



Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde - PPGBAS

**EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS, GALECTINAS E RECEPTORES
HORMONAIS NO ESTROMA TUMORAL DO CARCINOMA DUCTAL *in situ*
MAMÁRIO HUMANO**

**Mestrando: Wilson José de Miranda Lima
Orientadora: Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida
Coorientador: Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**

Recife, 2017

Wilson José de Miranda Lima

**EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS, GALECTINAS E RECEPTORES
HORMONAIS NO ESTROMA TUMORAL DO CARCINOMA DUCTAL *in situ*
MAMÁRIO HUMANO**

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

Orientadora:

Prof. Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Coorientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Departamento de Bioquímica, CB/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Recife, 2017

Catálogo na Fonte:

Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Lima, Wilson José de Miranda

Expressão de carboidratos, glectinas e receptores hormonais no estroma tumoral do carcinoma ductal *in situ* mamário humano / Wilson José de Miranda Lima. – Recife: O Autor, 2017.

56 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Sinara Mônica Vitalino de Almeida

Coorientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.

Inclui referências

1. Mamas- câncer 2. Diagnóstico 3. Imunohistoquímica I. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de (orient.) II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (coorient.) III. Título

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-439

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde - PPGBAS

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

**Vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde**

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lima, Wilson José de Miranda

Título: EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS, GALECTINAS E RECEPTORES HORMONAIS NO ESTROMA TUMORAL DO CARCINOMA DUCTAL *in situ* MAMÁRIO HUMANO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em 20 de julho de 2017

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a Sinara Mônica Vitalino de Almeida
Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Luiza Rayanna Amorim de Lima
Universidade de Pernambuco – Campus Garanhuns

*À minha família, fonte de toda força e coragem que me fizeram chegar até o fim
deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A todos da minha família que nunca mediram esforços para me ajudar e incentivar na construção e realização de todos os meus sonhos.

À professora Amira Rose por ter me guiado e orientado na construção do projeto submetido a seleção do programa e por todo incentivo dedicado para tornar-me um profissional cada vez melhor.

A todos os meus amigos por entenderem minhas ausências muitas vezes devido as obrigações do dia a dia e por todo incentivo.

Ao meu amigo Anderson dos Santos por toda atenção, incentivo e companheirismo desde o início do planejamento para a seleção do curso, até o seu fim.

Às meninas do 501 de Recife, Kalline, Gisléa e Helena, por todo o apoio, atenção e recepção sempre que precisei de um lar na cidade.

Ao meu amigo Leandro Paulo por toda assistência, companheirismo e orientações sobre a UFPE e a cidade de Recife, uma amizade que levarei para o resto da vida.

Ao professor Eduardo Beltrão, por todas as conversas e palavras de incentivo, por sua orientação não só para o presente trabalho, mas, para vida profissional e pessoal.

À professora Sinara Almeida, por toda ajuda e atenção na construção deste trabalho.

Aos meus amigos do programa: Aline, André, Anna, Anthony, Geilza, Mirella e Priscila, por sempre me fazerem rir nos momentos mais complicados e por toda companhia e companheirismo nessa jornada.

A todos vocês, meu muito obrigado!

RESUMO

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas dentro da membrana basal dos ductos mamários. O estroma tumoral tornou-se um importante tema de investigação na pesquisa do câncer para o entendimento da biologia da doença e o potencial prognóstico. Este trabalho objetivou caracterizar o estroma tumoral do CDIS mamário humano por meio da análise da expressão de carboidratos, galectinas e receptores hormonais. Foram analisadas amostras marcadas com as lectinas Concanavalina A (Con A) e *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) para identificação dos seguintes biomarcadores sacarídicos metil- α -D-manose e α -L-fucose, respectivamente. Também foram analisadas amostras marcadas por imunohistoquímica contra receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e Galectinas 1 e 3. Para análise das amostras, utilizou-se o critério de cruzes e posteriormente foi feita comparação com os dados clínico-patológicos (idade, tamanho tumoral, expressão de RE e RP). Para análise dos dados foi utilizado o programa Stata 14 na função de proporção logit. De um total de 62 casos de CDIS, 17 atenderam aos critérios de inclusão do estudo. Onze amostras (64,7%) foram positivas para metil- α -D-manose e 4 (23,6%) para o α -L-fucose. Treze amostras (76,4%) foram positivas para Galectina-1 e nove amostras (52,9%) para a Galectina-3. Na maioria dos casos (54,4%), o estroma foi classificado como desmoplásico, seguido por um caráter inflamatório (45,5%). Os dados obtidos pela correlação logit não apresentaram resultados significativos. Não foi possível identificar nenhuma relação entre a expressão estromal dos carboidratos avaliados (metil- α -D-manose e α -L-fucose) e das Galectinas 1 e 3 e os dados clínico-patológicos dos pacientes. A ampliação do estudo quanto ao universo amostral e possibilidade de acompanhamento das pacientes são cruciais para um aprofundamento de relação/influência do estroma inicialmente como ambiente não-transformado no processo carcinogênico, seu desenvolvimento e modificação e resposta terapêutica. Ajudando e possibilitando a identificação dos fatores com ou sem influência direta ou indireta na progressão deste subtipo de câncer de mama.

Palavras Chave: Câncer de Mama. Glicobiologia. Matriz extracelular.

ABSTRACT

Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) is a proliferation of malignant epithelial cells confined inside a basal membrane of the mammary ducts. Tumor stroma has become an important theme of interest in cancer research and potential prognosis. The aim of this study was to characterize tumor stroma of human mammary DCIS by analyzing the expression of carbohydrates and hormone receptors. We analyzed samples stained with the lectins: Concanavalin A (Con A) and *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I) in order to identify the following saccharidic biomarkers methyl- α -D-manose and α -L-fucose. We still analyzed samples stained by immunohistochemistry against estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) and Galectins 1 and 3. We used the cross-based classification criterion and, posteriorly, it was made a comparison with the clinical-pathological data (age, tumor size, ER and PR positivity). The Stata 14 program was used in the logit proportion function of data. From a total of 62 DCIS cases, 17 were included in the study. Eleven samples (64.7%) were positive for methyl- α -D-manose and 4 (23.6%) for α -L-fucose. Thirteen samples (76.4%) were positive for Galectin-1 and nine (52.9%) for Galectin-3. In most of the cases (54.4%), stroma was classified as desmoplastic, followed by an inflammatory character (45.5%). Data obtained by logit co-relation did not present significant results. It was not possible to identify any relationship between the stromal expression of the evaluated carbohydrates (methyl- α -D-manose and α -L-fucose) and Galectins 1 and 3 with patients clinical-pathological data. The study amplification regarding sample universe and possibility of following-up the patients are crucial for a depth relationship/influence of the stroma as a non-transformed environment in the carcinogenic process, its development and therapeutic response. Helping and enabling the identification of factors with or without, direct or indirect, influence on the progression of this breast cancer subtype.

