uma cápsula fibrosa que as separa do hospedeiro. Por sua vez, por apresentarem um crescimento rápido, as neoplasias malignas geralmente apresentam áreas centrais de necrose isquêmica. A taxa de crescimento dos tumores malignos normalmente correlaciona-se inversamente com o seu nível de diferenciação. Ou seja, tumores mal diferenciados tendem a crescer mais rapidamente que tumores bem diferenciados (HANAHAHAN ; WEINBERG, 2000; HANAHAHAN ; WEINBERG, 2011).

Duas outras características muito importantes são a invasividade local e metástase. Uma neoplasia benigna permanece localizada em seu sítio de origem, ela não tem a capacidade de se infiltrar, invadir ou metastizar. Em contrapartida, os tumores malignos crescem por meio de infiltração, invasão, destruição e penetração no tecido circundante. A capacidade invasiva adquirida por essas células possibilita sua permeação para os vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, criando a possibilidade para uma disseminação. Em geral, quanto mais anaplásica e maior a neoplasia primária, mais provável será a disseminação metastática (HANAHAHAN ; WEINBERG, 2000; HANAHAHAN ; WEINBERG, 2011).

Os agentes externos envolvidos na transformação neoplásica incluem: agentes físicos (radiação ionizante e ultravioleta), agentes químicos (asbestos, componentes do tabaco, aflatoxina, arsênico) e biológicos (infecção por certos vírus, bactérias ou parasitas) (GREAVES ; MALEY, 2012; WHO, 2015). Cerca de um terço das mortes por câncer são devido a cinco principais riscos comportamentais e alimentares: índice de massa corporal elevado, pouca ingestão de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e uso de álcool. O uso de tabaco é o fator de risco mais importante para o câncer, causando cerca de 20% das mortes por câncer global e cerca de 70% das mortes por câncer pulmonar global (WHO, 2015). Fumantes chegam a ter 20 vezes mais chances de ter câncer de pulmão que não fumantes, 10 vezes mais chances de ter câncer de laringe e de duas a cinco vezes mais chances de desenvolver câncer de esôfago (INCA, 2015).

Com relação ao excesso de gordura corporal, por exemplo, ele pode estar na origem de boa parte de novos casos de câncer. Estudos apontam evidências que relacionam o excesso de peso e o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os de cólon e reto, mama (na pós-menopausa), ovário, próstata, esôfago e endométrio (INCA, 2015). O envelhecimento também é um fator de risco importante para o desenvolvimento de câncer. A incidência de câncer aumenta drasticamente com a idade, muito provavelmente devido a uma acumulação

de riscos aliada com a tendência dos mecanismos de reparo celular serem menos eficazes enquanto uma pessoa envelhece (WHO, 2015).

Os danos adquiridos pelas células tumorais, sejam por fatores genéticos ou fatores externos discutidos anteriormente, é a base da carcinogênese. Os principais alvos do dano genético são genes reguladores normais que pertencem a quatro classes: os genes promotores de crescimento (proto-oncogenes), genes inibidores de crescimento (supressores de tumor), genes que regulam a apoptose e genes envolvidos no reparo de DNA (BECKMAN ; LOEB, 2005; KREEGER ; LAUFFENBURGER, 2010; GREAVES ; MALEY, 2012).

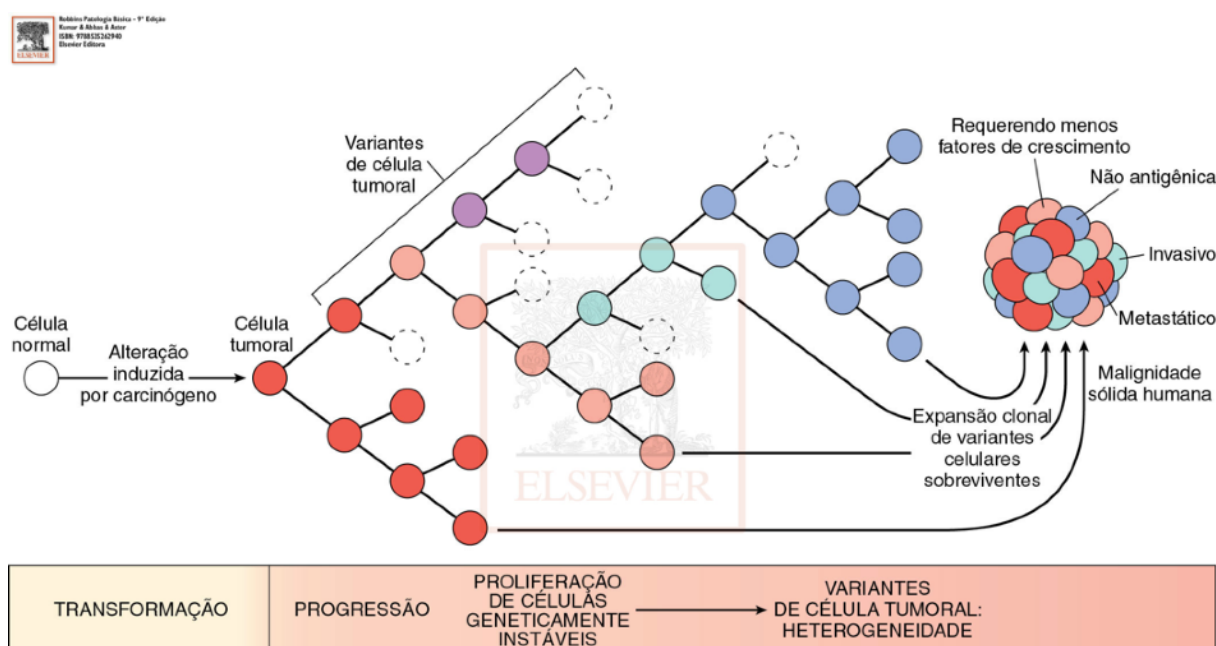
Os oncogenes, versões mutadas ou superexpressas dos proto-oncogenes, codificam fatores de transcrição, proteínas reguladoras do crescimento ou proteínas envolvidas na sobrevivência celular e interação célula-célula e célula-matriz. Por sua vez, os genes supressores de tumor são genes que normalmente impedem o crescimento descontrolado e, quando sofrem mutação permitem o desenvolvimento do fenótipo transformado. Juntas, as alterações genéticas em células tumorais conferem vantagens de crescimento e sobrevivência em relação às células normais (HERZIG ; CHRISTOFORI, 2002; BOLAND ; GOEL, 2005; HANAHAN ; WEINBERG, 2011).

As células tumorais podem adquirir mutações por vários meios, sendo as mutações pontuais e anormalidades cromossômicas não aleatórias que mais contribuem para a malignidade. Elas incluem translocações equilibradas, deleções e manifestações citogenéticas de amplificação de genes. Translocações equilibradas contribuem para a carcinogênese por superexpressão de oncogenes ou geração de novas proteínas de fusão com capacidade alterada de sinalização (favorecendo o crescimento celular). Com frequência, as deleções afetam os genes de supressão tumoral, enquanto a amplificação de genes aumenta a expressão dos oncogenes (HERZIG ; CHRISTOFORI, 2002; KREEGER ; LAUFFENBURGER, 2010).

A hipótese mais aceita atualmente para explicar o processo da carcinogênese sugere que a massa tumoral seja resultado de uma expansão clonal de uma célula progenitora que sofreu um acúmulo de várias alterações genéticas. Coletivamente essas alterações dão origem ao fenótipo transformado e podem dar vantagens competitivas às células transformadas. Depois de iniciados, os cânceres progridem e sofrem seleção natural (HERZIG ; CHRISTOFORI, 2002; KREEGER ; LAUFFENBURGER, 2010; GREAVES ; MALEY, 2012).

A progressão tumoral não é apenas um aumento de tamanho do tumor, ela está relacionada com a agressividade, malignidade e heterogeneidade celular. A progressão e a heterogeneidade associada resultam de múltiplas mutações que se acumulam independentemente em diferentes gerações de células, produzindo subclones com diferentes características, como a capacidade de invasão, taxa de crescimento, capacidade metastática, responsividade hormonal e susceptibilidade a drogas anti-neoplásicas. A Figura 1 ilustra o processo de transformação e progressão tumoral resultando em um massa tumoral com subclones que possuem características diversas (HANAHAAN ; WEINBERG, 2000; HANAHAAN ; WEINBERG, 2011; GREAVES ; MALEY, 2012).

Figura 1 - Progressão tumoral e geração de heterogeneidade. Com a progressão, novos subclones surgem devido a múltiplas mutações e os mais aptos a sobreviver e a evadir das defesas do hospedeiro são selecionados e enriquecem a massa tumoral.



Fonte: Kumar *et al*, 2013.

Devido a essa heterogeneidade e complexidade genotípica, Hannahan e Weinberg (2000 e 2011) propuseram que a transformação maligna apresenta alterações fundamentais no controle celular, as chamadas características do câncer (“hallmarks of cancer”):

- a. Autossuficiência nos sinais de crescimento: as células normais requerem estimulação por fatores de crescimento para se proliferarem. Os fatores de crescimento possuem ação parácrina, ou seja, os que são produzidos por uma célula agem na vizinha. Geralmente, as células não possuem receptores para os fatores de crescimento que elas produzem, evitando a formação de circuitos de feedback positivo. A autossuficiência nos sinais de crescimento consiste na capacidade das células cancerígenas de sintetizar muitos dos fatores de crescimento aos quais elas são responsivas (ação autócrina). Outro mecanismo que sustenta essa característica é a interação das células transformadas com o estroma. Neste caso, as células tumorais enviam sinais para que as células normais do estroma produzam fatores de crescimento que promovem a proliferação tumoral;
- b. Insensibilidade aos fatores anti-crescimento: em um tecido normal, muitos sinais anti-proliferativos atuam para manter a célula em um estado quiescente, diminuindo a proliferação celular e mantendo a homeostase tecidual. Os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a proliferação celular mediante a regulação do ciclo celular. A perda de função de tais genes nas células cancerígenas se tornam insensíveis à inibição de crescimento contribuindo para o crescimento celular desregulado;
- c. Evasão da morte celular: é bem estabelecido que o acúmulo de células neoplásicas pode resultar não somente da ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumor, mas também de mutações nos genes que regulam a apoptose. Um exemplo diz respeito ao gene BCL-2. Uma translocação desse gene, t(14;18), causa superexpressão da proteína BCL-2/BCL-X, que protege as células contra apoptose, permitindo que elas sobrevivam e se acumulem no tecido lesado;
- d. Potencial replicativo ilimitado: as células normais possuem capacidade de replicação limitada (60-70 duplicações). Com o tempo, as células somáticas perdem a capacidade de se dividir e entram em um estado de senescência, fenômeno atribuído ao encurtamento progressivo dos telômeros devido a ausência da expressão da telomerase, enzima que adiciona nucleotídeos aos telômeros. As células tumorais expressão

novamente a telomerase e reativam os telômeros, promovendo assim sua sobrevivência e tumorigênese;

- e. Angiogênese sustentada: os tumores necessitam de entrega de oxigênio e nutrientes, assim como remoção de resíduos provenientes do metabolismo celular. Mesmo com as vantagens de crescimento adquiridas, como discutido anteriormente, o diâmetro dos tumores não pode aumentar além de 1-2 mm, a não ser que sejam vascularizados. Assim, as células cancerígenas podem estimular a neoangiogênese - formação de novos vasos a partir de capilares preexistentes - ou a vasculogênese - recrutamento de células endoteliais da medula óssea. A vascularização é controlada pelo equilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos que são produzidos pelo tumor e pelas células estromais. A angiogênese é necessária não apenas para o contínuo crescimento tumoral, mas também para o acesso à vasculatura e, portanto, à metástase;
- f. Capacidade de invasão tecidual e metástase: a capacidade de invadir tecidos, uma característica da malignidade, ocorre em quatro etapas: afrouxamento do contato entre as células tumorais, degradação da matriz extracelular (MEC), alteração na fixação das células tumorais aos novos componentes da MEC, migração das células tumorais. Os contatos célula-célula se perdem por inativação das E-caderinas, proteínas que funcionam na adesão celular. Em seguida, a degradação da matriz extracelular é mediada por enzimas proteolíticas secretadas por células tumorais e células estromais, como metaloproteinases (MMPs) e catépsinas. As enzimas proteolíticas também liberam fatores de crescimento sequestrados da MEC e geram fragmentos quimiotáticos e angiogênicos decorrentes das clivagens das glicoproteínas da MEC;
- g. Reprogramação do metabolismo energético: a reprogramação do metabolismo de energia é muito comum aos tumores. As células cancerígenas desviam seu metabolismo de glicose das mitocôndrias para a glicólise, mesmo na presença abundante de oxigênio. Esse fenômeno é conhecido como efeito de Warburg ou glicólise aeróbica. Essa via metabólica é menos eficiente do que a fosforilação oxidativa, produz 2 moléculas de ATP (adenosina-trifosfato) por molécula de glicose ao invés de 36, no entanto, o

metabolismo por glicólise aeróbica é favorecido quando um crescimento rápido é requerido. Mesmo gerando menos energia, o efeito Warburg favorece o desvio de piruvato para as vias biossintéticas fazendo com que as células tumorais sejam capazes de formar seus componentes necessários à divisão celular, como proteínas, membranas e organelas;

- h. Evasão do sistema imune: os tumores possuem a capacidade de se evadir à destruição por parte do sistema imune mesmo expressando antígenos considerados não-próprios que deveriam desencadear uma resposta imune efetiva. Existem alguns mecanismos de escape que propõem: (1) um crescimento seletivo de variantes negativas dos antígenos, que consiste na eliminação de subclones fortemente imunogênicos durante a progressão tumoral; (2) imunossupressão, em que os tumores ou os produtos tumorais secretados suprimem as respostas imunes; (3) mascaramento do antígeno, as células tumorais por possuir uma cobertura mais espessa de glicoconjugados na superfície celular impedem o acesso das células imunes aos antígenos impedindo a resposta imunológica.

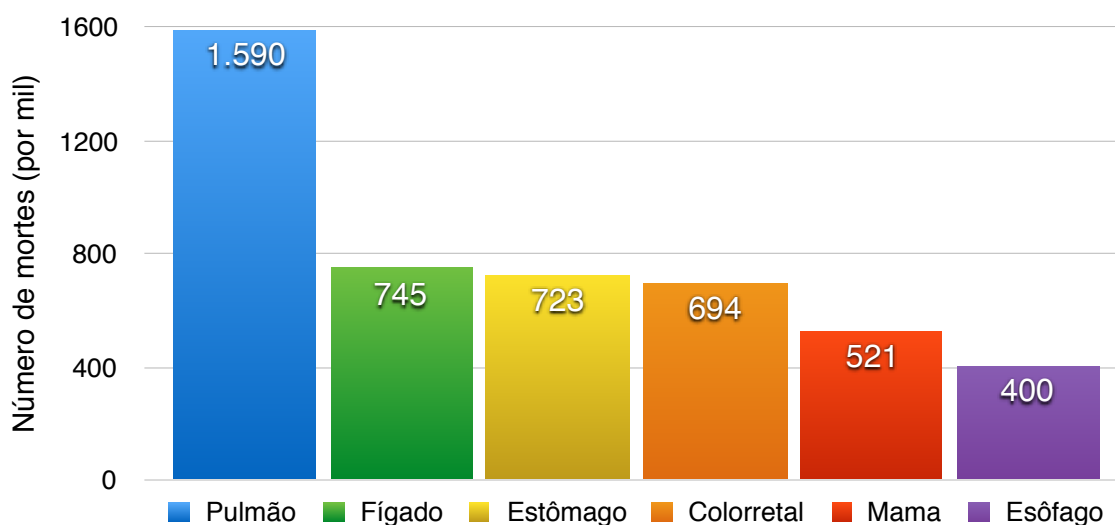
O câncer figura entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos. Em 2012, foram relatadas 8,2 milhões de mortes relacionadas com câncer. O número de novos casos deverá aumentar em cerca de 70%, de 14 milhões em 2012 para 22 milhões, durante as próximas duas décadas. Mais de 60% dos novos casos anuais totais do mundo ocorrem na África, Ásia e América Central e do Sul. Essas regiões representam 70% das mortes por câncer do mundo (WHO, 2015). A Figura 2 mostra a incidência em relação aos tipos mais comuns de câncer.