Keywords: Breast Cancer. Glycobiology. Extracellular matrix.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Resultados da histoquímica com lectinas (Con A e UEA-I) e Imunohistoquímica (Anti-Gal-1 e 3) para marcação estromal em amostras de CDIS	32
Tabela 2 Classificação do estroma segundo marcação para cada lectina	32
Tabela 3 Resultados da Imunohistoquímica para RE e RP	34
Tabela 4 Distribuição da marcação estromal por histoquímica com lectinas (Con A e UEA-I) e imunohistoquímica (Anti-Gal-1 e anti-Gal02) com os dados clínico-patológicos	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Histoquímica com Lectinas para Con A e UEA-I (A, B, C e D) e Imunohistoquímica contra Galectina-1 e -3 (E, F, G e H) 33
- Figura 2** Marcação imunohistoquímica anti-Receptores de Estrógeno e Progesterona 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS)

Células-tronco mesenquimais (CMSs, do inglês “*Mesenchymal Stem Cells*”)

Concanavalina A (Con A)

Fator de crescimento transformante (TGF, do inglês “*Transforming growth factor*”)

Fibroblastos associados ao câncer (CAFs, do inglês “*Cancer associated fibroblasts*”)

Galectina-1 (Gal-1)

Galectina-3 (Gal-3)

Glicosiltransferases (GTs)

Imunohistoquímica (IHQ)

Macrófagos associados a tumores (TAMs, do inglês “*Tumor associated macrophages*”)

N acetilglucosaminas (GlcNAc)

Receptor de Progesterona (RP)

Receptor de Estrógeno (RE)

Ulex europaeus agglutinin (UEA-I)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Carcinoma Ductal <i>in situ</i> de Mama	16
2.2 Estroma Tumoral	18
2.2.1 Características Gerais	18
2.2.2 Células estromais	20
2.3 Biomarcadores e Glicosilação no CDIS	22
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Amostras de tecidos e dados clínico patológicos	29
4.2 Histoquímica com Lectinas	29
4.3 Imunohistoquímica	29
4.4 Análise descritiva e estatística	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Expressão estromal de carboidratos e relação com o tipo de estroma	31
5.2 Marcação estromal para receptores de estrógeno e progesterona	33
5.3 Correlação da expressão de carboidratos e dados clínico-patológicos	34
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas na membrana basal dos ductos mamários. Com o grande aumento na incidência do CDIS, com auxílio dos programas de rastreamento mamográfico na última década, tornou-se imperativo uma melhor compreensão desta doença (SALLES *et al.*, 2007). Um dos aspectos tumorais que necessitam de melhor caracterização diz respeito ao papel e envolvimento do estroma na carcinogênese e aquisição do fenótipo maligno para todos os tipos de neoplasias, inclusive CDIS (RUDNICK; KUPERWASSER, 2012). No entanto, ainda são poucos os estudos sobre as características morfológicas do estroma tumoral de CDIS mamário, por exemplo, há carência de estudos sobre sua arquitetura e perfil inflamatório que podem ser fonte de entendimento da biologia do câncer (FISHER *et al.*, 2007; VAN BOCKSTAL *et al.*, 2013).

O CDIS é uma forma pré-invasiva de câncer de mama e não representa uma ameaça real para a vida das pacientes. Contudo, as opções terapêuticas disponíveis são as mesmas que aquelas disponíveis para tipos agressivos de tumores mamários e incluem mastectomia, cirurgia com preservação da mama, radioterapia ou uso de tamoxifeno. Portanto, faz-se necessário estudar de maneira aprofundada o CDIS para identificação de marcadores tumorais eficazes para estratificação de pacientes com baixo risco de progressão da doença possibilitando busca de melhorias na conduta terapêutica (SALLES *et al.*, 2007).

A expressão do Receptor de Progesterona (RP) é fortemente dependente da presença de Receptor de Estrógeno (RE). Tumores que expressam RP, mas não o RE são incomuns e representam 1% de todos os casos de câncer de mama (VIALE *et al.*, 2007). Por esta razão, a avaliação da expressão dos RP e RE serve como marcador tumoral nas amostras de câncer de mama e determinam a utilização da terapia com tamoxifeno (BUITRAGO *et al.*, 2011).

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue, em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e ou alterações em suas concentrações relacionam-se com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (CAPELOZZI, 2001), bem como no microambiente tumoral (LARI e

KUERER, 2011). Ou seja, os marcadores tumorais funcionam como indicadores da presença de neoplasia e podem ser produzidos diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença do crescimento ou surgimento tumoral (SILVEIRA, 2005). Em sua maioria, esses marcadores são proteínas ou porções proteicas (ALMEIDA, 2004) incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (MATTOS *et al.*, 2005).

A glicosilação, processo essencial nas células eucarióticas, é uma modificação pós-traducional que expande a informação biológica de biomoléculas pela adição de um novo nível de estrutura (FREEZE; AEBI, 2005; WANG; HUANG, 2009; REIS *et al.*, 2010), ampliando assim o leque de funcionalidades destas, incluindo as proteínas (GABIUS *et al.*, 2011). Esse processo ocorre por meio da ligação covalente de um carboidrato a proteínas ou lipídeos, catalisada por glicosiltransferases (GTs) e glicosidades com substratos doadores de açúcar específicos. Portanto, os glicanos são encontrados em vários tipos de biomoléculas que podem ser classificadas em diferentes famílias de glicoconjugados: glicoproteínas, glicoesfingolipídeos, proteoglicanos e proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (REIS *et al.*, 2010).

Gabius *et al.* (2011), desenvolveu um estudo caracterizando as funções biológicas de cada glicano (bem como sua ligação com determinadas proteínas - incluindo galectinas e lectinas do tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico), demonstraram que essa interação tem importância para o estudo do câncer. Diferentes tipos de glicoconjugados interferem nos principais processos celulares de câncer, bem como com o microambiente tumoral, levando a progressão do câncer (HAKOMORI S, 2002; FUSTER *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2013)

Lectina denomina um grupo de (glico)proteínas com habilidade de se ligar reversível e especificamente a estruturas mono ou oligossacarídicas, encontrada em diferentes plantas, invertebrados e animais (ISKRATSCH T *et al.*, 2009). Devido essa propriedade, as lectinas são empregadas como sondas em estudos de glicoconjugados da superfície celular para o entendimento da função dos carboidratos durante o crescimento e a diferenciação celular, interação entre células e meio extracelular, além de processos patológicos (SHARON N, 2007). No caso específico do câncer, as lectinas são utilizadas

para identificação de modificações nos padrões de expressão de carboidratos de glicoproteínas de superfície celular transformada com vistas ao entendimento da biologia tumoral e contribuição para o diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos (BRUSTEIN *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

As células tumorais exibem uma ampla gama de alterações de glicosilação em comparação com as suas contrapartes não transformadas. A glicosilação de proteínas aumenta a heterogeneidade molecular e a diversidade funcional dentro das populações celulares. Essa heterogeneidade ocorre porque as modificações de glicanos diferentes são específicas de proteínas, específicas do sítio (diferentes sítios de uma dada proteína podem ser diferencialmente glicosilados) e específicos de células. Ou seja, as especificidades da glicosilação dependem de vários fatores intrínsecos do processo de glicosilação dentro de uma determinada célula ou tipo de tecido (PINHO e REIS, 2015).