De acordo com as estimativas 2016/2017 do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil deverá registrar, em 2016, 596 mil novos casos de câncer. Entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.800. O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não-melanoma com 175.760 de casos novos. Depois desse, o câncer de próstata será o mais incidente entre os homens (61.200 casos), e o câncer de mama entre as mulheres (57.960 casos) (INCA, 2015).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste. Já na região Norte, é

segundo o tumor mais incidente (INCA, 2015). As regiões Sul e Sudeste possuem características mais semelhantes aos países desenvolvidos, que se refletem nos principais tipos de câncer estimados para estas regiões, como próstata, mama e cólon e reto. Tais características incluem uma elevada prevalência de excesso de peso e obesidade, inatividade física e consumo de carnes processadas (salsicha, presunto, linguiça, carne seca, etc.) (INCA, 2015).

Figura 2 - Causas mais comuns de morte por câncer e sua incidência.



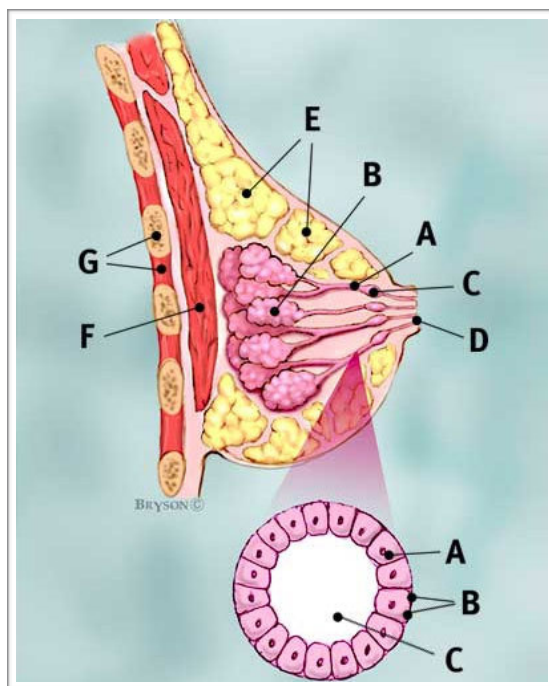
Fonte: WHO, 2015.

2.2 CÂNCER DE MAMA

O termo câncer de mama se refere a um tumor maligno que se desenvolve a partir das células da mama. Normalmente, o câncer de mama começa ou nas células dos lóbulos, que são as glândulas produtoras de leite, ou nas dos dutos, as passagens que drenam o leite dos lóbulos para o mamilo. Menos comumente, o câncer de mama pode começar nos tecidos do estroma, que incluem os tecidos conjuntivos fibrosos e gordurosos da mama. Ao longo do tempo, as células cancerosas podem invadir o tecido mamário saudável próximo e fazer o seu caminho para os linfonodos axilares. Se as células cancerosas se estabelecerem nos gânglios linfáticos, elas têm, então, um caminho para outras partes do corpo (SIMPSON *et al*, 2003;

BURSTEIN *et al*, 2004; BATEMAN, 2007; BREASTCANCER.ORG, 2015). A Figura 3 ilustra, de forma simplificada, a anatomia da mama.

Figura 3 - Perfil simplificado da anatomia mamária e detalhe do duto mamário no aumento. A: dutos; B: lóbulos; C: dutos dilatados para armazenar leite; D: mamilo; E: tecido adiposo; F: músculo peitoral maior; G: caixa torácica. No aumento: A: células ductais normais; B: membrana basal; C: lúmen.



Fonte: breastcancer.org, 2015.

O câncer de mama deve-se, em geral, a uma anomalia genética. No entanto, apenas 5-10% dos tumores são devido a uma anormalidade hereditária. Por outro lado, 85-90% dos tumores da mama são devido a anormalidades genéticas que ocorrem como resultado do processo de envelhecimento e "desgaste" em geral (BREASTCANCER.ORG, 2015).

O câncer de mama é o câncer mais comum em mulheres e só perde para o câncer de pulmão como causa de morte relacionada ao câncer. Um grande número de fatores de risco para câncer de mama foi identificado. Entre eles estão: a idade, variações geográficas, raça/etnia, entre outros (BATEMAN *et al*, 2009).

Com relação a idade, o risco aumenta progressivamente ao longo da vida, especialmente depois da menopausa. Cerca de 75% das mulheres com câncer de mama tem mais de 50 anos de idade, e apenas 5% tem menos de 40. Diferenças nas taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama têm sido relatadas por vários países, e tem sido constatado um risco

significativamente maior de desenvolvimento dessa doença na América do Norte e no norte da Europa em comparação com a Ásia e África. Essas diferenças parecem ser ambientais e não de origem genética, uma vez que os imigrantes das áreas de baixa incidência para as áreas de alta incidência tendem a adquirir as taxas do país de residência. Acredita-se que isso se deve aos hábitos alimentares, padrões reprodutivos e de amamentação (INCA, 2015).

Verifica-se também uma disparidade da incidência quando se comparam diferentes etnias. Uma maior taxa de câncer de mama é observada em mulheres brancas não hispânicas. Entretanto, mulheres hispânicas e afro-americanas tendem a desenvolver esse tipo de câncer em uma idade mais jovem e são mais suscetíveis a desenvolver tumores mais agressivos. Acredita-se que isso ocorre devido alguma combinação de diferenças genéticas e fatores sociais, como opções de vida e acesso aos cuidados de saúde (EHEMAN *et al*, 2009).

Estudos recentes mostram uma relação entre a incidência do câncer de mama e influências hormonais. A exposição prolongada ao estrogênio combinado com progesterona na pós-menopausa, como ocorre no tratamento de reposição hormonal, por exemplo, está associado ao risco aumentado de câncer de mama, diagnóstico em estágio mais avançado e maior incidência de mamografias anormais. O excesso de estrogênio endógeno que estimula a produção de fatores de crescimento promovendo o desenvolvimento do tumor através de mecanismos parácrinos e autócrinos. Já os contraceptivos orais não mostram aumentar o risco de câncer de mama, mesmo em mulheres que tomaram a pílula muito tempo ou em mulheres com histórico familiar de câncer de mama (EHEMAN *et al*, 2009).

Outros fatores de risco menos estabelecidos, como obesidade, consumo de álcool e dieta rica em gordura, tem sido envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama por análise de estudos da população. O risco associado à obesidade é provavelmente devido à uma maior exposição da mama ao estrogênio produzido pelo tecido adiposo (KUMAR *et al*, 2013).

Com relação às alterações genéticas, mutações em proto-oncogenes e em genes supressores de tumor são comumente encontradas. A alteração mais bem caracterizada no câncer de mama é a superexpressão do proto-oncogene *HER-2/Neu*, que sofre amplificação em cerca de 30% dos cânceres invasivos. O produto desse gene são proteínas que atuam como receptoras de fatores de crescimento e sua superexpressão faz com que as células cancerígenas cresçam e se dividam de forma descontrolada (BURSTEIN *et al*, 2004; SOTIRIOU ; PUSZTAI, 2009).

O perfil da expressão gênica pode estratificar o câncer de mama em quatro subtipos moleculares: (1) luminal A, (2) luminal B, (3) HER-2 amplificado e (4) câncer de mama basal (KUMAR *et al*, 2013). O subtipo luminal A são tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER-2. Os tumores do subtipo luminal B exibem a expressão de RE, RP e superexpressão de HER-2. O subtipo HER-2 amplificado possui elevada expressão da oncoproteína HER-2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais RE e RP. O subtipo basal apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER-2 sendo chamados de tumores triplo-negativos (CIRQUEIRA *et al*, 2011).

O subtipo luminal A apresenta, com relação aos demais, o melhor prognóstico. Em sua maioria, são tumores histologicamente de baixo grau e apresentam resposta à quimioterapia, enquanto, tumores luminais B apresentam maior proliferação e são, muitas vezes, de alto grau histológico. O subtipo HER-2 amplificado tem menor sobrevida livre de doença e elevada taxa de recorrência, porém se beneficia de terapias alvo-específicas. O subtipo basal demonstra prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre de doença e a menor sobrevida global (CIRQUEIRA *et al*, 2011).

Ainda em relação às alterações genéticas, cerca de 10% dos tumores de mama estão relacionados a mutações hereditárias. Mulheres que carregam mutações hereditárias nos genes *BRCA-1* ou *BRCA-2* são mais propensas a desenvolver o câncer de mama. Geneticamente, esses genes são supressores tumorais e acredita-se que eles funcionam no reparo do DNA, embora seu papel na doença ainda esteja sendo elucidado (SOTIRIOU ; PUSZTAI, 2009).

Os cânceres de mama também são classificados conforme sua penetração ou não na membrana basal limitante. Aqueles que permanecem dentro desse limite são chamados de carcinoma *in situ* aqueles que se espalham para além dele são designados carcinoma invasivo. Nesta classificação, as principais formas de carcinoma da mama são os não invasivos (carcinoma ductal *in situ*, CDIS, e carcinoma lobular *in situ*, CLIS) e os invasivos (carcinoma ductal invasivo, CDI, carcinoma lobular invasivo, CLI, carcinoma medular, carcinoma colóide, carcinoma tubular, etc) (SIMPSON *et al*, 2003; BURSTEIN *et al*, 2004).

O fibroadenoma é de longe a neoplasia benigna mais comum da mama feminina e que comumente acometem mulheres jovens. É um tumor bifásico composto de estroma fibroblástico e glândulas revestidas por epitélio, porém, apenas as células do estroma são

verdadeiramente neoplásicas. Essa lesão se caracteriza pela proliferação dos componentes epiteliais e estromais da unidade terminal dos dutos mamários. A proliferação dos componentes estromais é considerado o evento principal, seguido de uma segunda proliferação das células epiteliais. A maioria dos fibroadenomas são considerados como resultado de um processo de hiperplasia envolvendo o tecido conjuntivo e as unidades lobulares. O desenvolvimento da lesão é heterogêneo, pois, ela pode evoluir, regredir ou permanecer estável dependendo da mudança do ambiente hormonal da paciente. Com o envelhecimento o estroma apresenta menor população celular e aumenta seu estado hialino. A ocorrência em mulheres jovens e sua regressão com o aumento da idade sugere uma dependência hormonal do fibroadenoma (SANTEN ; MANSEL, 2005; SAPINO *et al*, 2006; GALLEGOS *et al*, 2012).

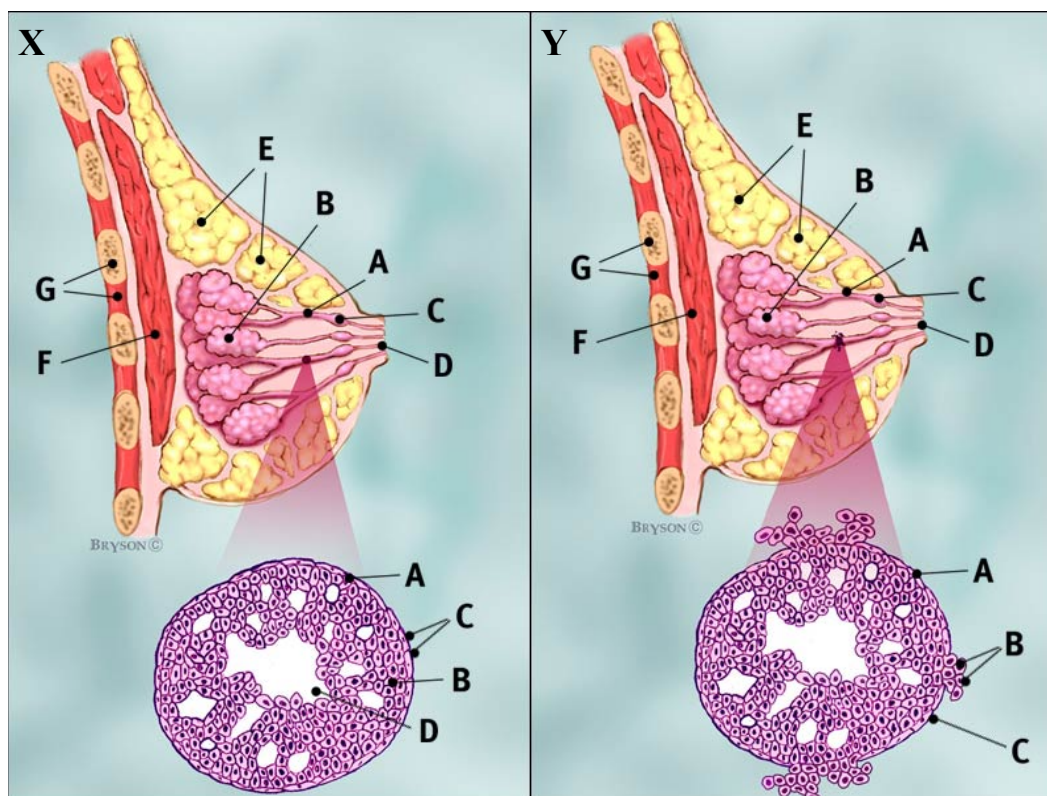
Estudos morfológicos de CDIS e CLIS mostram que essas lesões surgem normalmente a partir de células na unidade lobular do duto terminal. O CDIS tende a preencher e distorcer os espaços semelhantes a dutos, por outro lado, o CLIS geralmente se expande, mas não altera os ácinos dos lóbulos. Ambos são restritos por uma membrana basal e não invadem o estroma ou os canais linfovaskulares (SIMPSON *et al*, 2003; BURSTEIN *et al*, 2004).

O carcinoma ductal *in situ* é o tipo mais comum de câncer de mama não-invasivo. Ductal significa que o câncer começa dentro dos dutos que transportam leite, carcinoma refere-se a qualquer câncer que começa em tecido epitelial ou outros tecidos (incluindo tecido mamário) e *in situ* significa “em seu lugar original”. O CDIS é chamado “não-invasivo” porque que não se espalhou para além do duto em qualquer tecido circundante normal do peito. O CDIS não é fatal, mas pode aumentar o risco de desenvolver um câncer de mama invasivo (BREASTCANCER.ORG, 2015; EHEMAN *et al*, 2009; BURSTEIN *et al*, 2004). A Figura 4 ilustra de forma esquemática a histologia do CDIS.

O CDIS tem uma grande variedade de aparências histológicas, podendo apresentar necrose em qualquer um dos tipos. A aparência nuclear tende a ser uniforme em determinado caso e varia desde um grau nuclear baixo ao grau nuclear alto. Calcificações são frequentemente associadas ao CDIS, originando-se como detritos necróticos calcificados ou material de secreção calcificado. A proporção dos cânceres da mama que são diagnosticados no estágio CDIS é de aproximadamente 5% em populações não examinadas, mas esse número

é muito maior nas populações que passam por triagem, em grande parte devido à capacidade da mamografia de detectar calcificações (BURSTEIN *et al*, 2004; JONES, 2006).

Figura 4 - Tecido mamário com carcinoma ductal *in situ* (X) e carcinoma ductal invasivo (Y) em uma secção aumentada do duto. No aumento em X: A - célula ductal normal; B - células ductais transformadas; C - membrana basal; D - lúmen. No aumento em Y: A - células ductais normais; B - células ductais transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal.



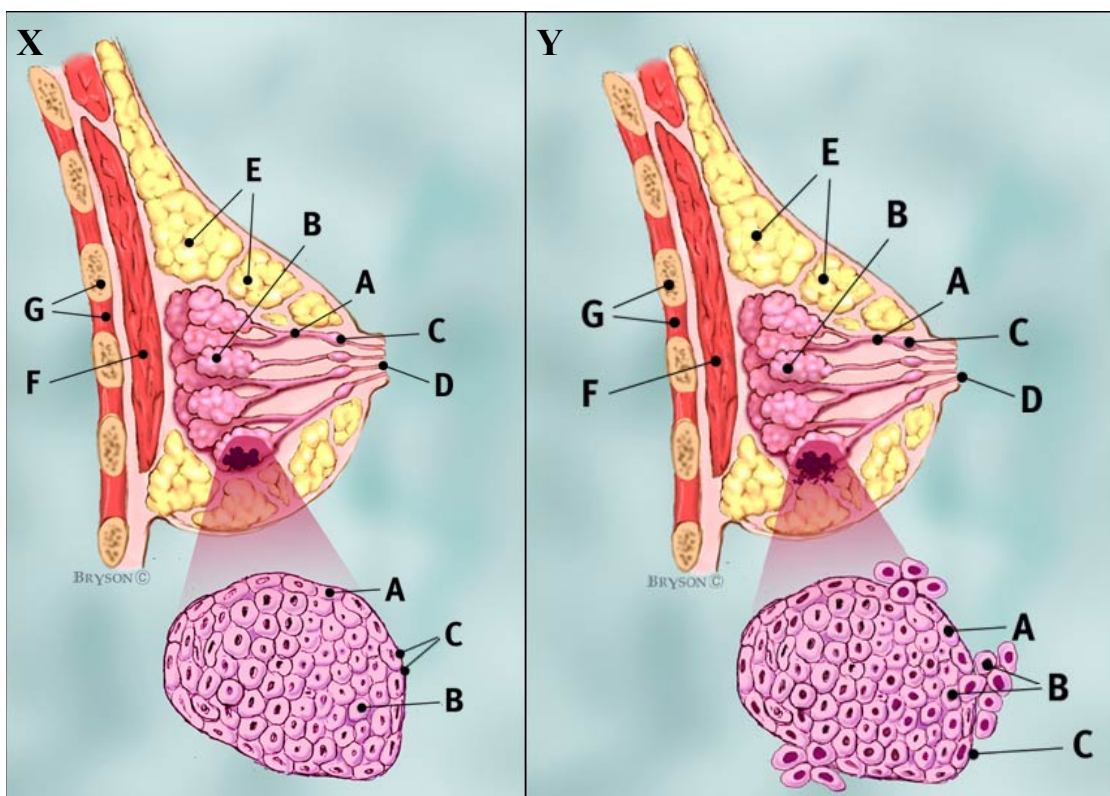
Fonte: breastcancer.org, 2015.

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) compreende uma situação de crescimento anormal das células, que mais tarde, aumenta o risco de uma pessoa desenvolver câncer de mama invasivo. Lobular significa que as células anormais começam a crescer nos lóbulos, as glândulas produtoras de leite no final dos dutos mamários. As pessoas diagnosticadas com CLIS tendem a ter mais de um lóbulo afetado (BREASTCANCER.ORG, 2015; EHEMAN *et al*, 2009). A Figura 5 ilustra de forma esquemática a histologia do CLIS.

O CLIS é uma indicação de que uma pessoa é um risco maior que a média para ter câncer de mama em algum momento no futuro. Por esta razão, alguns especialistas preferem o termo "neoplasia lobular" em vez de "carcinoma lobular". O CLIS é geralmente diagnosticado antes da menopausa, geralmente entre 40 e 50 anos de idade. O CLIS é extremamente

incomum em homens (SIMPSON *et al*, 2003; BREASTCANCER.ORG, 2015; EHEMAN *et al*, 2009).

Figura 5. Tecido mamário com carcinoma lobular *in situ* (X) e carcinoma lobular invasivo (Y) em uma secção aumentada do lóbulo. No aumento em X: A - célula lobular normal; B - células lobulares transformadas; C - membrana basal. No aumento em Y: A - célula ductais normais; B - células lobulares transformadas atravessando a membrana basal; C - membrana basal.



Fonte: breastcancer.org, 2015.

O CLIS tem aparência uniforme. As células são monomórficas, com núcleos suaves e esféricos, e ocorrem em aglomerados fracamente coesivo dentro dos lóbulos. O CLIS é quase sempre um achado incidental porque, ao contrário do CDIS, apenas raramente está associado a calcificações. Portanto, a incidência do CLIS manteve-se inalterada em populações avaliadas via mamografia. Aproximadamente 33% das mulheres com CLIS acabarão por desenvolver carcinoma invasivo que podem surgir em qualquer mama. Em sua maioria, são carcinomas lobulares invasivos, no entanto, carcinomas ductais invasivos também podem surgir. Assim, o CLIS é tanto um marcador do aumento de risco do carcinoma em ambas as mamas quanto um precursor direto de alguns cânceres. O tratamento atual envolve a

quimioprevenção junto com uma avaliação e acompanhamento clínico e radiológico ou, menos comumente, a mastectomia profilática bilateral (SIMPSON *et al*, 2003).

O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal invasivo (CDI). Ao longo do tempo, o carcinoma ductal invasivo pode se espalhar para os nódulos linfáticos e, possivelmente, de outras áreas do corpo (BATEMAN, 2007). Embora o carcinoma ductal invasivo pode afetar mulheres em qualquer idade, é mais comum em mulheres com mais idade. De acordo com a American Cancer Society, cerca de dois terços das mulheres que possuem 55 anos ou mais são diagnosticados com um câncer de mama invasivo (BREASTCANCER.ORG, 2015). A Figura 4 ilustra de forma esquemática a histologia do CDI.

O CDI normalmente está associado ao CDIS e, raramente, ao CLIS (EHEMAN *et al*, 2009). Muitos carcinomas ductais invasivos produzem uma resposta desmoplásica que substitui a gordura da mama normal e forma uma massa dura e palpável. O aspecto microscópico é bastante heterogêneo, variando de tumores com formação de túbulos bem desenvolvida e núcleos de baixo grau, a tumores constituídos por lâminas de células anaplásicas; as margens do tumor são geralmente irregulares. A invasão dos espaços vasculares também pode ser observada. Cerca de 66% expressam receptores de estrogênio ou progesterona, e cerca de 33% superexpressam HER-2/NEU. O CDI está associado a uma elevada taxa de mortalidade devido à invasão aos tecidos adjacentes, aos linfonodos e também devido a metástase (KUMAR *et al*, 2013). Essa lesão apresenta um prognóstico relativamente ruim, com uma expectativa de 10 anos em 35-50% dos casos (EHEMAN *et al*, 2009; BOMBONATI ; SGROI, 2011). Nos últimos anos, o estudo do carcinoma ductal *in situ* associado com o carcinoma invasivo tem contribuído para entender os mecanismos que envolvem a progressão tumoral do CDIS para o CDI (DOS SANTOS *et al*, 2012).

O Carcinoma lobular invasivo (CLI), às vezes chamado de carcinoma lobular infiltrado, é o segundo tipo de câncer de mama mais comum após carcinoma ductal invasivo. O termo "carcinoma lobular invasivo" refere-se ao câncer que ultrapassa a parede do lóbulo e começa a invadir os tecidos da mama. Por ser invasivo, o carcinoma lobular invasivo também pode se espalhar para os nódulos linfáticos e, possivelmente, de outras áreas do corpo. De acordo com a American Cancer Society, a cada ano mais de 180.000 mulheres nos Estados Unidos descobrem que têm câncer de mama invasivo. Cerca de 10% de todos os cânceres de mama

invasivos são carcinomas lobular invasivos. Assim como o CDI, o carcinoma lobular invasivo é mais comum em mulheres com mais idade e tende a ocorrer mais tarde na vida do que o carcinoma ductal invasivo, no início dos 60 anos em oposição do meio para o final dos 50 anos. Algumas pesquisas têm sugerido que o uso de terapia de reposição hormonal durante e após a menopausa pode aumentar o risco do CLI (BREASTCANCER.ORG, 2015). A Figura 5 ilustra de forma esquemática a histologia do CLI.

2.3 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas (GEYER *et al*, 2009). Essas diferenças podem ser justificadas pela existência dos diversos subtipos moleculares do carcinoma de mama, discutidos anteriormente, que exigem terapia específica. A imunohistoquímica (IHQ), técnica utilizada na determinação do perfil de expressão proteica, têm sido utilizada para a identificação dos subtipos moleculares, confirmação do tecido de origem, distinção entre o tumor metastático do primário, entre outras características (CIRQUEIRA *et al*, 2011; ZAHA, 2014). Essas descobertas proporcionam importantes informações prognósticas e preditivas e uma melhor percepção sobre os complexos mecanismos biológicos da tumorigênese (GEYER *et al*, 2009; ZAHA, 2014).

Os fatores prognósticos são características mensuráveis observadas no momento do diagnóstico e visam a estimar a evolução clínica, a sobrevida global e o tempo livre da doença. Enquanto os fatores preditivos são características associadas à resposta esperada a uma determinada terapia. Alguns fatores podem ser ao mesmo tempo prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais e a amplificação e/ou superexpressão do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) (CIRQUEIRA *et al*, 2011). A imunohistoquímica mantém a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor, podendo ser aplicada a pequenas amostras como biópsias extraídas por agulha fina, em laboratórios clínicos ou de pesquisa, com menores custos e com um rápido tempo de execução (CHEANG *et al*, 2009).

Os problemas de diagnósticos mais importantes que ocorrem na patologia do tumor de mama são: o diagnóstico diferencial de vários tipos de lesões benignas e malignas; diferenciação entre carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, diagnóstico e diferenciação de microinvasões e confirmação da mama como o principal sítio metastático. Na ausência de técnicas biológicas moleculares avançadas, a imunohistoquímica pode ser utilizada para identificar o subtipo histológico ou fenótipo molecular e alguns destes problemas podem ser solucionados usando marcadores imunohistoquímicos (ZAHA, 2014), ilustrados na Tabela 1 abaixo.

Os marcadores imunohistoquímicos mais comuns utilizados para prognóstico e terapia do câncer de mama incluem: receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP), HER-2 (receptor para o fator de crescimento epidermal do tipo 2), Ki-67 (marcador de proliferação celular) e p53 (proteína de regulação do ciclo celular). Além desses, marcadores da angiogênese e apoptose também são utilizados (ZAHA, 2014).

Atualmente, a detecção de imunohistoquímica de RE e RP faz parte da análise de rotina do câncer de mama e, em alguns casos de carcinoma ductal *in situ* (CDIS), a presença de RE é uma indicação para a terapia com tamoxifeno (ZAHA, 2014). Existem muitos sistemas de pontuação para avaliar a expressão dos receptores hormonais e muitos estudos têm comparado a sua capacidade de prever a resposta ao tratamento e correlacionar com resultado obtido. Uma das avaliações para considerar o tumor em estado hormonalmente tratável é quando a proporção de células coradas positivas para o RE, por exemplo, é de, pelo menos, 1% (FISHER *et al*, 2005). A avaliação imunohistoquímica para RE no CDIS, sem lesões associadas invasivas tem um papel em estimar o potencial efeito positivo do tamoxifeno (YEH ; MIES, 2008).

Um dos primeiros oncogenes estudados no câncer de mama foi o *HER-2/Neu*. Ele é um marcador para sensibilidade ao herceptin¹ e resistência ao tamoxifeno. Apesar do HER-2/Neu poder ser detectado utilizando vários métodos, apenas dois são atualmente aprovados e recomendados para sua detecção: IHQ e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) (HICKS ; SCHIFFHAUER, 2011).

¹ Herceptin é um anticorpo monoclonal que se ao receptor HER-2/Neu. Seu principal uso é para tratar certos tipos de câncer de mama.

Tabela 1 - Marcadores imunohistoquímicos para diagnóstico do câncer de mama.

Marcador	Padrão de Marcação	Utilidade
Actina de músculo liso	Citoplasmática	Diferenciação mioepitelial
Calponina	Citoplasmática	Diferenciação mioepitelial
p53	Nuclear	Diferenciação mioepitelial
Miosina de músculo liso de cadeia pesada	Citoplasmática	Diferenciação mioepitelial
CD10	Membrana	Diferenciação mioepitelial
S100	Citoplasmática	Diferenciação mioepitelial
Citoqueratinas de alto peso molecular (14 e 5/6)	Citoplasmática	Para diferenciar carcinoma invasivo de proliferações benignas
Citoqueratina 8	Pericitoplasmática	Ductal carcinoma cells
Citoqueratina 8	Perinuclear	Lobular carcinoma cells
CK-7 e CK-20		Origem mamária de um carcinoma metastático
E-caderina	Membrana	Carcinomas ductais
Receptores hormonais, receptor de estrogênio e progesterona	Nuclear	Identificar subtipos; origem mamária
HER2/NEU	Membrana	Identificar subtipos
GCDFP-15 (Gross cystic disease fluid protein)	Citoplasmática	Origem mamária de um carcinoma metastático
Mamaglobina A	Citoplasmática	Origem mamária de um carcinoma metastático
Antígeno carcinoembrionário, CEAD-14	Citoplasmática	Avaliação de carcinoma mamário metastático

Fonte: Zaha, 2014.

A expressão de Ki-67, uma proteína envolvida nas etapas de síntese de RNA ribossômico, tem sido utilizado para determinar os efeitos de diferentes doses de tamoxifeno na proliferação de cancer de mama (DECENSI *et al*, 2011). Essa proteína é um marcador prognóstico e preditivo em cânceres e tem sido extensivamente estudada. Quando o nível de Ki-67 é acima de 10% - 14%, pacientes de câncer de mama são classificados como de alto risco (YERUSHALMI *et al*, 2010.).

Os marcadores BCL-2 e p53 estão envolvidos na apoptose e proliferação celular e, desempenham um papel importante na determinação do crescimento tumoral podendo ajudar a definir pacientes de alto risco com mais precisão. Em pacientes com câncer de mama, a expressão de BCL-2 está associada com a conjuntura dos receptores hormonais, já o p53 é um importante marcador de prognóstico em câncer de mama precoce. A BCL-2 pertence a uma família de proteínas reguladoras da apoptose e sua expressão nos tumores de mama está associada a um fenótipo não agressivo e de proliferação lenta. Esse efeito favorável deve-se a sua função não-apoptótica. O marcador BCL-2 pode ser usado para impedir que pacientes sejam submetidos à terapia citotóxica desnecessária e fornece informações adicionais de prognóstico (ZAHA, 2014).

Outro marcador bastante estudado nos cânceres é o p53, mas sua importância na previsão de resultados clínicos do câncer de mama é discutível. O gene *p53* codifica uma fosfoproteína que impede a propagação de células geneticamente modificadas (DAWSON *et al*, 2010). A p53 é uma proteína supressora de tumor e desempenha um papel na estabilidade genômica através do controle do ciclo celular e induzindo apoptose quando os danos celulares não podem ser reparados (ROLLAND *et al*, 2007.).

O crescimento e metástase dos tumores são dependentes da angiogênese. Esse processo envolve um equilíbrio entre fatores angiogênicos e anti-angiogênicos. A análise desses fatores no tumor ou no soro de pacientes com câncer de mama por IHQ pode melhorar o diagnóstico e prognóstico da doença. Existem muitos marcadores relacionados com a angiogênese: angiogenina, fator de crescimento de queratinócitos, fator de crescimento de fibroblastos, molécula de adesão intercelular (ICAM-1), fator de crescimento derivado de plaquetas e a família de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF). Pacientes com câncer de mama mostram níveis elevados desses fatores quando comparados a pacientes com transformações benignas. Drogas anti-angiogênicas foram recentemente aprovadas para a terapia de cânceres avançados. Essas drogas, em combinação com a quimioterapia, são capazes de melhorar a sobrevida dos pacientes com câncer (EBOS ; KERBEL, 2011).

A imunohistoquímica é, então, uma tecnologia que está sendo usada para questões de diagnóstico, estimar o prognóstico e prever a resposta dos pacientes à terapia. A melhor abordagem no uso de marcadores de imunohistoquímicos é combiná-los com o exame de lâminas padrão de hematoxilina-eosina e usar painéis de marcadores. O papel da IHQ na

detecção da expressão biomarcadores nas patologias depende de estudos que demonstrem a expressão diferencial imunohistoquímica e outros estudos que mostram boa correlação entre a expressão positiva e resposta à terapia (ZAHA, 2014).

2.4 GLICOBIOLOGIA

Por muitos anos, os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos chamaram atenção dos pesquisadores mundialmente. Os carboidratos, provavelmente por serem muito complexos e não estarem codificados no genoma, só receberam devida importância mais recentemente com a expansão do campo da glicobiologia (LI *et al*, 2008; GHAZARIAN *et al*, 2011).

Os carboidratos são, de longe, as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, e quase todos os organismos sintetizam e metabolizam os hidratos de carbono. A glicose, por exemplo, é um monossacarídeo comum que é oxidado na forma de dióxido de carbono e água, fornecendo energia para processos celulares como a síntese de proteínas, movimento e transporte. Plantas e animais agregam numerosas moléculas de glicose para formar grandes moléculas de armazenamento de energia como o amido e o glicogênio (GHAZARIAN *et al*, 2011).