A ampliação da visão sobre o papel das complexas interações célula-tumoral e estroma para a gênese e aquisição das características do câncer (proliferação descontrolada, evasão da apoptose e do sistema imune, imortalização, invasão e metástase, por exemplo) evidenciou a lacuna existente de estudos sobre o perfil de glicosilação e expressão de marcadores tumorais das células estromais. Estudos de glicosilação estromal poderão ajudar no entendimento da biologia do câncer, resistência aos tratamentos existentes e para a proposição de modalidades de tratamentos mais eficazes (FERREIRA *et al.*, 2017). Este trabalho teve como objetivo caracterizar o estroma tumoral de amostras de CDIS mamário humano por meio da análise da expressão de receptores hormonais, carboidratos e galectinas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Carcinoma Ductal *in situ* de Mama

A mama da mulher adulta é constituída por uma série de ductos, ductulos e lóbulos que estão imersos em um estroma com quantidades variáveis de tecido adiposo e fibroso. Estas estruturas se organizam em forma de lobos, que se iniciam no mamilo, com os ductos coletores que drenam dos ductos e ductulos, e se ramificam nos lóbulos. Estes últimos junto aos ductos terminais formam a unidade terminal ducto-lobular, que representa a porção estrutural e funcional da mama. O epitélio que reveste esse sistema ducto-lobular é constituído por uma dupla camada de células, a mais interna denominada luminal e a externa é caracterizada como mioepitelial. Um terceiro tipo celular denominado basal tem sido descrito devido a sua localização na posição basal ou suprabasal do epitélio mamário (MILLS, 2007).

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é uma proliferação clonal de células epiteliais malignas confinadas a um sistema ducto lobular, sem evidência de rompimento da membrana basal e invasão do estroma circundante. Do ponto de vista biológico, o CDIS é uma doença heterogênea que pode progredir ou não para carcinoma ductal invasivo (BOCKSTAL; LIBBRECHT, 2015). Histologicamente, o CDIS é uma doença que engloba um amplo espectro de variações de lesões desde baixo-grau (bem diferenciadas), que não representam risco de vida, até lesões de alto-grau (mal diferenciadas), que podem abrigar focos de câncer de mama invasivo (VOLINIA *et al.*, 2012). A classificação histológica do CDIS leva em consideração as seguintes características: tamanho nuclear, polarização celular, presença e tamanho de nucléolos e a frequência mitótica. No exame histológico de rotina considera-se a presença de necrose comedo (necrose confluyente dentro de uma lesão CDIS), a presença e extensão de microcalcificações em correlação com imagem pré-operatória, a avaliação da extensão da lesão e a distância da lesão a partir de margens de excisão (ROYAL COLLEGE OF PATHOLOGISTS OF AUSTRALASIA, 2012).

As lesões comedônicas caracterizam-se pela presença de necrose central e calcificação, preenchendo os espaços ductais. Nas lesões sólidas, o

lúmen é ocupado por uma proliferação celular de tamanho médio, menores que as do tipo comedônicas. Os tipos micropapilar e papilar caracterizam-se por projeções papilares homogêneas e mistas, respectivamente, na superfície interna dos espaços ducto-lobulares. O tipo cribriforme, por sua vez, apresenta espaços glandulares nítidos e marcados (PROVENZANO *et al.*, 2013).

Do ponto de vista clínico, o CDIS apresenta-se raramente sintomático com um nódulo palpável na mama, secreção mamilar ou alterações na pele. A detecção precoce com aumento significativo da incidência da doença deu-se após a introdução do rastreamento mamográfico (VIRNIG *et al.*, 2010). Na mamografia, CDIS aparece como microcalcificações em 90% dos casos. Calcificações em uma distribuição agrupada ou segmentar estão associadas com CDIS de alto grau, enquanto CDIS de baixo grau associam-se a calcificações amorfas. Visto que a detecção por mamografia é dependente das microcalcificações, que por muitas vezes não estão presentes, esse procedimento não é de todo eficaz para o diagnóstico em alguns casos (GREENWOOD *et al.*, 2013).

O diagnóstico, em algumas situações, pode ser difícil para o patologista, principalmente quando há necessidade de diagnóstico diferencial entre hiperplasia ductal atípica e o CDIS de baixo grau ou quando há evidências de microinvasão. A variação diagnóstica entre estas lesões tem importantes implicações clínicas. Por isso, o diagnóstico histopatológico acurado tem sido considerado um dos parâmetros mais importantes para a decisão terapêutica, sendo o papel do patologista fundamental no tratamento das pacientes. O treinamento em reconhecer os padrões morfológicos do espectro de lesões proliferativas epiteliais mamárias ainda é o principal instrumento do patologista no diagnóstico dessas lesões (SALLE *et al.*, 2005).

Os carcinomas mamários possuem três vias principais de disseminação, a via local, hematogênica e linfática nos quais 30 a 50% dos casos apresentam metástases nos linfonodos axilares no momento do diagnóstico. De uma forma geral, a presença das metástases regionais indica a presença de metástases distais, assim, quanto maior o número de linfonodos envolvidos, maior a probabilidade de metástases distais. Os locais de metástases sistêmicas ocorrem com maior frequência nos pulmões, ossos, fígado, glândulas suprarrenais, ovários e sistema nervoso central (SCULLY *et al.*, 2012).

O tratamento primário do CDIS é a cirurgia, quer por mastectomia ou lumpectomia (remoção cirúrgica local que tenta preservar a mama). Como a mastectomia remove quase todo o tecido mamário, o risco de recorrência local é mínimo, sendo assim, a mastectomia é o tratamento cirúrgico preferido nos casos em que a doença não é extensa ou multifocal (em que não é possível obter margens cirúrgicas claras e cosmese satisfatória com lumpectomia), ou em pacientes com um alto risco subjacente de câncer de mama (por exemplo, portadores de uma mutação BRCA1 ou BRCA2) (PONTI *et al.*, 2014). O tratamento auxiliar, com a radioterapia e/ou tamoxifeno pode ser oferecido após a excisão cirúrgica local (CUZICK *et al.*, 2011). Estudos clínicos demonstraram uma redução significativa do risco de recorrência local com o uso de radioterapia em pacientes com CDIS tratados por lumpectomia (GOODWIN *et al.*, 2013).