Os carboidratos possuem características que promovem uma complexa heterogeneidade nos seres vivos: a habilidade dos diferentes tipos e quantidades de resíduos de carboidratos formarem ligações uns com os outros, a característica estrutural dessas moléculas, a posição e a presença ou ausência de ramificações são algumas delas. Para ilustrar a complexidade e heterogeneidade desses compostos percebe-se que quatro diferentes aminoácidos podem formar vinte e quatro diferentes tetrapeptídeos, já quatro hexoses diferentes devem produzir 35.560 tetrassacarídeos únicos. O mais interessante é que esse imenso repertório de informação biológica não está codificado no genoma (GHAZARIAN *et al*, 2011).

A maioria dos oligossacarídeos existe na forma de glicoproteínas e glicolipídeos, muitos dos quais são localizados na superfície celular (SHIMAA *et al*, 2006). A complexidade e variabilidade das estruturas dos glicanos na forma de glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) permitem que eles atuem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão (LI *et al*, 2008). Sendo assim, esses carboidratos estão envolvidos em muitas funções fisiológicas que incluem desenvolvimento embriológico normal, diferenciação, crescimento,

inibição, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação patógeno-hospedeiro, resposta imunológica, patogenicidade, metástase, entre outros (ROSENFELD *et al*, 2007; BLOMME *et al*, 2009; TANIGUCHI ; KOREKANE, 2011; GHAZARIAN *et al*, 2011).

A glicosilação é um dos mais importantes processos biológicos pós-traducional de modificações na estrutura final e função de lipídios e proteínas, sendo uma estratégia eficaz para expandir a informação biológica de biomoléculas pela adição de um novo nível de estrutura (WANG ; HUANG, 2009; REIS *et al*, 2010), ampliando assim o leque de funcionalidades delas (GABIUS *et al*, 2011). Ela se faz através de uma ligação covalente de um carboidrato a proteínas e lipídeos, usando substratos doadores de açúcar específicos (REIS *et al*, 2010).

O processo de glicosilação é regido por um grupo de 250 a 500 genes que são responsáveis por produzir enzimas dedicadas à síntese e modificação das cadeias de carboidratos (FREEZE ; AEBI, 2005; GABIUS *et al*, 2011). O genoma codifica as glicosiltransferases e as glicosidases, essas enzimas são encontradas na membrana do retículo endoplasmático (RE) e Complexo de Golgi, no citoplasma ou nas superfícies celulares e atuam na síntese de vários glicoconjugados (SEKO ; YAMASHITA, 2008). A atividade combinada da expressão dessas enzimas determina o padrão de carboidrato dos glicoconjugados nas células (CHANDRASEKARAN *et al*, 2006; GHAZARIAN *et al*, 2011) e a variação dessas estruturas está associada a modificação das suas funções fisiológicas (TURNBULL ; FIELD, 2007).

Os oligossacarídeos podem formar dois tipos de ligações glicosídicas com proteínas. O primeiro tipo, a O-glicosilação, envolve a ligação de um carboidrato O-ligado a hidroxila de uma Serina (Ser) e/ou Treonina (Thr) (GORELIK *et al*, 2002; POTAPENKO *et al*, 2010; GHAZARIAN *et al*, 2011;). O segundo tipo, denominado de N-glicosilação, envolve a ligação de oligossacarídeos N-ligados à cadeia lateral de amida da asparagina (Asn) geralmente na sequência Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina (POTAPENKO *et al*, 2010; GHAZARIAN *et al*, 2011). Em raros casos, a sequência Asn-X-Cisteína (Cys) também é usada (REIS *et al*, 2010).

A N-glicosilação proteica se desenvolve em uma série de etapas e ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. No retículo endoplasmático, um núcleo de oligossacarídeos é incorporado ao resíduo de aminoácidos específico das proteínas. Esse

oligossacarídeo é composto por três moléculas de glicose (Glc), nove manoses (Man) e duas N-acetilglicosaminas (GlcNAc), é transferido por um lipídeo transportador (FREEZE AND AEBI, 2005; REIS *et al*, 2010). Uma segunda fase do processo envolve uma reorganização dos glicanos ligados à proteína. Nessa etapa há remoção de resíduos de Glc e Man e, adição de outros sacarídeos dependendo da função que a proteína vai desempenhar. Após a transferência, o oligossacarídeo ligado à proteína cumpre funções específicas no dobramento da glicoproteína, controle de qualidade, secreção e degradação no retículo endoplasmático (FREEZE ; AEBI, 2005).

Todo o processo de remoção e adição de resíduos de carboidratos é regido pelas glicosidases e glicosiltransferases, respectivamente, isso gera um amplo espectro de estruturas N-glicanas, já que as células variam a expressão e organização deste conjunto de enzimas. Além disso, algumas enzimas competem pelo mesmo substrato em pontos de ramificação dentro dessa via. Ou seja, dependendo da abundância, afinidade ou localização, enzimas dominantes podem favorecer ou impedir a síntese de glicanos selecionados quando as proteínas se movem através do Complexo de Golgi (FREEZE ; AEBI, 2005; POTAPENKO *et al*, 2010).

No processo de O-glicosilação, a primeira etapa é a transferência de uridina difosfato-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) para os resíduos de serina ou treonina das proteínas. As enzimas que controlam esse processo pertencem a família das UDP-N-acetilgalactosaminil transferases (ppGalNAc-Ts), esse tipo de glicosilação é muito comum em glicoproteínas, principalmente, em mucinas (proteínas de alto peso molecular e bastante glicosiladas) secretadas ou ligadas à membrana (REIS *et al*, 2010).

As ppGalNAc-Ts controlam, neste caso, o primeiro nível de complexidade da glicosilação da mucina, ou seja, os locais e densidade de ocupação dos O-glicanos. O segundo nível de complexidade de O-glicosilação em mucinas destaca-se o alongamento das cadeias de carboidratos por outras glicosiltransferases. Após o primeiro resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) ser adicionado, segue a adição de uma galactose (Gal) à GalNAc. Em seguida, esses resíduos de carboidratos podem ser sializados por sialiltransferases formando antígenos com o ácido siálico (REIS *et al*, 2010).

A glicosilação do tipo O-ligada é uma modificação das glicoproteínas que é catalisada no complexo de Golgi. A modificação das proteínas com N-acetilglicosamina (O-GlcNAc)

possui um papel na modulação da atividade de proteínas através de diferentes mecanismos: (1) modificando a função da proteína através de fosforilação, (2) regulando as interações proteína-proteína, (3) regulando a transcrição e (4) regulando a localização e (5) degradação proteica (GHAZARIAN *et al*, 2011).

As células normais precisam sobrepor muitos níveis regulatórios para se transformar em células malignas metastáticas. Além de alterações genéticas, como visto anteriormente, evidências experimentais coletadas nas últimas décadas revelaram que a transformação maligna está associada a uma variedade de células com padrões de glicosilação alterados de modo que o seu perfil de carboidratos se torna diferente do que era apresentado antes da transformação neoplásica (REDDI *et al*, 2000; CHANDRASEKARAN *et al*, 2006; BLOMME *et al*, 2009; POWLESLAND *et al*, 2009; PINHO ; REIS, 2015).

Os níveis de expressão das glicosiltransferases (GTs) são alterados nas células transformadas, as mudanças nas atividades das GTs refletem no perfil de estruturas de carboidratos das células, como fica evidente na exibição específica e preferencial de certos glicoconjugados em células do câncer (GOETZ *et al*, 2009; GHAZARIAN *et al*, 2011; DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS *et al*, 2013; FERREIRA *et al*, 2013). Essas aberrações nos padrões de carboidratos são observadas tanto em glicoproteínas como também em glicolipídeos e glicosfingolipídeos (REDDI *et al*, 2000; CHANDRASEKARAN *et al*, 2006; GHAZARIAN *et al*, 2011).

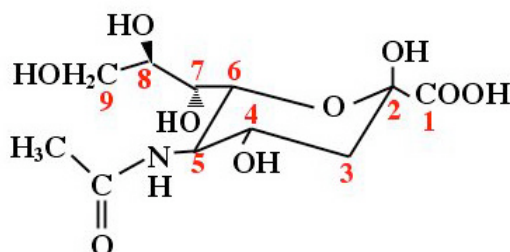
Um conhecimento da expressão de glicosiltransferases em células cancerosas pode revelar informações sobre as estruturas glicídicas que estão sendo expressas e permite a identificação e seleção de melhores alvos para a detecção imunohistoquímica e possível aplicação no diagnóstico, prognóstico e terapia.

2.5 ÁCIDOS SIÁLICOS

Um dos carboidratos bastante estudado por sua importância e papel nos processos biológicos é o ácido siálico. O termo ácido siálico é o nome dado a uma família de carboidratos que possuem uma cadeia de nove carbonos, sendo o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac, Figura 8) e o ácido N-Glicolilneuramínico (Neu5Gc) os mais comuns. Os ácidos siálicos (Sias) são encontrados, principalmente, na posição terminal de de N-glicanos, O-

glicanos, e glicosfingolípídeos (gangliosídeos), em várias classes de moléculas glicídicas secretadas ou da superfície celular (VARKI *et al*, 2009; SCHAUER, 2009).

Figura 6. Estrutura do ácido siálico Neu5Ac



Fonte: Varki *et al*, 2009.

Geralmente, os resíduos de Sias estão ligados à um resíduo mais interno de galactose (Gal) via ligações α -2,6 ou α -2,3; e também ligados a galactosamina ou N-acetilgalactosamina (GalNAc) pela ligação α -2,6. Além disso, ácidos siálicos também podem ser ligados via α -2,8 a outros resíduos de Sias (LU ; GU, 2015).

Devido as suas características e localização, esses carboidratos modulam a conformação e estabilização de moléculas e membranas, interações com o ambiente, bem como processos normais, incluindo a sinalização transmembrana, fertilização, crescimento, diferenciação e apoptose (HUANG *et al*, 2009; BAYER *et al*, 2013; LU ; GU, 2015).

A alta expressão de ácidos siálicos em membranas celulares externas (mais de 10 milhões de moléculas por eritrócitos em humanos), no interior das membranas dos lisossomos e em glicoproteínas secretadas (como proteínas do sangue e mucinas), por exemplo, sugere que eles têm funções na estabilização de moléculas e das membranas, bem como na modulação de interações com o meio ambiente (VARKI *et al*, 2009).

Algumas funções surgem a partir da carga eletronegativa relativamente forte dos ácidos siálicos; por exemplo, ligação e transporte de íons e drogas, estabilização da conformação de proteínas, incluindo enzimas, e aumento da viscosidade das mucinas. Sias também podem proteger as células e moléculas de ataque por proteases ou glicosídeses, estendendo sua vida útil e a função (VARKI *et al*, 2009).

Outra função importante dos ácidos siálicos é contrastante; eles agem como protetores da superfície celular ou como sítios de reconhecimento. No primeiro caso, eles mascaram sítios antigênicos, receptores e resíduos de galactose (Gal). Após a perda do Sia, moléculas e

células podem ser reconhecidas, por exemplo, por macrófagos e hepatócitos, via receptores Gal e podem ser degradadas. Por outro lado, ácidos siálicos podem servir como ligantes para uma variedade de lectinas² microbianas ou animais (VARKI *et al*, 2009).

Uma modificação química de Sias pode influenciar todas essas propriedades, em particular, as funções de ligante específico. Por exemplo, uma O-acetilação no carbono 9 ou N-acetil-hidroxilação do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) pode criar novas funções do receptor ou diminuir a afinidade de ligação. Vários exemplos de regulação em relação aos ácidos siálicos têm sido relatados em animais vivos. A regulação na expressão de Neu5Gc (ácido N-Glicolilneuramínico) e a O-acetilação de Sias na mucosa do intestino pode ocorrer em resposta a colonização microbiana, por exemplo, sugerindo um papel desses glicídios na protecção contra certos microorganismos. O tipo e as ligações de ácidos siálicos no endotélio, proteínas do plasma e eritrócitos também podem sofrer significativas mudanças em resposta a estímulos inflamatórios (VARKI *et al*, 2009).

Mudanças nos Sias também foram encontradas e parecem estar envolvidas em doenças degenerativas, como arteriosclerose e diabetes, bem como doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e alcoolismo. Para exercerem suas funções fisiológicas na imunidade inata e como lubrificantes as mucinas têm que ser devidamente e altamente sialiladas. Os ácidos siálicos também estão envolvidos no processo de rolamento e extravasamento de leucócitos durante a inflamação; as selectinas (proteínas responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular) reconhecem glicanos Sialil Lewis X que geralmente contêm um terminal de ácido siálico (VARKI *et al*, 2009).

Diversas doenças genéticas humanas dos Sias são conhecidas: por exemplo, miopatia hereditária por corpo de inclusão (doenças musculares progressivamente debilitantes), sialuria (condição de aumento da concentração de ácido siálico na urina), doença de Salla³ e galactosialidosis (deficiência de galactosidase-peptidase-sialidase). Muitos dos transtornos congênitos de glicosilação também podem levar a uma sialilação alterada, mas, pouco é sabido sobre a base molecular das consequências fenotípicas (VARKI *et al*, 2009; CUI *et al*, 2011).

² Lectinas são definidas como proteínas, de origem não imunológica, que preferencialmente reconhecem e ligam a complexos de carboidratos. Elas serão discutidas em um tópico mais adiante.

³ Transtorno neurodegenerativo autossômico recessivo causado por defeitos de transporte na membrana lisossômica, que resulta no acúmulo de ácido siálico livre (Neu5Ac) dentro dos lisossomos.

A biossíntese dos ácidos siálicos pode agir como um sistema de codificação, uma vez que eles são capazes de interagir com alta especificidade e seletividade com proteínas que interagem com carboidratos, incluindo, lectinas, anticorpos, enzimas e receptores. Como visto, essas moléculas estão envolvidas na comunicação celular, tais como interações célula-célula, célula-matriz e reconhecimento molecular. A transferência de ácidos siálicos para glicoconjugados é catalisada por uma família de sialiltransferases (STs), cada uma atuando em ligações específicas. Várias STs exibem preferências distintas para glicolípideos, glicoproteínas ou poli/oligossacarídeos, além de preferência em relação a estrutura do glicano aceptor, a natureza do monossacarídeo terminal aceptor, ou o tipo de ligação formada (WANG, 2005; LU ; GU, 2015).

As sialiltransferases (STs) podem ser classificados em quatro famílias de acordo com a ligação de carboidratos elas sintetizam. Todas as enzimas da família ST3Gal transferem resíduos de Neu5Ac para resíduos terminal de galactose (Gal) encontrados em glicoproteínas ou glicolípídios por ligações $\alpha 2,3$. As enzimas da família ST6Gal usam N-acetilglicosamina (GlcNAc) como substrato aceitador. As enzimas da família ST6GalNAc catalisam a transferência de resíduos de Neu5Ac por ligações $\alpha 2,6$ para resíduos de N-acetilgalactosaminas (GalNAc) encontrados em glicosilproteínas ou glicolípideos. Já as enzimas da família ST8Sia mediam a transferência de resíduos de Neu5Ac por ligações $\alpha 2,8$ a outros resíduos de Neu5Ac (WANG, 2005).

Todas as STs dos vertebrados possuem uma arquitetura semelhante. Elas são glicoproteínas transmembrana que residem predominantemente no compartimento trans-Golgi (HARDUIN-LEPERS *et al*, 2005). Elas têm uma pequena cauda citoplasmática de N-terminal, um único domínio transmembrana e uma região principal com um comprimento variável de 20 a 200 aminoácidos, seguido por um grande domínio catalítico C-terminal (WANG, 2005).

Um perfil alterado de sialilação tem sido associado com a malignidade no câncer podendo mediar eventos fisiopatológicos importantes durante várias fases de progressão do câncer, incluindo a invasão e metástase. A maioria das mudanças no padrão de glicosilação, que ocorre durante a oncogênese, está associada ao aumento de sialilação de glicoconjugados na forma de sialilconjugados (CAZET *et al*, 2010). A Expressão elevada de ácidos siálicos

tem sido relacionada na proteção das células cancerosas do reconhecimento e erradicação pelo sistema imunológico (LU ; GU, 2015).