Adicionalmente, informações moleculares do CDIS podem ser obtidas por meio de imunohistoquímica (IHQ) para proteínas com potencial prognóstico, incluindo os tipos que mostraram progressão para doença invasiva (PANG *et al.*, 2016). A investigação de biomarcadores em CDIS tem sido focada sobre as células epiteliais malignas e só recentemente tem crescido o interesse no papel do microambiente do tumor, incluindo o estroma, para determinar a progressão ou recorrência de carcinoma invasivo (BOCKSTAL *et al.*, 2013). Portanto, há a necessidade de ampliar os estudos sobre as características estromais do CDIS.

2.2 Estroma Tumoral

2.2.1 Características Gerais

Os tumores são compostos de duas partes distintas: parênquima e estroma, mas interativas que apresentam "comunicação cruzada" para promover o crescimento do tumor. Investigações suportam a noção de que as células estromais tumorais desempenham papéis importantes na iniciação, progressão e metástase do tumor. Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs, do inglês "*Cancer associated fibroblasts*") são os tipos celulares mais

frequentes do estroma tumoral, especialmente nos cânceres de mama e do pâncreas (OSTMAN A; AUGSTEN M, 2009). Além dos CAFs, existem também outros tipos celulares componentes do estroma que desempenham um papel importante no câncer de mama, tais como macrófagos, células endoteliais, adipócitos e leucócitos (YAN MAO *et al.*, 2013)

Hanahan e Weinberg (2000) observaram que os tumores são mais do que massas insulares de células cancerosas que proliferam. Em vez disso, são tecidos complexos compostos por múltiplos tipos de células distintas que participam de interações heterotípicas entre si. Há evidências que as células do estroma associado ao tumor são recrutadas e participam ativamente da tumorigênese. Ou seja, esses tipos celulares contribuem para o desenvolvimento e a expressão de certas características próprias do câncer. Estudos da biologia do câncer solidificaram e estenderam essa noção da participação do estroma na progressão tumoral, revelando que os tumores não podem mais ser entendidos isoladamente por meio de características das células cancerosas, mas deve abranger as contribuições do "microambiente tumoral" para a tumorigênese (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

A interação entre células do câncer e do estroma neoplásico é fundamental para a aquisição das capacidades para crescimento invasivo e metástase (EGEBLAD *et al.*, 2010; QIAN e POLLARD, 2010). A sinalização proveniente das células estromais afetam as células de carcinoma e atuar para alterar suas características de especificidade. Exemplo dessa sinalização foi demonstrada por células-tronco mesenquimais (CMSs, do inglês "*Mesenchymal Stem Cells*") presentes no estroma tumoral via secreção de CCL5/RANTES em resposta a sinais liberados por células cancerígenas; CCL5 age de forma recíproca nas células cancerosas para estimular o comportamento invasivo (KARNOUB *et al.*, 2007).

Os macrófagos da periferia tumoral podem promover a invasão local, fornecendo enzimas que degradam a matriz, como metaloproteinases e catepsinas proteases de cisteína (KESSENBROCK *et al.*, 2010). Observações como estas indicam que os fenótipos de malignidade de alta grau não surgem de forma estritamente autônoma nas células neoplásicas e que sua manifestação não pode ser entendida apenas por meio de análises genômicas deste tipo celular. Uma implicação importante, ainda não testada, é que a

capacidade de negociar a maioria das etapas da cascata de invasão-metástase pode ser adquirida em certos tumores sem o requisito de que as células neoplásicas associadas sofram mutações adicionais além das que eram necessárias para a formação de tumores primários (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

2.2.2 Células estromais

O tipo de célula mais abundante do estroma no câncer de mama são os fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Estas células secretam uma variedade de fatores solúveis, tais como quimiocinas ou fatores de crescimento que modulam o estroma e o crescimento tumoral. Apesar da sua morfologia regular, vários estudos têm revelado que os CAFs têm perfis de expressão de RNA mensageiro e proteína distintos dos fibroblastos presentes em tecido mamário normal (FOLGUEIRA *et al.*, 2013)

Além do envolvimento no crescimento tumoral, foi evidenciado que os CAFs participam da formação de metástases cerebrais em pacientes com câncer de mama, uma vez que são frequentemente encontradas nas metástases cerebrais e também propiciam a invasão, a formação de colônias e a transmigração de células de câncer de mama *in vitro* (CHOI *et al.*, 2014).

Resistências terapêuticas são a principal razão para o insucesso do tratamento do câncer de mama. O estroma tumoral também participa dessa resistência terapêutica (endócrina e quimioterápica) que contribui para a progressão do câncer de mama e mau prognóstico. Evidências demonstram que os CAFs podem induzir resistência terapêutica no tratamento do câncer de mama (TRUE; NELSON, 2013).

Macrófagos associados a tumores (TAMs, do inglês “*Tumor associated macrophages*”) formam uma população importante de células no câncer de mama e exibem um fenótipo característico orientado para a promoção do crescimento tumoral e angiogênese, remodelação de tecidos e suprimento da imunidade adaptativa. TAMs produzem muitos fatores que são promotores de tumor, tais como fator de crescimento endotelial vascular, citocinas e enzimas que suportam invasão, angiogênese e metástase (ALLINEN *et al.*, 2004).

Níveis elevados de TAMs associam-se a um pior prognóstico no câncer de mama (ZHANG *et al.*, 2010).

Outros tipos de leucócitos infiltrantes, além dos macrófagos, contribuem para a progressão do câncer de mama. Man *et al.* (2004) demonstraram que leucócitos infiltrantes foram encontrados em CDIS com ruptura da camada de células mioepiteliais, o que indica o envolvimento desse tipo celular na progressão de câncer de mama invasivo. Além disso, diferentes tipos de leucócitos (células T CD4 + e CD8 +, células B CD20+) desempenham papéis diversos no câncer de mama. Os linfócitos T ativados predominam no tecido do tumor, enquanto as células de linhagem mieloide (macrófagos associados ao tumor – TAMs) são os mais encontrados em tecido mamário "normal" (RUFFELL *et al.*, 2012). Em comparação com os tecidos de pacientes com câncer de mama tratados principalmente apenas por cirurgia, o tecido dos que receberam quimioterapia neoadjuvante apresentaram percentagens aumentadas de infiltrados de células mielóides, acompanhada por um aumento da proporção de células T CD8/ CD4 e números mais elevados de células expressando granzima B (enzima do TCD8). Esses resultados indicam que a quimioterapia pode afetar o meio ambiente imunológico do tumor (YAN MAO *et al.*, 2013).

Segundo Shekhar *et al.* (2001), as células endoteliais também desempenham um papel importante no crescimento e invasão do câncer. Por meio de um sistema de cultura tridimensional com células epiteliais de mama humana, fibroblastos de mama e células endoteliais em uma matriz de membrana basal reconstituída foi possível manter a capacidade inerente de segregar (ou compartimentar) e organizar-se de forma tridimensional com a formação de um núcleo central de estroma composto de fibroblastos e células endoteliais funcionais em torno das quais surgiram brotos epiteliais. Esse processo assemelha-se com a conjuntura *in vivo* porque, na mama, os ductos ou ácinos terminais estão inseridos em um estroma rico e especializado que circunda a unidade lobular. Este tecido conjuntivo lobular é geralmente solto, possui muitos capilares, e é sustentado/cercado por gordura circundante e tecido fibroso mais denso da porção estrutural e não funcional da mama.

Outro tipo celular encontrado no ambiente tumoral do câncer de mama são os adipócitos. Há evidências que apoiam a associação do tecido adiposo

ao câncer como componente chave de progressão e carcinogênese do câncer de mama, além do colágeno VI (COLVI) expresso abundantemente e envolvido em progressão do tumor mamário *in vivo* (IYENGAR et al., 2005). O papel dos adipócitos associados ao câncer de mama pode explicar a obesidade como fator prognóstico negativo independente do estado da menopausa (LIGIBEL, 2011).

Com a nova abordagem de terapia personalizada para pacientes com câncer de mama, é importante explorar os vários tipos celulares e seus possíveis marcadores biológicos para melhor classificação dos pacientes em subtipos específicos e usar esses marcadores para prever a resposta terapêutica. Logo, características da interação entre células neoplásicas e estromais no microambiente do tumor podem ser úteis para a descoberta de potenciais marcadores e proporcionar impacto na terapia do câncer no futuro (YAN MAO et al., 2013).

2.3 Biomarcadores e glicosilação em CDIS

A imunohistoquímica (IHQ) é o conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes teciduais que funcionam como antígenos. Esta ligação antígeno-anticorpo permite situar e identificar a presença de várias moléculas nas células e tecidos (DEWAN et al., 2003). O valor prático desta técnica, muito utilizada em Anatomia Patológica, resulta da possibilidade de combinar um marcador com um anticorpo, sem provocar qualquer tipo de dano à ligação específica estabelecida. Este fato propicia a observação microscópica dos locais onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antígeno (BORGES, 2013).

Por meio da IHQ é possível avaliar a expressão e superexpressão de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) ou amplificação do receptor para fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 (HER2) em tecidos com câncer de mama (RATING, 2010). Esses marcadores são comumente usados para definição do tratamento e estabelecimento do prognóstico da doença, associados a variáveis clínicas e

patológicas, tais como o envolvimento linfonodal, tamanho do tumor, tipo histológico, grau do tumor e margens cirúrgicas (LLOYD *et al.*, 2010). Aproximadamente dois terços dos tumores da mama expressam RE e RP no núcleo da célula tumoral e, portanto, são candidatos à terapia antiestrogênica (DOWSETT *et al.*, 2006).

Outras proteínas são avaliadas pela IHQ como potenciais biomarcadores de prognóstico em CDIS (Ki67, p16, p21, p53, COX-2), incluindo aqueles que se mostram efetivos em doenças invasivas (PANG *et al.*, 2016). RE e RP são expressos em média em 68 e 60% das lesões CDIS, respectivamente, e estão correlacionados fortemente uns com os outros. Ambos estão associados a lesões melhor diferenciadas e correlacionados inversamente com a superexpressão de HER2 (LARI e KUERER, 2011). As lesões de CDIS positivas para RE têm uma probabilidade reduzida de recorrência (estimativa de risco 0,39, IC 95%: 0,18-0,86), no entanto, a expressão de RP não está associada a uma redução significativa no risco de recorrência (estimativa de risco 0,56, IC de 95% 0,25-1,24) (WANG SY *et al.*, 2011). Os tumores negativos para ER, PR e HER2 apresentam maior risco de recorrência (ZHOU W *et al.*, 2013).

Modificações do padrão glicosídico da superfície celular podem afetar as propriedades tanto de adesão e sinalização como modular a resposta provocada pelo sistema imune do organismo, e essas alterações estão diretamente ligadas ao processo carcinogênico. Isso tem sido demonstrado em vários cânceres e linhagens de células malignas, incluindo melanomas e câncer de mama (FERREIRA *et al.*, 2013). Assim os carboidratos e conseqüentemente a glicosilação, processo enzimático de formação de ligações glicosídicas entre sacarídeos e entre estes e proteínas ou lipídios (FUSTER e ESKO, 2005; MOREMEN *et al.*, 2012), têm sido investigados como biomarcadores.

Além de auxiliar a tumorigênese, a glicosilação aberrante também está associada à malignidade, interferindo de forma negativa nas interações com células efectoras imunes, angiogênese, potencial invasor capacidade metastática das células tumorais (MATTAINI e HEIDEN, 2012). Além disso, essas modificações podem ocorrer antes do processo de transformação

podendo ser de grande importância para o diagnóstico de vários tipos de câncer (DALL'OLIO *et al.*, 2012).

As glicoproteínas carregam um ou mais glicanos ligados covalentemente a um esqueleto polipeptídico por meio de ligações a átomos de nitrogênio ou oxigênio, gerando os N-glicanos ou O-glicanos, respectivamente (BENNETT *et al.*, 2012). Ambos os tipos de glicosilação podem coexistir na mesma proteína ou mesma célula. N-glicosilação consiste de uma cadeia de oligossacarídeos N-ligados ligados à asparagina contida na sequência asparagina (Asn)-X-serina/treonina (Ser/Thr), onde X é qualquer aminoácido exceto prolina (Pro). Em raros casos, a sequência Asn-X-cisteína (Cys) é possível. A N-glicosilação requer a produção de um precursor de oligossacarídeos, que é transferido em bloco para proteínas nascentes no retículo endoplasmático. Em proteínas, ela ocorre em dois distintos compartimentos celulares: no retículo endoplasmático e no Complexo de Golgi. No primeiro, um núcleo de oligossacarídeos, composto de três Glc, nove manoses (Man) e duas N acetilglucosaminas (GlcNAc), é montado em um lipídeo transportador, o dolicolpirofosfato, e posteriormente, transferido para resíduos selecionados de aminoácidos de cadeias polipeptídicas nascentes (REIS *et al.*, 2010).