Além da acumulação de Neu5Gc, várias outras alterações específicas nos Sias ocorrem em decorrência da malignidade. Em geral, níveis anormalmente elevados de carboidratos sialilados são frequentemente descritos na superfície das células cancerosas e/ou secretados em fluidos biológicos e também, são observadas modificações nas ligações, com ligações α 2-6 tornando-se particularmente proeminentes. Está bem estabelecido que essa expressão excessiva deve resultar da desregulação da atividades das sialiltransferases envolvidas na sua biossíntese, embora, os mecanismos precisos pelos quais essas mudanças nos Sias realçam tumorigênese e/ou comportamento invasivo permanecem incertos (HARDUIN-LEPERS *et al*, 2011).

O aumento da sialilação também pode intensificar o efeito de mascaramento dos ácidos siálicos em sítos antigênicos de células tumorais, tornando-as mais *self-like* e, portanto, mais invasivas. Independentemente dos mecanismos envolvidos, certas moléculas sialiladas são marcadores específicos para alguns tipos de câncer e potenciais alvos para terapias (VARKI *et al*, 2009).

Com base nesses diversos papéis fisiopatológicos dos ácidos siálicos, muitos esforços foram empreendidos para criar agentes farmacologicamente ativos adequados. Os mais conhecidos são os inibidores competitivos de sialidases. Embora os inibidores de sialiltransferases tenham uma potencial utilidade no câncer, agentes eficientes ainda não estão disponíveis (VARKI *et al*, 2009).

De fato, a inibição de sialiltransferases ou gene alvo de sialiltransferases tais como β -galactosidase α -2,6-sialiltransferase (ST6Gal-I), revelou que sialilação de glicoproteínas ou glicoesfingolipídeos é muito importante no desenvolvimento de tumor, desenvolvimento e reparação neuronal, processos imunológicos e regulação da sensibilidade à hormônios (FERREIRA *et al*, 2013).

O estudo das mudanças na estrutura de oligossacarídeos na superfície celular, promovido pela sialyltransferases, tem sido frequentemente associado ao câncer humano. Isto é importante porque eles podem estar relacionados com um estágio específico da doença e sua detecção com lectinas ou anticorpos podem fornecer informações úteis para o diagnóstico ou prognóstico ou ambos, e, em muitos casos, contribuem diretamente para a biologia do câncer.

Todas as enzimas da família ST3Gal, por exemplo, transferem resíduos de Neu5Ac por ligações $\alpha 2,3$ - aos terminais de galactose (Gal) encontrados em glicoproteínas ou glicolipídios. Na família ST3Gal, as subfamílias ST3Gal-I e ST3Gal-II usam exclusivamente a estrutura oligossacarídea do tipo Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc-R (WANG, 2005; PICCO *et al*, 2010).

Mudanças no processo de glicosilação são comuns na malignidade e, como quase todas as proteínas de superfície são glicosiladas, isto pode afetar drasticamente o comportamento das células tumorais. Em carcinomas de mama, os glicanos O-ligados são frequentemente truncados como resultado de uma sialilação prematura. O aumento da expressão de ST3Gal-I também é observado nessa doença e isto está correlacionado com um maior grau tumoral. Em estudos com cobaias, a superexpressão de ST3Gal-I resultou em uma redução significativa na latência do tumor, indicando que a ST3Gal-I está atuando como um promotor de tumor neste modelo de câncer de mama (PICCO *et al*, 2010).

2.6 LECTINAS

Lectinas são definidas como (glico)proteínas, de origem não imunológica, que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos livres e complexos em glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídios) (MELO-JUNIOR *et al*, 2011; LEAL *et al*, 2012). Inicialmente encontradas e descritas em plantas, as lectinas, nos anos seguintes, foram isoladas de microorganismos e também de animais. Durante os últimos anos, muitas estruturas primárias e tridimensionais de lectinas foram elucidadas e observou-se que lectinas de diversas fontes não possuíam similaridade em suas sequências primárias, mas compartilhavam semelhanças em suas estruturas terciárias (SHARON ; LIS, 2004).

Estudos realizados em animais sugeriram que a atividade de ligação proteína-carboidrato das lectinas está relacionada com resíduos de aminoácidos específicos, designados como domínio de reconhecimento do carboidrato (DRC). Esses domínios reconhecem normalmente o terminal não-reduzido dos resíduos de carboidratos das glicoproteínas e glicolipídeos da membrana celular. Os DRC podem discriminar entre isômeros ópticos em função das suas especificidades. Por exemplo, a lectina Concanavalina A (Con A) especificamente se liga a um isômero α - de glicose e manose, mas não o isômero β - desses carboidratos (GHAZARIAN *et al*, 2011).

Lectinas endógenas estão envolvidas em uma enorme variedade de processos biológicos, conforme indicado por um crescente volume de dados que lhes dizem respeito. Lectinas endógenas mediam processos biológicos, tais como reconhecimento célula-célula, interações célula-matriz, fertilização do gameta, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interações patógeno-hospedeiro, dobramento glicoproteico, indução mitogênica e homeostase (GHAZARIAN *et al*, 2011).

Por sua importância como ferramenta na detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados e também na análise de superfícies celulares com o objetivo de estudar as mudanças que ocorrem na expressão dos carboidratos, durante a embriogênese, crescimento e doença, as lectinas tem sido muito estudadas nas últimas décadas (MADERA *et al*, 2005; MONZO *et al*, 2007; SADIK ; YAN, 2007; SOBRAL *et al*, 2010; MELO-JUNIOR *et al*, 2011; LEAL *et al*, 2012).

Estima-se que mais de 50% de todas as proteínas humanas são glicosiladas. A glicosilação é encontrada nas superfícies celulares e na matriz extracelular criando um ponto de contato e de interações celulares (LI *et al*, 2008; ADAMCZYK *et al*, 2012). É comum as células transformadas apresentarem um padrão de glicosilação alterado em comparação com células normais. Ele se manifesta de diferentes formas, que inclui a perda de expressão ou a superexpressão de algumas estruturas, o acúmulo de precursores e o aparecimento de novas estruturas (LU ; GU, 2015). Com o número de mortes aumentando devido ao câncer, há uma necessidade de marcadores clínicos que visem à detecção precoce da doença, evitando assim a progressão e a metástase (CHANDRASEKARAN *et al*, 2006; ADAMCZYK *et al*, 2012).

Os biomarcadores podem determinar o risco de desenvolver uma certa doença, servindo como ferramentas para o diagnóstico inicial e determinação do estágio da doença, bem como monitorar sua progressão e o efeito do tratamento. O reconhecimento dos glicanos como mediadores de processos biológicos importantes estimulou o interesse crescente na pesquisa em glicobiologia (ADAMCZYK, 2012). É bem estabelecido que a glicosilação alterada contribui desde estágios iniciais de invasão a metástase (Reis *et al*, 2010). Estudos recentes relatam a integração do estudo da estrutura glicídica com aplicação clínica, eles podem servir de alvos terapêuticos e servir como biomarcadores (CHANDRASEKARAN *et al*, 2006).

Entender e detectar as mudanças no perfil de glicosilação no contexto da carcinogênese é de fundamental importância (WANG ; HUANG, 2009). A utilização de lectinas é, então, uma importante ferramenta para detectar mudanças no padrão de glicosilação na superfície das células transformadas que exibem uma modificação na atividade das glicosiltransferases. Assim, é possível avaliar o fenótipo glicídico e extrair informações sobre suscetibilidade a tratamentos e identificar marcadores para detecção do câncer (CHANDRASEKARAN *et al*, 2006).

A *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA), é uma lectina que reconhece resíduos de ácidos siálicos α 2,3-ligados. Os primeiros estudos com a MAA foram feitos por Wang ; Cummings (1988) que observaram seu potencial leucoaglutinante e sua ligação carboidrato específica. A presença de ácidos siálicos α 2,3-ligados, detectados pela MAA em células cancerígenas, se mostrou relacionada a um comportamento invasivo e metastático de alguns tumores e à progressão tumoral (TANG *et al*, 2003; WANG *et al*, 2009; JUN *et al*, 2012).

A incidência do câncer tem aumentado devido à crescente exposição da população a fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida. O impacto se torna ainda maior nos países em desenvolvimento, como o Brasil, que juntos detêm cerca de 2/3 da população mundial com câncer. O Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) tem avaliado o perfil alterado de carboidratos e a modificação da expressão de glicosiltransferases em lesões benignas, pré-malignas e malignas de mama. A identificação de potenciais biomarcadores glicídios envolvidos na carcinogênese mamária podem auxiliar no diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de sialiltransferase e o padrão de sialilação em tecidos mamários humanos transformados benigna e malignamente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a localização intracelular das ST3Gal-I no carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular e fibroadenoma correlacionando com alterações funcionais;
- Avaliar o perfil de ácido siálico através de histoquímica com lectinas usando *Maackia amurensis agglutinin II* (MAA), no carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular e fibroadenoma;
- Correlacionar a imunopositividade para ST3Gal-I e perfil de ácido siálico com os marcadores de rotina no diagnóstico (receptores de estrógeno e progesterona, HER-2) e com as características clínico-histopatológicas das pacientes.

4 AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS SIÁLICOS E SIALILTRANSFERASES EM TECIDOS MAMÁRIOS

EVALUATION OF SIALIC ACIDS AND SIALYLTRANSFERASES IN BREAST TISSUES

Tiago Barros Santos Malta¹, Arthur Tenorio Ribeiro Clark¹, Cintia Renata Costa Rocha^{1,2},
Andressa Duarte³, Monyk Karol Braga Gontijo³, Alfredo Ribeiro da Silva³, Eduardo Isidoro
Carneiro Beltrão^{1,2*}

1. Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife - Pernambuco, Brazil.
2. Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) - Departamento de Bioquímica - Centro de Biociências (CBC), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife - Pernambuco, Brazil.
3. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.

*Corresponding author; E.I.C. Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Cidade Universitária – Recife – PE – Brasil. 50670-901. E-mail: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

The female breast cancer is the second most common type of cancer in the world, with increased incidence of 22% every year. Recent studies in recent decades have revealed that the malignant transformation is associated with a variety of cells with altered glycosylation patterns such as sialylation. Sialic acids have been demonstrated to participate in cancer initiation and progression, thus has potential implications for cancer prevention, diagnosis and treatment. This study evaluated the phenotype expression of ST3Gal-I using immunohistochemistry and the sialic acid residues profile by histochemistry with *Maackia amurensis agglutinin II* (MAA) in mammary tissues diagnosed as fibroadenoma (n=59), ductal carcinoma *in situ* (DCIS, n=40), invasive ductal carcinoma (IDC, n=50) and lobular carcinoma (LC, n=42). All types of breast lesions showed high ST3Gal-I immunopositivity, its expression was observed in 93.2% cases of Fibroadenoma, 92.5% of DCIS, 96% of IDC and 85.2% cases of LC. The cells ST3Gal-I staining pattern was mainly cytoplasmatic and perinuclear. The MAA staining in breast lesions showed a diffuse cytoplasmatic and membrane pattern with different distribution of α 2,3-linked sialic acids among the lesions studied, fibroadenoma cases showed the lowest percentage among the analyzed lesions (47.5%) while IDC showed the highest (98%). Although this study did not show a significant difference in expression of ST3Gal-I among all lesions, representative alterations in sialic acid content between fibroadenoma and malignant lesions ($p<0.0001$), and also between DCIS and IDC ($p=0.037$) were observed. No significant correlations were found between the expressions of ST3Gal-I and MAA, routine markers and clinical-histopathological characteristics of the patients. Results indicate different distribution of α 2,3-linked sialic acids on the cells of the studied lesions which seems to be involved in breast cancer progression and/or maintenance.

Keywords: Sialic acid. Sialyltransferases. Breast cancer. α 2,3-sialyltransferases. Lectins. Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Cancer is a multifactorial disease related to DNA mutations leading cells to acquire growth disordered characteristic that invade tissues and organs [1, 2]. More than 8.2 million people died of cancer in the world in 2013 [2], being the breast cancer responsible for about 600,000 deaths. Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and 70% of breast cancer deaths occur in women from low-income and middle-income countries [3]. Brazilian National Cancer Institute (INCA) estimates 596,000 new cases of cancer in 2016/2017. Breast cancer will be the second most common cancer among women with 57,960 new cases, just behind non-melanoma skin cancer [4].

Cancer is understood not only as a highly heterogenous pathology with respect to cell type and tissue origin but also as a disease involving loss of control of multiple pathways governing fundamental cell processes such as death, proliferation, differentiation and migration [5]. The process of development from a single cell with an oncogenic profile to a metastatic cancer is exceedingly complex and multivariied; however, there are several key processes common to most cancers, including excessive proliferation, resistance to apoptosis, angiogenesis and metastasis [1, 6].

Until not long ago, nucleic acids, proteins and lipids were in the middle of all attention of researchers worldwide. And since carbohydrates are too complex and not encoded in the genome, they just gotten importance with the establishment and great expansion of glycobiology [7, 8]. In this scenario glycosylation pathways and changes in glycode became to be investigated regarding functional and structural features of glycoconjugates in many diseases as cancer [8, 9, 10]. This process is conducted by several glycosyltransferases and is one of the most versatile and abundant co- and post-translational modifications of proteins and lipids [11].

Most of malignant cells present alterations in their glycosylation patterns. According to Ghazarian et al. [7], alterations in glycosylation are often the result of altered activities of their respective enzymes [12, 13]. Carbohydrates in cell surface molecules, such as in glycoconjugates, play important roles in neoplastic cells altering components in many different cancers, and it is known to be correlated with proliferation, invasiveness and metastasis [14,15].

Changes in glycosylation pattern that occurs during oncogenesis is associated with increased sialylation of glycoconjugates in the end-forming sialylconjugates [16, 17, 18], frequently described at the surface of cancer cells and/or secreted in biological fluids [19]. An aberrant sialylation can mediate pathophysiological key events during various stages of tumor progression, including the invasion and metastasis [7, 20, 21]. And terminal position carbohydrates, such as sialic acids residues, in saccharide moieties in glycoconjugates, inserted by sialyltransferases are known to play key roles in cell-cell communication, cell-matrix interaction, adhesion and protein targeting, for example [7, 16, 20, 22, 23].

Due to their structure and location in cell sialic acids modulate the conformation and stabilization of molecules and membranes, interactions with the environment, as well as processes of transmembrane signalling, fertilization, growth, differentiation and apoptosis [22-28].

The increasing number of deaths due to cancer there is a need for clinical markers for the early detection of the disease avoiding its progression and metastasis, as well as monitoring the effect of a treatment [29, 30]. The recognition of glycans as mediators of important biological processes has stimulated the growing interest in its research as clinical biomarkers [30].

This work aimed to evaluate the phenotype expression of sialyltransferase ST3Gal-I by immunohistochemistry and the sialic acid profile using lectin histochemistry with *Maackia amurensis agglutinin II* (MAA) in breast cancer lesions (fibroadenoma, ductal carcinoma *in situ*, DCIS, invasive ductal carcinoma, IDC, and lobular carcinoma, LC) regarding their potential as biomarkers for diagnosis/prognosis and target molecules in therapy.

MATERIALS AND METHODS

Tissue microarray (TMA): twelve tissue microarrays (TMA) were constructed with a total of 59 cases of fibroadenoma, 40 of DCIS, 50 of IDC and 42 cases of LC. All samples were core biopsies (5-mm diameter) punched from the selected regions of each donor paraffin blocks and arrayed into the TMA receptor block. One section (4µm) of each TMA was stained with hematoxylin and eosin to confirm the presence of the tumor by optical microscopy. All breast samples were obtained from the Tissue Archives of Department of Pathology - Ribeirão Preto Medical School (USP) from the State of São Paulo, after Ethical Committee approval (CAAE: 06586612.9.0000.5208)

Immunohistochemistry: protocols were developed according to Do Nascimento *et al* [31]. Tissue slices (4µm) were deparaffinized in xylene and hydrated with decreasing ethanol concentrations. Antigen retrieval was performed with a 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) in steamer for 30 min followed by endogenous peroxidase blocking (Hydrogen Peroxide Block from Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System - Spring Bioscience, USA) and nonspecific blocking with Protein Block Solution (Available on Detection System - Spring Bioscience, USA), for 1 hour at 25°C. Slices were incubated with rabbit polyclonal antibody anti-ST3Gal-I (1:20, Sigma-Aldrich, USA) overnight at 4°C. After washing with 100 mM phosphate buffer solution, pH 7.2 supplemented with 150mM NaCl, sections were incubated with secondary antibody (Complement, from Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, USA) for 45 minutes at 25°C. Then, samples were incubated with a tertiary antibody conjugated to HRP (HRP Conjugate - Polyvalent HRP-DAB Detection System - Spring Bioscience, USA) for 45 min at 25°C. Finally peroxidase reaction was revealed with 3,3'- Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ and counterstained with hematoxylin. All washes (2x5 minutes) between each step were performed with PBS. Negative controls were obtained by replacing primary antibodies with blocking solution. Normal gall bladder samples were used as positive control for ST3Gal-I.

Lectin histochemistry: protocols were carried out according to Ferreira *et al* [21]. TMA sections (4 µm) were deparaffinized in xylene and rehydrated with decreasing ethanol

concentrations. Slides were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for 2 minutes afterwards samples were incubated in 0.3% H₂O₂ in methanol solution for 15 min at 25°C. Tissues slices were incubated with biotin-conjugated MAA (20 µg/mL) for 2 hours at 4°C. After that, sections were incubated with horseradish peroxidase-conjugated Streptavidin Polymer (Sigma-Aldrich, USA) for 45 min at 25°C. The reaction was revealed with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-H₂O₂ and counterstained with hematoxylin. Negative controls were performed replacing lectin with PBS in protocols.

Image and Statistical Analysis: for image acquisition, a video camera system coupled to an Eclipse 50i microscope (Nikon, Melville, NY, USA) was used and the results were analyzed by nonparametric tests (Chi-square test or Fisher's exact test) with a significance level of 95% (p<0.05) using GraphPad Software (San Diego, USA). Tissue staining was classified as positive or negative based on the percentage of stained cells according to Dornelas *et al* [32]. For statistical analysis, samples were dichotomized in positive and negative groups, considering negative: non-staining and weak staining in 1/3 stained cells; positive: moderate staining for 2/3 stained cells and intense for >2/3 stained cells. Staining classification was according Dos Santos *et al* [33]. Relation between ST3Gal-I, MAA, routine laboratory markers and clinicopathologic features, such as ER, PR, HER-2, tumor size, pathologic stage, age, menstrual status, lymph node status, tumor grade, death and metastasis, were also analyzed by Fisher exact test (two variables) or Chi-square tests (three or more variables). These informations were retrieved from clinical and pathological records from Department of Pathology - Ribeirão Preto Medical School (USP).

RESULTS AND DISCUSSION

All types of breast lesions showed high ST3Gal-I immunopositivity: 93.2% of fibroadenoma, 92.5% of DCIS, 96% of IDC and 85.2% of LC (Figure 1). No significant differences in ST3Gal-I immunostaining were observed between the breast lesions studied (Figure 2).

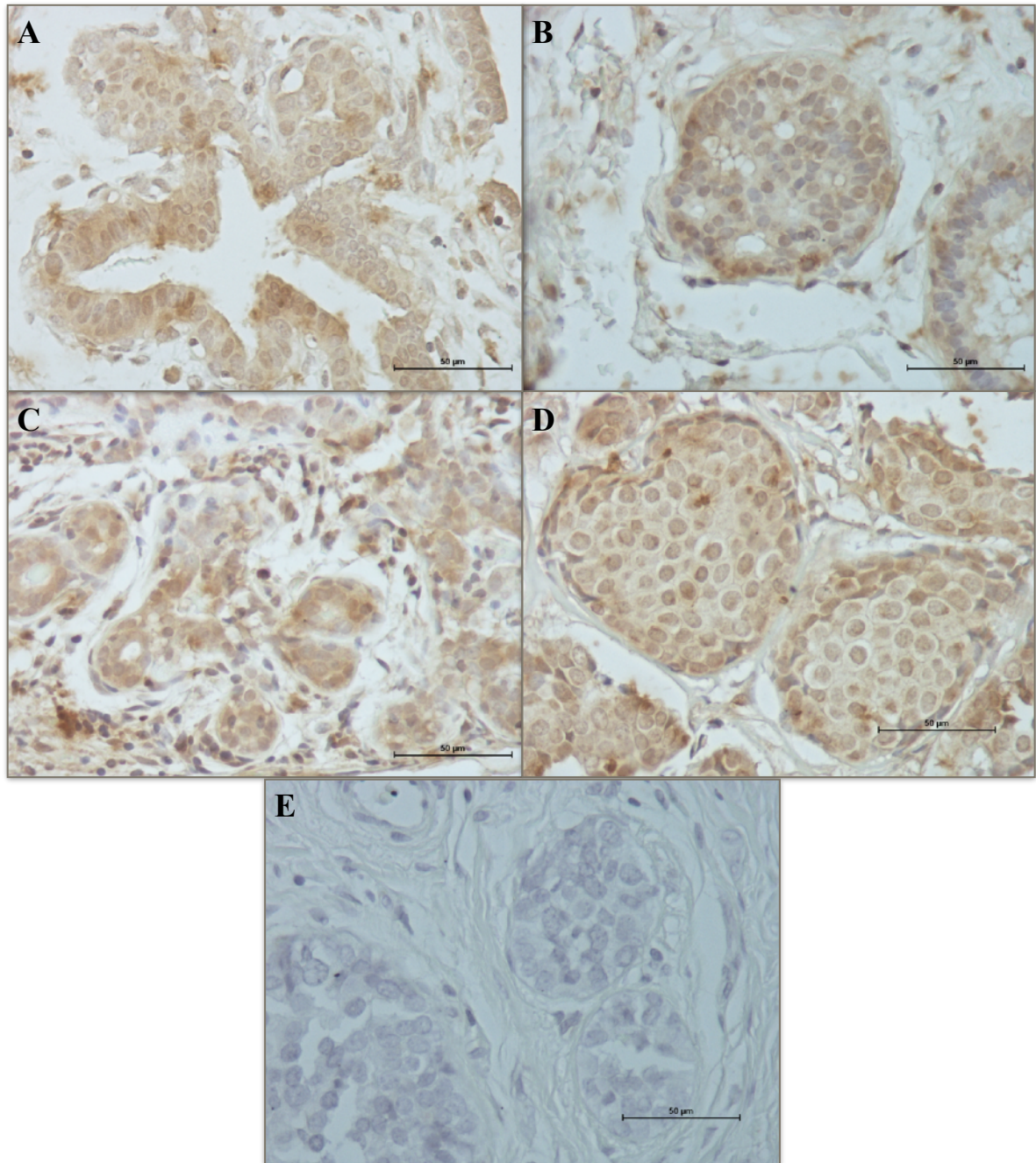


Figure 1. Immunohistochemistry for ST3Gal-I in human breast lesions. A) fibroadenoma; B) ductal carcinoma *in situ*; C) invasive ductal carcinoma; D) lobular carcinoma; E) negative control. Magnification of 400x. Scale bar: 50µm.

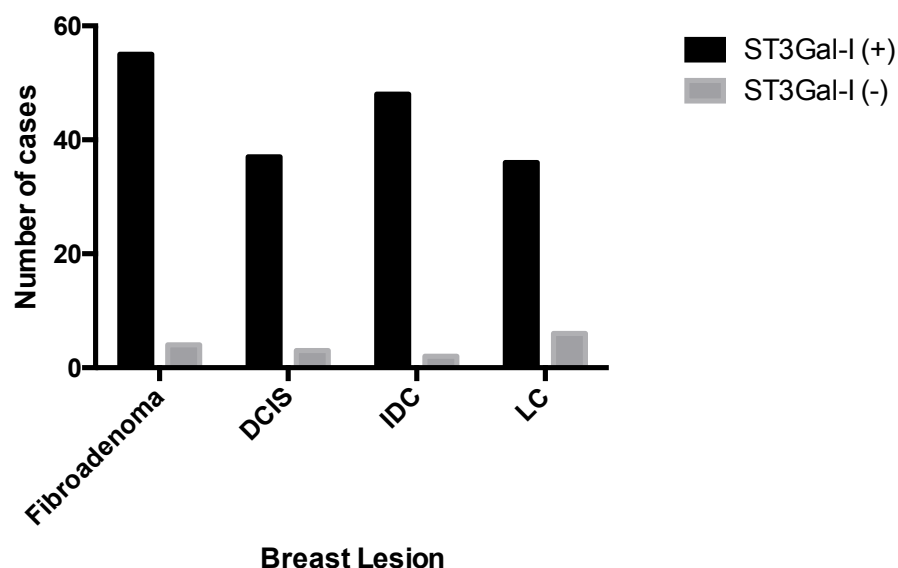


Figure 2. Evaluation of ST3Gal-I expression in fibroadenoma, ductal carcinoma *in situ* (DCIS), invasive ductal carcinoma (IDC), and lobular carcinoma (LC). No significant differences in immunostaining of ST3Gal I were observed interlesions.

Fibroadenoma, a benign mammary disease, showed the lowest content (47.5%) of α 2,3 sialic acid residues. The other diagnoses showed the following increasing content of Sia: 82.5% for DCIS, 88.1% for LC and 98% for IDC (Figure 3).

The MAA staining in breast lesions showed a diffuse cytoplasmatic and membrane pattern. The distribution of positive stainin of α 2,3-linked sialic acid residue in cells was different in between fibroadenoma and DCIS ($p=0.0006$), fibroadenoma and IDC ($p<0.0001$) and fibroadenoma and LC ($p<0.0001$) with cells staining intensity being significantly higher in DCIS, IDC and LC in relation to fibroadenoma (Figure 4).

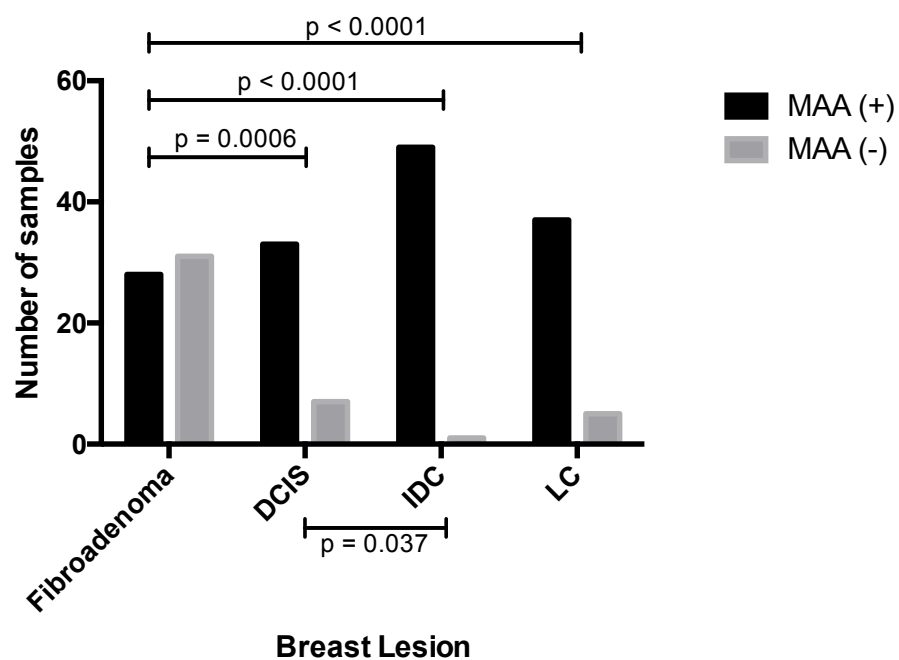


Figure 3. Evaluation of MAA staining in fibroadenoma, ductal carcinoma *in situ* (DCIS), invasive ductal carcinoma (IDC), and lobular carcinoma (LC). Significant differences in expression of MAA were noted between Fibroadenoma and the other lesions (Fisher's exact test).

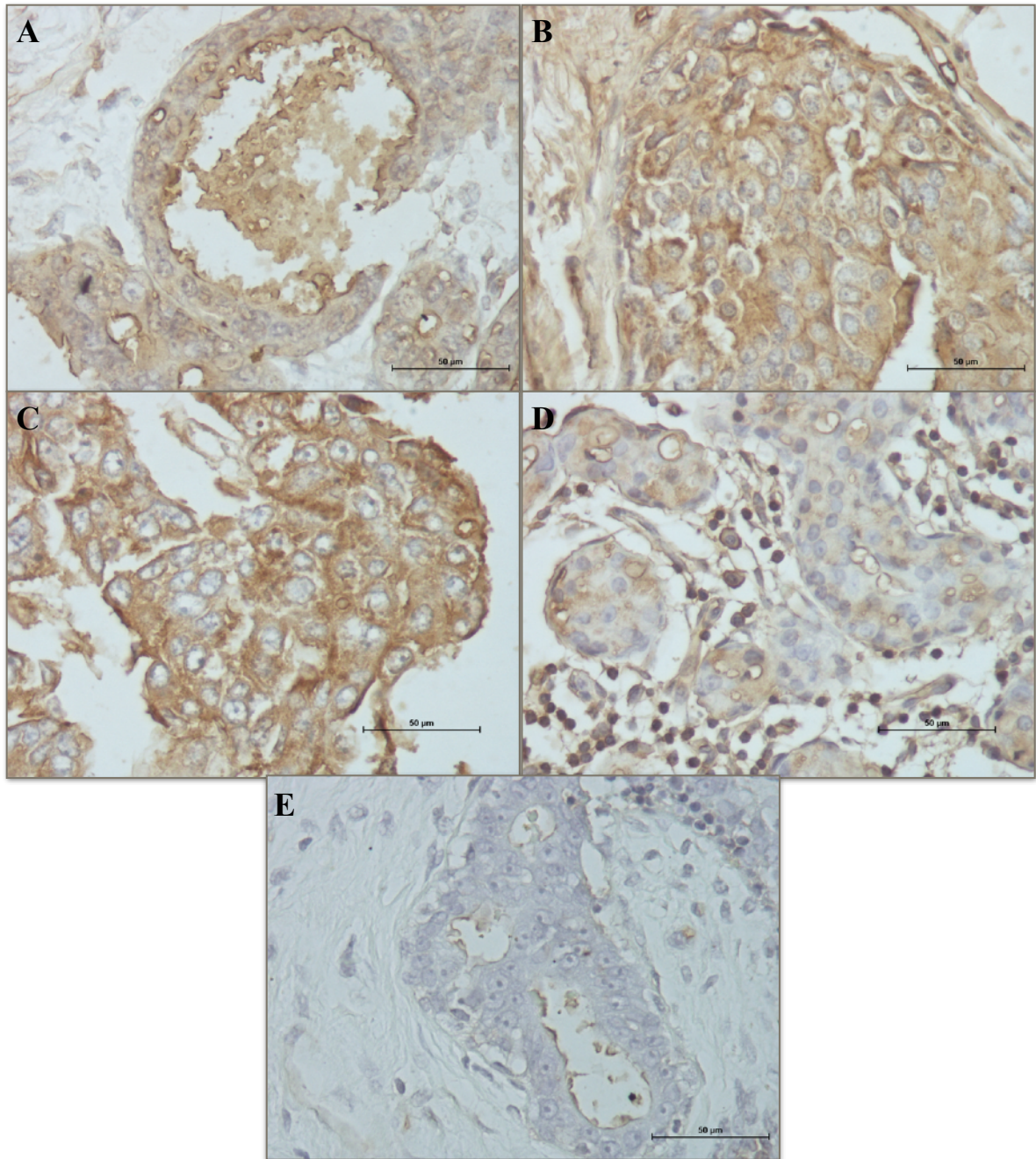


Figure 4. Lectin histochemistry with *Maackia amurensis* agglutinin II in human breast lesions. A) fibroadenoma presenting a diffuse cytoplasmic staining; B) ductal carcinoma *in situ* showing a diffuse cytoplasmic staining; C) invasive ductal carcinoma with a diffuse cytoplasmic staining; D) lobular carcinoma presenting a diffuse cytoplasmic and perinuclear staining; E) Negative control. Magnification of 400x. Scale bar: 50µm.