A O-glicosilação é o outro tipo de glicosilação encontrada em glicoproteínas e consiste em um glicano O-ligado a um resíduo de serina ou treonina. A frequência de O-glicosilação em glicoproteínas é elevada, particularmente em mucinas secretadas ou ligadas à membrana, já que são ricas em Ser e Thr (REIS *et al.*, 2010).

Dentro das alterações moleculares mais notórias das células cancerosas, destaca-se o aumento da exposição de resíduos de carboidratos produzidos pelas N- e O- glicosilações incompletas que, durante o alongamento da cadeia sacarídica, formam glicoconjugados truncados (REIS *et al.*, 2010). No câncer de mama, o N-glicano fucosilado foi encontrado como um marcador potencial, mas também houve um aumento no tipo de *high* mannose nos N-glicanos e fucosilação em O-glicanos (PINHO *et al.*, 2012; TRAN e TEM HAGEN, 2013). Pierce e colaboradores (2010) em seu estudo, afirmaram que a combinação dos níveis de glicanos foi significativamente maior em pacientes com câncer de mama linfonodos positivos comparados com os com linfonodos

negativos, indicando o potencial maligno da expressão alterada destes carboidratos.

Apesar da importância da glicosilação na doença e transformação maligna ser conhecido desde a década de 60, seu papel em tais processos tem somente sido incipientemente explorado deixando o conhecimento disponível escasso e longe de ser completo (POTAPENKO *et al.*, 2010). As glicosiltransferases representam uma fonte promissora de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos no câncer, permitindo de forma mais precisa a distinção entre os tipos de lesão, a detecção precoce da doença bem como a prevenção de uma possível progressão e metástase do tumor. Em adição, biomarcadores exclusivos para cânceres de mama são pouco descritos, fazendo-se necessário o estudo mais aprofundado do seu processo de glicosilação (MEANY e CHAN *et al.*, 2011).

As galectinas podem ser utilizadas como biomarcadores, são proteínas da família das lectinas animais que apresentam uma sequência permanente de domínio de reconhecimento de carboidratos de aproximadamente 130 aminoácidos e possuem afinidade por galactosídeos presentes nas células normais e tumorais. Esta interação lectina-células está envolvidas em variados processos biológicos nos organismos tais como controle do ciclo celular, resposta imune, adesão celular, apoptose e metástase (FUKUMORI *et al.*, 2007). Estas proteínas se ligam especificamente a proteínas da matriz como a laminina, fibronectina e vitronectina bem como a integrinas de superfície através de ligações carboidratos dependentes (ELOLA *et al.*, 2005).

Como ferramentas sensíveis, estáveis e de fácil utilização, as galectinas estão sendo largamente utilizadas para reconhecer alterações nas superfícies de células tumorais. Essas alterações estão associadas ao crescimento celular, à indução de apoptose e metástase devido ao seu envolvimento na angiogênese, na interação com a matriz extracelular e na disseminação hematogênica (DUMIC *et al.*, 2006).

A galectina-1 é uma proteína homodimérica não covalente de 14kDa, composta por dois domínios de reconhecimento de carboidratos de cerca de 130 aminoácidos, capazes de identificar uma gama de glicoproteínas ou glicolípídeos. Suas funções dependem da ligação que estabelecem com receptores específicos (DING *et al.*, 2009). Esta lectina encontra-se expressa

em diversos tecidos normais e patológicos, sugerindo assim, ser funcionalmente polivalente, já que desempenha uma vasta gama de atividades biológicas (SAUSSEZ *et al.*, 2007), tais como regulação da proliferação e diferenciação celular e apoptose, mediando a transformação e crescimento tumoral (DING *et al.*, 2009).

A galectina-3, um produto gênico quimérico de 31 kDa, é uma lectina extracelular e intracelular, que interage com glicoproteínas da matriz extracelular (GONG *et al.*, 1999). Está envolvida em uma série de eventos fisiológicos e patológicos. Estruturalmente consiste de três domínios: a) um domínio terminal NH₂ de 12 aminoácidos, que representa um local de fosforilação sérica que é importante para a regulação da sinalização celular; b) uma sequência repetida tipo colágeno, o qual é rica em glicina, prolina e tirosina; c) e um domínio de COOH – terminal (BALAN *et al.*, 2010; JOHN *et al.*, 2003). O papel biológico de Gal-3 é definido pela sua localização em compartimentos intracelulares ou como parte do microambiente. Portanto, ora tem função como mediador intracelular, ora como sinal extracelular (DUMIC *et al.*, 2006).

A lectina *Ulex europaeus* agglutinin-I (UEA-I) se liga especificamente a resíduos de α -L-fucose presentes em glicoproteínas e glicolípídeos. A UEA-I é uma metaloglicoproteína homodimérica. Cada uma de suas sub-unidades tem peso molecular de aproximadamente 27 kDa (AUDETTE *et al.*, 2000). Em processos nos quais ocorre alteração da glicosilação, resíduos terminais de fucose, aos quais a UEA-I se liga, podem ser expressos em cadeias de carboidratos, seja pela adição de resíduos de fucose ou pela perda de açúcares de outros terminais (OKAZAKI *et al.*, 2004).

A Concanavalina (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Fabacea), foi a primeira lectina a ser isolada e ter sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas por cristalografia de raios-X. A ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica, e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos. Muitos estudos fizeram desta proteína a lectina de planta melhor caracterizada do ponto de vista bioquímico, biofísico e estrutural (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; BOEHM; HUCK, 1998; CAVADA *et al.*, 2001; SHARON; LIS, 2003; FAY; BOWIE, 2006; GEMEINER *et al.*, 2009).

Nesse contexto, a lectina Con A tem sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (HELMHOLZ *et al.*, 2003). Considerando a capacidade dos carboidratos em influenciar diversos fenômenos fisiológicos e patológicos nas células (BLOEM *et al.*, 2013; BORN *et al.*, 2013), é possível entender que proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos de forma específica e seletiva, podem se tornar importantes para o desenvolvimento e modulação de eventos como comunicação, diferenciação e proliferação celular.

Neste estudo foram avaliadas características do estroma tumoral de CDIS referentes à expressão de carboidratos, galectinas e receptores hormonais além de verificada a correlação com fatores prognósticos bem estabelecidos como idade, tamanho tumoral e subtipos histológico. Partiu-se do pressuposto que a expressão diferencial de biomarcadores estromais podem fornecer informações adicionais para o entendimento dessa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Identificar o estroma tumoral do carcinoma ductal *in situ* (CDIS) mamário humano por meio da análise da expressão de carboidratos, receptores hormonais e galectinas.