Correlation between ST3Gal-I, MAA, routine laboratory markers and clinic-pathologic features were analyzed by Fisher exact test (two variables) or Chi-square tests (three or more variables), and all tests were two-tailed. ST3Gal-I and MAA positive staining did not present significant correlation with clinic-pathologic features. These results are shown in Table 1, 2, 3 and 4 for fibroadenoma, DCIS, IDC and LC, respectively.

Table 1. Relationship between ST3Gal-I and MAA expression with clinic-pathologic features in Fibroadenoma.

Clinic-pathologic Features		ST3Gal-I			MAA		
		(+)	(-)	<i>p</i>	(+)	(-)	<i>p</i>
Age (years)	≥50	8	2	0,1424	6	4	0,4874
	<50	44	2		20	26	
Size (cm)	≥5	7	4	0,0016	3	4	1,0000
	<5	38	0		18	21	
Menstrual status	pre-menopausal	45	3	0,4702	22	26	1,0000
	post-menopausal	7	1		4	4	
Hormonal therapy	No	36	3	1,0000	16	23	0,2553
	Yes	16	1		10	7	
Family history	No	49	4	1,0000	24	29	0,5920
	Yes	3	0		2	1	

Table 2. Relationship between ST3Gal-I and MAA expression with clinic-pathologic features and classical immunohistochemical markers in ductal carcinoma *in situ* (DCIS).

Clinic-pathologic Features		ST3Gal-I			MAA		
		(+)	(-)	<i>p</i>	(+)	(-)	<i>p</i>
Age (years)	≥50	22	2	0,5429	21	3	0,1904
	<50	12	0		8	4	
Size (cm)	≥5	4	1	0,2619	5	0	0,5590
	<5	30	1		24	7	
Menstrual status	pre-menopausal	17	1	1	14	4	1
	post-menopausal	17	1		15	3	
Hormonal therapy	No	16	1	1	15	2	0,4080
	Yes	18	1		14	5	
Family history	No	29	2	1	24	7	0,5590
	Yes	5	0		5	0	
Nuclear grade	High	23	1	0,2882	19	5	0,4474
	Intermediate	7	0		5	2	
	Low	4	1		5	0	
Necrosis	No	16	1	1	12	5	0,2185
	Yes	18	1		17	2	
ER	Negative	7	0	1	5	2	0,6017
	Positive	27	2		24	5	
PR	Negative	10	0	1	7	3	0,3696
	Positive	24	2		22	4	
HER-2	Negative	9	0	1	7	2	1
	Positive	25	2		22	5	
Subtype	Luminal A	5	0	0,7490	4	1	0,8463
	Luminal B	19	2		18	3	
	HER-2	4	0		3	1	
	Basal-like	3	0		2	1	

Table 3. Relationship between ST3Gal-I and MAA expression with clinic-pathologic features and classical immunohistochemical markers in invasive ductal carcinoma (IDC).

Clinic-pathologic Features		ST3Gal-I			MAA		
		(+)	(-)	<i>p</i>	(+)	(-)	<i>p</i>
Age (years)	≥50	27	2	0,5313	28	1	1
	<50	16	0		16	0	
Size (cm)	≥5	43	2	1	44	1	1
	<5	0	0		0	0	
Menstrual status	pre-menopausal	21	2	0,4889	23	0	0,4889
	post-menopausal	22	0		21	1	
Hormonal therapy	No	24	0	0,2121	23	1	1
	Yes	19	2		21	0	
Family history	No	34	2	1	35	1	1
	Yes	9	0		9	0	
Nuclear grade	High	21	0	*	21	0	*
	Intermediate	22	2		23	1	
	Low	0	0		0	0	
Necrosis	No	36	2	1	37	1	1
	Yes	7	0		7	0	
ER	Negative	15	0	0,5455	15	0	1
	Positive	28	2		29	1	
PR	Negative	20	2	0,2333	22	0	1
	Positive	23	0		22	1	
HER-2	Negative	12	0	1	12	0	1
	Positive	31	2		32	1	
Subtype	Luminal A	5	0	*	5	0	0,7651
	Luminal B	17	0		16	1	
	HER-2	8	0		8	0	
	Basal-like	6	0		6	0	
Death	No	31	2	1	32	1	1
	Yes	11	0		11	0	
Metastasis	No	31	2	1	32	1	1
	Yes	12	0		12	0	
Lymph node Status	No	27	2	0,5313	29	0	0,3556
	Yes	16	0		15	1	
Mitotic Index	High	6	0	0,4329	6	0	0,6643
	Intermediate	14	0		14	0	
	Low	23	2		24	1	

Table 4. Relationship between ST3Gal-I and MAA expression with clinic-pathologic features and classical immunohistochemical markers in lobular carcinoma (LC).

Clinic-pathologic Features		ST3Gal-I			MAA		
		(+)%	(-)%	<i>p</i>	(+)%	(-)%	<i>p</i>
Age (years)	≥50	28	4	0,5969	28	4	1
	<50	7	2		8	1	
Size (cm)	≥5	3	0	1	3	0	1
	<5	32	6		33	5	
Menstrual status	pre-menopausal	11	2	1	12	1	1
	post-menopausal	24	4		24	4	
Hormonal therapy	No	18	2	0,6628	18	2	1
	Yes	17	4		18	3	
Family history	No	31	4	0,2058	32	3	0,1476
	Yes	4	2		4	2	
Necrosis	No	33	6	1	34	5	1
	Yes	2	0		2	0	
ER	Negative	2	2	0,0952	3	1	0,4183
	Positive	33	4		33	4	
PR	Negative	7	3	0,1435	9	1	1
	Positive	28	3		27	4	
HER-2	Negative	16	3	1	17	2	1
	Positive	19	3		19	3	
Subtype	Luminal A	11	1	0,0587	11	1	0,6967
	Luminal B	17	2		16	3	
	HER-2	1	0		1	0	
	Basal-like	1	2		2	1	
Death	No	23	3	0,6509	25	1	0,0514
	Yes	12	3		11	4	
Metastasis	No	29	3	0,1075	30	2	0,0611
	Yes	6	3		6	3	
Lymph node Status	No	30	4	1	31	3	1
	Yes	4	0		4	0	

Changes in glycosylation are common in malignancy and, as almost all proteins are glycosylated, this can dramatically affect the behavior of the tumor cells [12]. The combined activity of glycosyltransferases and glycosidases determines the pattern of carbohydrate in the cells [7, 10, 29, 34]. Carbohydrates in cell surface molecules, such as in glycoconjugates, play

important roles in neoplastic cells altering components in many different cancers, and it is known to be correlated with proliferation, invasiveness and metastasis [14].

Sialic acids (Sia) residues, found in terminal position of glycoproteins and glycolipids on cellular secretions and cells surface [22, 24], are involved in modulation of inter-cells and cell-extracellular matrix components adhesion [24-26]. Thus, changes in the expression of sialic acid are related to physiopathological events [7, 20, 21]. The increased expression of sialylated glycans associated to carcinogenesis and tumour progression has been suggested as consequence of altered expression of sialyltransferases (STs) [26, 35, 37] and the level of expression of sialyltransferase genes has been proposed to be a prognostic marker for the follow-up of breast cancer patients [16].

ST3Gal family are 2,3-STs, which catalyse the transfer of sialic acid residues to galactose (Gal) residue [37]. All breast lesions studied on this paper - fibroadenoma, DCIS, IDC and LC - demonstrated high expression of ST3Gal-I, with no significant difference. Ferreira *et al.* [20], studying cutaneous epithelial lesions also found an increased expression of ST3Gal-I, both in pre-malignant lesion and skin tumors. In bladder cancer, the ST3Gal-I plays a major role in the sialylation of the T antigen and its overexpression appears to be part of initial oncogenic transformation [36]. Picco and colleagues [12] studied the role of ST3Gal-I in mammary tumor development on transgenic mice that over-express the sialyltransferases and their results indicated that ST3Gal-I was acting as a tumor promoter in that model of breast cancer.

Most of the expression of ST3Gal-I observed in the breast lesions of this study was presented as a diffuse cytoplasmatic stain with rare membrane staining. Although sialyltransferases are expected to be located in the trans-Golgi there are reports about post-Golgi localizations [20, 24].

The increased expression of sialylated epitopes has been described in numerous epithelial carcinomas and these changes in glycosylation are related to grade, invasion and metastasis. Also, detection of sialylated antigens at the surface of breast cancer cells is associated with poor prognosis and reduced overall survival of the patients [16].

Previous studies using other lectins as *Helix pomatia* (HPA), specific for N-acetyl-galactosamine residues, in benign and malignant breast tumors demonstrated a relation between changes in glycosylation and an increased invasive capacity of these cells, thereby

leading to remote metastasis. HPA could be considered as a probe for prognostic and clinical decisions in treatment strategies [40].

The first studies with the MAA were made by Wang and Cummings (1988) [41] who observed its potential leucoagglutinant and its specific carbohydrate binding. The presence of α 2,3-Sialic acids, detected by MAA in cancer cells, were related to invasive and metastatic behavior of some tumors and tumor progression [42-44].

In our work, lectin histochemistry showed a differential expression of α 2,3-linked sialic acid residues in cell glycoconjugates not only between benign lesion and malign tumors but also between malign tumors (DCIS and IDC). Lectins are interesting tools (probes) to detect changes in glycan pattern on the surface of cells (normal or transformed ones) because of its ability to recognize specific carbohydrate structures in glycoconjugates with differences in one bond between saccharides [25,37]. In such way, these (glyco)proteins help in pathology extracting information about susceptibility to treatments and identifying glycan biomarkers for cancer detection [24, 29, 32].

In our study α 2,3-Sialic acid residues profile showed significant difference between fibroadenoma, DCIS and IDC. This result may suggest an increase and involvement of α 2,3-linked sialic acid residues during tumor progression being MAA its promising probe.

Although this study shows a high expression of ST3Gal-I between fibroadenoma, DCIS, IDC and LC (with no significant difference), a corresponding high staining pattern for α 2,3-Sialic acid residues using lectin histochemistry was not observed. These observations could be explained by the activity of sialidases, enzymes responsible for removing sialic acid residues from glycoconjugates or, also, a possible change in Sia positioning in glycoproteins structure. Some conflicting findings as to the effects of sialidase over-expression in malignancy have been published [38]. Studies have shown that high level of plasma membrane sialidase has been related to the protection from apoptosis in colon cancer [45]. Other papers have shown that sialidases might also possess anti-metastatic properties, leaving the precise role for sialidases in tumor progression to be explained [46, 47].

CONCLUSION

Our study analyzed the expression of ST3Gal-I in breast lesions and results showed its high expression in all of them. MAA recognized Sia being expressed differentially between fibroadenoma (benign lesion) and IDC, DCIS and LC tumors. Our findings suggests as increase of α 2,3-Sialic acid expression during cancer progression and corroborates the applicability and reliability of lectins as probes of carbohydrate phenotypic changes associated with breast lesions. No significant correlations were found between the expressions of ST3Gal-I and MAA, routine markers and clinical-histopathological characteristics of the patients. But still a lots need to be done to better understand the mechanisms of progression, maintenance and metastasis formation in breast cancer and the involvement of sialylation. Further research in this area of knowledge could help to analyze the changes occurring in tumor cells relating to clinical outcome and to find new pathways in breast cancer diagnosis and personalized tumor therapy, reducing side effects and increasing its efficiency and patients life quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants.

REFERENCES

1. Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313.
2. World Health Organization (WHO). WHO Cancer. Available in: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Acesso em 23 de dezembro de 2015).
3. Lee, B. L., Liedke, P. E., Barrios, C. H., Simon, S. D., Finkelstein, D. M., & Goss, P. E. (2012). Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *The lancet oncology*, 13(3), e95-e102.

4. Instituto Nacional Do Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Available on: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> (Acesso em 23 de dezembro de 2015).
5. Kreeger, P. K., & Lauffenburger, D. A. (2010). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, 31(1), 2-8.
6. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
7. Ghazarian, H., Idoni, B. and Oppenheimer, S. B. (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* 113; 236–247.
8. Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*.
9. Turnbull, J. E. and Field, R. A. (2007) Emerging glycomics technologies. *Nat. Chem. Biol.* 3; 74–77.
10. Rosenfeld, R., Bangio, H., Gerwig, G. J., Rosenberg, R., Aloni, R., Cohen, Y., ... & Maya, R. B. Y. (2007). A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(3), 415-426.
11. Maeda, T. and Nishimura, S. I. (2008) FRET-based direct and continuous monitoring of human fucosyltransferases activity: an efficient synthesis of versatile GDP-L-fucose derivatives from abundant D-galactose. *Chem. Eur. J.* 14; 478–487.
12. Picco, G., Julien, S., Brockhausen, I., Beatson, R., Antonopoulos, A., Haslam, S., ... & Burchell, J. (2010). Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology*, 20(10), 1241-1250.
13. Christiansen, M. N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J. L., & Packer, N. H. (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*, 14(4-5), 525-546.
14. Yang, X., Zhang, Z., Jia, S., Liu, Y., Wang, X. and Yan, Q. (2007) Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation. *Int. J. Biochem. Cell Bio.* 39; 1722– 1730.
15. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-gly- cans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB Rep* 2011;44:772-81.

16. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M. A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., & Delannoy, P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate research*, 345(10), 1377-1383.
17. López-Morales, D., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Zenteno, E., & Vallejo-Ruiz, V. (2010). Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagn Pathol*, 5, 74.
18. Zhao, Y., Li, Y., Ma, H., Dong, W., Zhou, H., Song, X., ... & Jia, L. (2014). Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(2), 520-536.
19. Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M. A., Colomb, F., Foulquier, F., Groux-Degroote, S., & Delannoy, P. (2011). Sialyltransferases functions in cancers. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4, 499-515.
20. Ferreira, S. A., Vasconcelos, J. L. A., Silva, R. C. W. C., Cavalcanti, C. L. B., Bezerra, C. L., Rêgo, M. J. B. M., & Beltrão, E. I. C. (2013). Expression patterns of α 2, 3-sialyltransferase I and α 2, 6-sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. *European Journal of Histochemistry*, 57(1), 7.
21. Ferreira, S. A., Vasconcelos, J. L. A., Cavalcanti, C. L. B., Rêgo, M. J. M. B., & Beltrao, E. I. C. (2013). Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. *Medical molecular morphology*, 46(4), 198-202.
22. Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current opinion in structural biology*, 19(5), 507-514.
23. CUI, Hongxia et al. Differential expression of the α 2, 3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. **Oncology reports**, v. 25, n. 5, p. 1365-1371, 2011.
24. Varki A, Cummings RD, Esko JD. Essentials of glycobiology, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, 2009.
25. Lu, J., & Gu, J. (2015). Significance of β -Galactoside α 2, 6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules*, 20(5), 7509-7527.
26. Huang, S., Day, T. W., Choi, M. R., & Safa, A. R. (2009). Human β -galactoside α -2, 3-sialyltransferase (ST3Gal III) attenuated Taxol-induced apoptosis in ovarian cancer cells

- by downregulating caspase-8 activity. *Molecular and cellular biochemistry*, 331(1-2), 81-88.
27. Varki, A., & Gagneux, P. (2012). Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253(1), 16-36.
 28. Crespo, H. J., Lau, J. T., & Videira, P. A. (2015). Dendritic cells: a spot on sialic acid. *Carbohydrates: the yet to be tasted sweet spot of immunity*, 4(491), 14.
 29. Chandrasekaran, E. V., Xue, J., Neelamegham, S., & Matta, K. L. (2006). The pattern of glycosyl-and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydrate research*, 341(8), 983-994.
 30. Adamczyk, B., Tharmalingam, T., & Rudd, P. M. (2012). Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(9), 1347-1353.
 31. do Nascimento, J. C. F., de Almeida Ferreira, S., de Albuquerque Vasconcelos, J. L., da Silva-Filho, J. L. Q., Barbosa, B. T., Bezerra, M. F., ... & Beltrão, E. I. C. (2015). Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. *Experimental and molecular pathology*, 99(3), 409-415.
 32. Dornelas, M. T., Rodrigues, M. F., Machado, D. C., Gollner, Â. M., & Ferreira, A. P. (2009). Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin spinocellular carcinoma and actinic keratose. *Anais brasileiros de dermatologia*, 84(5), 469-475.
 33. dos Santos, P. B., Zanetti, J. S., Ribeiro-Silva, A., & Beltrão, E. I. (2012). Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagnostic pathology*, 7(1), 104.
 34. Seko, A., & Yamashita, K. (2008). Activation of β 1, 3-N-Acetylglucosaminyltransferase-2 (β 3Gn-T2) by β 3Gn-T8 POSSIBLE INVOLVEMENT OF β 3Gn-T8 IN INCREASING POLY-N-ACETYLLACTOSAMINE CHAINS IN DIFFERENTIATED HL-60 CELLS. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33094-33100.
 35. Wang, P. H. (2005). Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. *J Cancer Mol*, 1(2), 73-81.