3.2 Específicos:

- Classificar o estroma tumoral das amostras de tecido mamário humano transformado (CDIS), em desmoplásico, inflamatório ou normal;
- Determinar a expressão estromal dos seguintes carboidratos: metil- α -D-manose e α -L-fucose, usando histoquímica com lectinas com as sondas Con A e UEA-I, respectivamente;
- Determinar, por imunohistoquímica, a marcação estromal para os receptores de estrógeno e progesterona e as Galectinas 1 e 3;
- Correlacionar, por meio da regressão logística, os dados clínicos patológicos com os achados experimentais.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras de tecidos e dados clínico patológicos:

As amostras de fragmentos teciduais de mama utilizadas nesse estudo foram obtidas cirurgicamente por biópsia excisional, diagnosticados como Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS), do sexo feminino, pertencentes ao Arquivo de Lâminas Histopatológicas do Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os critérios de inclusão dos casos avaliados foram: cortes de tecidos com marcações para metil- α -D-manose e α -L-fucose (ambos carboidratos), Galectina-3 e Galectina-1 (lectinas) e para Receptores de Estrógeno (RE) e Progesterona (RP). Os casos com ausência de qualquer destas marcações foram excluídos. Os dados clínico-patológicos utilizados foram idade, tamanho tumoral e expressão de RE e RP na lesão.

4.2 Histoquímica com Lectinas

Para análise da expressão de biomarcadores sacarídicos foram avaliadas amostras marcadas pelas lectinas Concanavalina A (Con A) e *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-I), conjugadas a peroxidase (Sigma, USA) que reconhecem (sondas) metil- α -D-manose e α -L-fucose, respectivamente.

4.3 Imunohistoquímica

Amostras marcadas por imunohistoquímica para os receptores hormonais Estrógeno (RE) e Progesterona (RP) e para as Galectinas 1 e 3 foram avaliadas por meio do critério proposto por Sannino e Shousha (1994), descrito no tópico seguinte.

4.4 Análise Descritiva e Estatística

A análise de integridade estromal foi realizada em todo o campo tecidual. O estroma das amostras analisadas foi classificado também com base nos

critérios histológicos em: desmoplásico - quando apresentava deposição de colágeno e conseqüente desorganização da região estromal de acordo com Walker (2001), inflamatório - quando apresentou infiltrado inflamatório segundo Conklin e Keely (2012) e normal - quando não apresentava nenhuma alteração. Posteriormente, os cortes de tecidos foram avaliados em três campos (0,5cm²) aleatórios do estroma, seguindo o critério de cruces proposto por Sannino e Shousha (1994), no qual se leva em consideração a intensidade da marcação e o número de células marcadas. Foram considerados positivos os casos com 2 ou 3 cruces, e negativos os casos com nenhuma ou apenas uma cruz. A intensidade da marcação foi classificada da seguinte forma: ausente (0) – casos negativos sem marcação nenhuma, marcação leve (1+), marcação moderada (2+) e marcação forte (3+). Em seguida, foi feita uma média desses três campos e classificação final da marcação no estroma como positiva ou negativa para posterior comparação com os dados clínico-patológicos das pacientes. Para detalhamento e organização dos resultados foi utilizado o programa Stata 14 na função de proporção logit.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão estromal de carboidratos e relação com o tipo de estroma

De um total de 62 casos de CDIS, 17 atenderam ao critério de inclusão do estudo. A Tabela 1 apresenta os resultados da marcação estromal usando as lectinas Con A e UEA-I e Gal-1 e Gal-3.

Tabela 1. Resultado da histoquímica com lectinas (Con A e UEA-I) e Imunohistoquímica (Anti-Gal-1 e 3) para marcação estromal em amostras de CDIS

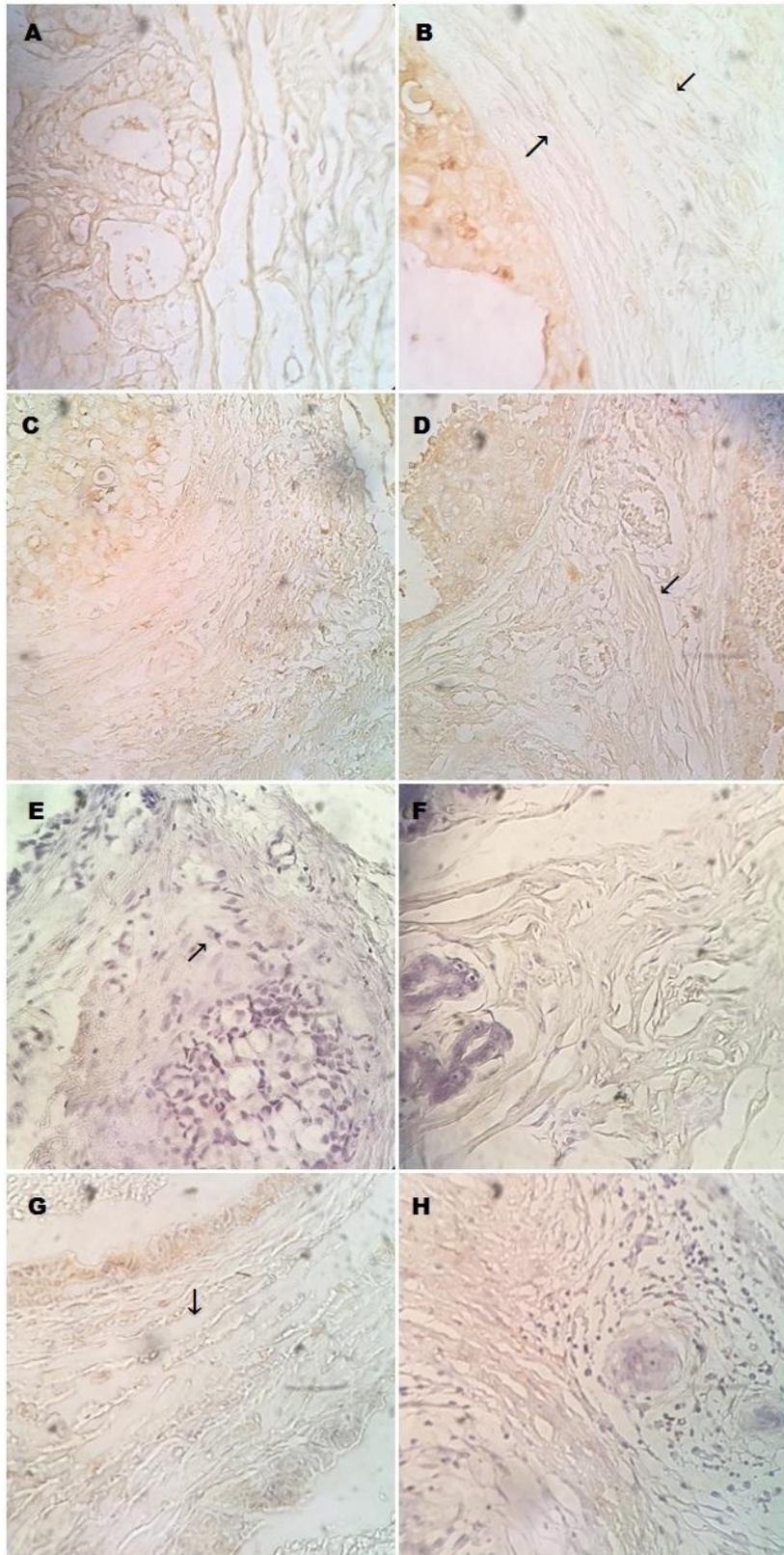
Intensidade da marcação	Con A	UEA-I	Gal-1	Gal-3	TOTAL
Ausente	0 (0,0%)	2 (11,8%)	1 (6,0%)	2 (11,8%)	5 (7,5%)
Leve	6 (35,3%)	11(64,6%)	3 (17,6%)	6 (35,3%)	26 (38,2%)
Moderada	9 (52,9%)	3 (17,6%)	10 (58,8%)	9 (52,9%)	31 (45,5%)
Forte	2 (11,8%)	1 (6,0%)	3 (17,6%)	0 (0,0%)	6 (8,8%)