36. Videira, P. A., Correia, M., Malagolini, N., Crespo, H. J., Ligeiro, D., Calais, F. M., ... & Dall'Olio, F. (2009). ST3Gal. I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC cancer*, 9(1), 1.
37. Carvalho AS¹, Harduin-Lepers A, Magalhães A, Machado E, Mendes N, Costa LT, Matthiesen R, Almeida R, Costa J, Reis CA. Differential expression of alpha-2,3-sialyltransferases and alpha-1,3/4-fucosyltransferases regulates the levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jan; 42(1):80-9.
38. Potapenko, I. O., Haakensen, V. D., Lüders, T., Helland, Å., Bukholm, I., Sørli, T., ... & Børresen-Dale, A. L. (2010). Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Molecular oncology*, 4(2), 98-118.
39. Li, Y. L., Wu, G. Z., Dawe, G. S., Zeng, L., Cui, S. S., Loers, G., ... & Xiao, Z. C. (2008). Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by L1 via phospholipase Cy and cooperate to modulate neurite outgrowth, cell survival and migration. *PloS one*, 3(12), e3841.
40. Kölbl, A. C., Andergassen, U., & Jeschke, U. (2015). The role of glycosylation in breast cancer metastasis and cancer control. *Frontiers in oncology*,
41. Wang, W. C., & Cummings, R. D. (1988). The immobilized leukoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2, 3 to penultimate galactose residues. *Journal of Biological Chemistry*, 263(10), 4576-4585.
42. Tang, W., Mafune, K., Nakata, M., Konishi, T., Kojima, N., Mizuochi, T., & Makuuchi, M. (2003). Association of histochemical expression of *Maackia amurensis* leukoagglutinin-positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. *Histopathology*, 42(3), 239-245.
43. Wang, F. L., Cui, S. X., Sun, L. P., Qu, X. J., Xie, Y. Y., Zhou, L., ... & Wang, Y. S. (2009). High expression of α 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. *Cancer detection and prevention*, 32(5), 437-443.

44. Jun, L., Yuanshu, W., Yanying, X., Zhongfa, X., Jian, Y., Fengling, W., ... & Shuxiang, C. (2012). Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. *Medical Oncology*, 29(1), 84-90.
45. Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., & Miyagi, T. (2002). Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10718-10723.
46. Kato, T., Wang, Y., Yamaguchi, K., Milner, C. M., Shineha, R., Satomi, S., & Miyagi, T. (2001). Overexpression of lysosomal-type sialidase leads to suppression of metastasis associated with reversion of malignant phenotype in murine B16 melanoma cells. *International journal of cancer*, 92(6), 797-804.
47. Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., ... & Miyagi, T. (2002). Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *International journal of cancer*, 97(2), 180-185.

5 CONCLUSÕES

- Nosso estudo analisou a expressão de ST3Gal-I em lesões de mama (fibroadenoma, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular) e os resultados mostraram sua alta expressão em todas elas.
- Os resíduos de ácidos siálicos α 2,3-ligados foram reconhecidos pela lectina *Maackia amurensis agglutinin* (MAA) e uma diferença significativa de expressão foi observada entre a lesão benigna e as lesões malignas e também entre as lesões malignas (CDIS, CDI).
- Nossos resultados sugerem um aumento na expressão de α 2,3-ácido siálico durante a progressão do câncer e corrobora a importância das lectinas como sondas de alterações fenotípicas dos carboidratos associadas com lesões de mama.
- Não foram encontradas correlações significativas entre as expressões de ST3Gal-I e MAA, os marcadores de rotina e as características clinico-histopatológicas dos pacientes.

6 PERSPECTIVAS

Muito estudo precisa ser realizado para compreensão do envolvimento da sialilação com os mecanismos de progressão e metástase no câncer de mama. Pretende-se realizar um estudo *in silico* relacionando eventos de alterações genéticas no Câncer de Mama com a expressão de sialiltransferases e alterações fenotípicas de ácidos siálicos e montar um painel de novos possíveis biomarcadores. A avaliação desse painel pode esclarecer o mecanismo de transformação maligna que ocorre nas células, encontrando novos caminhos para o diagnóstico precoce do câncer de mama e terapia personalizada do tumor, reduzindo os efeitos colaterais e aumentando sua eficiência e a qualidade de vida de pacientes.

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, Barbara; THARMALINGAM, Tharmala; RUDD, Pauline M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1347-1353, 2012.

BASKIN, Y.; YIGITBASI, T. Clinical proteomics of breast cancer. **Current genomics**, v. 11, n. 7, p. 528-536, 2010.

BATEMAN, Adrian C. Breast pathology. **Surgery (Oxford)**, v. 25, n. 6, p. 245-250, 2007.

BAYER, Nils B. et al. Artificial and Natural Sialic Acid Precursors Influence the Angiogenic Capacity of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2571-2586, 2013.

BECKMAN, Robert A.; LOEB, Lawrence A. Genetic instability in cancer: theory and experiment. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 423-435.

BLOMME, Bram et al. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 3, p. 592-603, 2009.

BOLAND, C. Richard; GOEL, Ajay. Somatic evolution of cancer cells. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 436-450.

BOMBONATI, Alessandro; SGROI, Dennis C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 308-318, 2011.

BREASTCANCER.ORG, 2015. What Is Breast Cancer. Disponível em <http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc>. Acesso em: 19 de janeiro de 2015.

BURSTEIN, Harold J. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 14, p. 1430-1441, 2004.

CAZET, Aurélie et al. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 10, p. 1377-1383, 2010.

CHANDRASEKARAN, E. V. et al. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. **Carbohydrate research**, v. 341, n. 8, p. 983-994, 2006.

CHEANG, Maggie CU et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHRISTIANSEN, Maja N. et al. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**, v. 14, n. 4-5, p. 525-546, 2014.

CIRQUEIRA, Magno Belém et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CRESPO, Hélio J.; LAU, Joseph TY; VIDEIRA, Paula A. Dendritic cells: a spot on sialic acid. **Carbohydrates: the yet to be tasted sweet spot of immunity**, v. 4, n. 491, p. 14, 2015.

CUI, Hongxia et al. Differential expression of the α 2, 3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. **Oncology reports**, v. 25, n. 5, p. 1365-1371, 2011.

DAWSON, Sarah-Jane et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. **British journal of cancer**, v. 103, n. 5, p. 668-675, 2010.

DE ALBUQUERQUE VASCONCELOS, Juliana Lúcia et al. Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 46, n. 3, p. 105, 2013.

DECENSI, A. et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer. **Annals of oncology**, p. mdq427, 2010.

MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro et al. Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 6, p. 403-409, 2011.

DOS SANTOS, Petra B. et al. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagnostic pathology**, v. 7, n. 1, p. 104, 2012.

EBOS, John ML; KERBEL, Robert S. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 8, n. 4, p. 210-221, 2011.

EHEMAN, Christie R. et al. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 6, p. 1763-1769, 2009.

FERREIRA, S. A. et al. Expression patterns of $\alpha 2$, 3-sialyltransferase I and $\alpha 2$, 6-sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 1, p. 7, 2013.

FISHER, Edwin R. et al. Solving the dilemma of the immunohistochemical and other methods used for scoring estrogen receptor and progesterone receptor in patients with invasive breast carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 1, p. 164-173, 2005.

FREEZE, Hudson H.; AEBI, Markus. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. **Current opinion in structural biology**, v. 15, n. 5, p. 490-498, 2005.

GABIUS, Hans-Joachim et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GALLEGOS, Itandehui Belem et al. Expression of antigen tf and galectin-3 in fibroadenoma. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 694, 2012.

GEYER, Felipe C.; MARCHIÒ, Caterina; REIS-FILHO, Jorge S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77-88, 2009.

GHAZARIAN, Haïke; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

GOETZ, John A. et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. **Glycoconjugate journal**, v. 26, n. 2, p. 117-131, 2009.

GORELIK, Elieser; GALILI, Uri; RAZ, Avraham. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. In: **Prostate Cancer: New Horizons in Research and Treatment**. Springer US, 2002. p. 109-141.

GREAVES, Mel; MALEY, Carlo C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306-313, 2012.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARDUIN-LEPERS, Anne et al. Sialyltransferases functions in cancers. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 499-515, 2011.

HARDUIN-LEPERS, Anne et al. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. **Glycobiology**, v. 15, n. 8, p. 805-817, 2005.

HERZIG, Michaela; CHRISTOFORI, Gerhard. Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1602, n. 2, p. 97-113, 2002.

HICKS, David G.; SCHIFFHAUER, Linda. Standardized assessment of the HER2 status in breast cancer by immunohistochemistry. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 8, p. 459-467, 2011.

HUANG, Su et al. Human β -galactoside α -2, 3-sialyltransferase (ST3Gal III) attenuated Taxol-induced apoptosis in ovarian cancer cells by downregulating caspase-8 activity. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 331, n. 1-2, p. 81-88, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> (Acesso em 23 de dezembro de 2015).

JONES, J. Louise. Progression of ductal carcinoma in situ: the pathological perspective. **Breast Cancer Res**, v. 8, p. 204, 2006.

JUN, Li et al. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 84-90, 2012.

KOPF, Eliezer; ZHARHARY, Dorit. Antibody arrays—an emerging tool in cancer proteomics. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 7, p. 1305-1317, 2007.

KREEGER, Pamela K.; LAUFFENBURGER, Douglas A. Cancer systems biology: a network modeling perspective. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 2-8, 2010.

KUMAR, Vinay. ABBAS Abul k.; ASTER, C. John. **Robbins Patologia Básica**. Tradução de: Robbins basic pathology, 9th ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2013.

LEAL, André FG et al. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical mycology**, v. 50, n. 7, p. 756-759, 2012.

LI, Ya-li et al. Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by L1 via phospholipase C γ and cooperate to modulate neurite outgrowth, cell survival and migration. **PloS one**, v. 3, n. 12, p. e3841, 2008.

LU, Jishun; GU, Jianguo. Significance of β -Galactoside α 2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7509-7527, 2015.

MADERA, Milan; MECHREF, Yehia; NOVOTNY, Milos V. Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 13, p. 4081-4090, 2005.

MAEDA, Takahiro; NISHIMURA, Shin-Ichiro. FRET-Based Direct and Continuous Monitoring of Human Fucosyltransferases Activity: An Efficient synthesis of Versatile GDP-L-Fucose Derivatives from Abundant d-Galactose. **Chemistry—A European Journal**, v. 14, n. 2, p. 478-487, 2008.

MONZO, Alex; BONN, Günther K.; GUTTMAN, András. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 423-432, 2007.

PICCO, Gianfranco et al. Over-expression of ST3Gal-I promotes maMAAry tumorigenesis. **Glycobiology**, v. 20, n. 10, p. 1241-1250, 2010.

PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, 2015.

POLYAK, Kornelia. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

POTAPENKO, Ivan O. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Molecular oncology**, v. 4, n. 2, p. 98-118, 2010.

POWLESLAND, Alex S. et al. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**, v. 19, n. 8, p. 899-909, 2009.

REDDI, Alagarsamy Lakku et al. Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patients with SCC of the uterine cervix. **Cancer letters**, v. 149, n. 1, p. 207-211, 2000.

REIS, Celso A. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 4, p. 322-329, 2010.

ROLLAND, Phil et al. The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer. **International journal of cancer**, v. 120, n. 6, p. 1311-1317, 2007.

ROSENFELD, Rakefet et al. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 3, p. 415-426, 2007.

SADIK, Omowunmi A.; YAN, Fei. Electrochemical biosensors for monitoring the recognition of glycoprotein–lectin interactions. **Analytica chimica acta**, v. 588, n. 2, p. 292-296, 2007.

SANTEN, Richard J.; MANSEL, Robert. Benign breast disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 275-285, 2005.

SAPINO, Anna et al. Estrogen receptor- β is expressed in stromal cells of fibroadenoma and phyllodes tumors of the breast. **Modern pathology**, v. 19, n. 4, p. 599-606, 2006.

SEKO, Akira; YAMASHITA, Katsuko. Activation of β 1, 3-N-Acetylglucosaminyltransferase-2 (β 3Gn-T2) by β 3Gn-T8 possible involvement of β 3Gn-T8 in increasing Poly-N-Acetylactosamine chains in differentiated H1-60 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33094-33100, 2008.

SCHAUER, Roland. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. **Current opinion in structural biology**, v. 19, n. 5, p. 507-514, 2009.

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

SHIMAA, Yoh-ichi et al. Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7003-7012, 2006.

SIMPSON, Peter T. et al. Pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. **Breast cancer research**, v. 5, n. 5, p. 258-262, 2003.

SOBRAL, Ana Paula V. et al. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral science**, v. 52, n. 1, p. 49-54, 2010.

SOTIRIOU, Christos; PUSZTAI, Lajos. Gene-expression signatures in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

TANG, W. et al. Association of histochemical expression of Maackia amurensis leucoagglutinin-positive glycoconjugates with behaviour of human gastric cancer. **Histopathology**, v. 42, n. 3, p. 239-245, 2003.

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

TURNBULL, Jeremy E.; FIELD, Robert A. Emerging glycomics technologies. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 74-77, 2007.

VARKI A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>.

WANG, Wei-Chun; CUMMINGS, R. D. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2, 3 to penultimate galactose residues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 10, p. 4576-4585, 1988.

WANG, Peng-Hui. Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. **J Cancer Mol**, v. 1, n. 2, p. 73-81, 2005.

WANG, Lai-Xi; HUANG, Wei. Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. **Current opinion in chemical biology**, v. 13, n. 5, p. 592-600, 2009.

WANG, Feng-Ling et al. High expression of α 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer detection and prevention**, v. 32, n. 5, p. 437-443, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> (Acesso em 23 de dezembro de 2015).

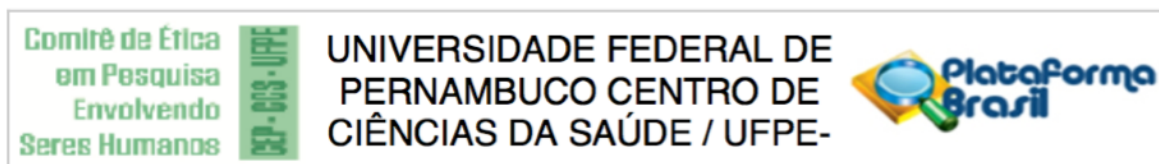
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Acesso em 23 de dezembro de 2015).

YEH, I.-Tien; MIES, Carolyn. Application of immunohistochemistry to breast lesions. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 132, n. 3, p. 349-358, 2008.

YERUSHALMI, Rinat et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **The lancet oncology**, v. 11, n. 2, p. 174-183, 2010.

ZAHA, Dana Carmen. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 382, 2014.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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: 6

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: 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, freqüentemente, mudanças no microambiente tumoral, causando inflamação e resultando em mudança no perfil das proteínas teciduais que podem ser secretadas (Kopf & Zharhary, 2007). O grau de malignidade do câncer está relacionado à sua habilidade em desarranjar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras de tecidos adjacentes e metastizar 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 Meija 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 672.083

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 e UFPE; - Obter blocos de tecidos mamários e prostáticos embebidos em parafina pertencentes ao setor de Anatomia

Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco e 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

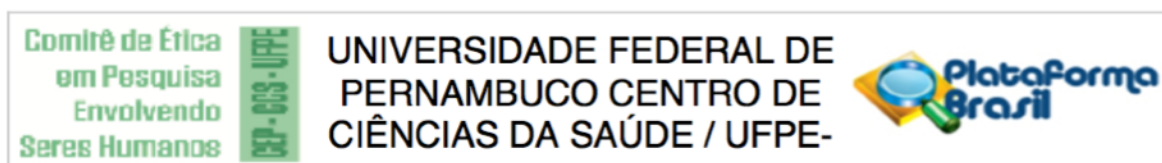
UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 672.083

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:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br