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos casos analisados segundo o tipo estromal. Com relação à classificação quanto ao tipo de estroma, a maioria dos casos foi classificado como desmoplásico, seguido por um caráter inflamatório. Nenhuma amostra foi considerada normal. A principal característica observada foi uma grande desorganização do estroma e deposição de colágeno nas regiões próximas a lesão (peri-lesão). Destaca-se que exceto para a marcação com Gal-1, o tipo desmoplásico demonstrou uma maior positividade para a marcação com as lectinas utilizadas nesse estudo, contudo, não houve diferença entre este tipo e o perfil inflamatório.

Tabela 2. Classificação do estroma segundo marcação para cada lectina

Tipo de estroma	Con A	Gal-1	Gal-3	UEA-I
Desmoplásico	10 (58,8%)	8 (47%)	10 (58,8%)	9 (53%)
Inflamatório	7 (41,2%)	9 (53%)	7 (41,2%)	8 (47%)
Normal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Figura 1. Histoquímica com Lectinas para Con A e UEA-I (A, B, C e D) e Imunohistoquímica contra Galectina-1 e -3 (E, F, G e H).



A e B: marcação com UEA-I para α -L-fucose; C e D: marcação com Con A para metil- α -D-manose; E e F: marcação para Gal-1; G e H: marcação para Gal-3. As setas indicam a desorganização estromal. **Ampliação: 40x** Fonte: próprio autor.

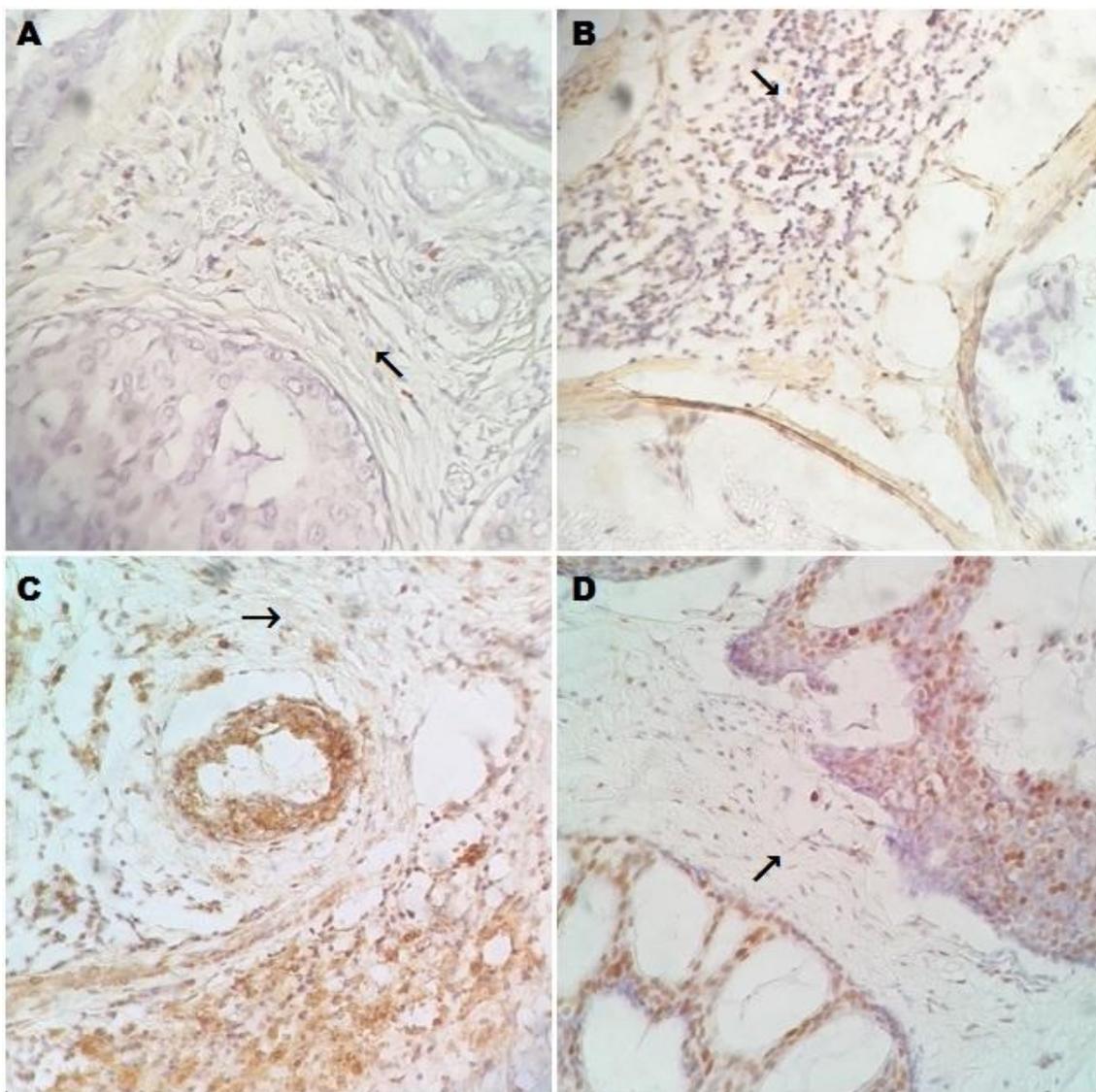
5.2 Marcação estromal para receptores de estrogênio e progesterona

A marcação estromal para RE e RP foi observada em 58,8% dos casos analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da imunohistoquímica para RE e RP

Marcação Estromal	RE	RP	TOTAL
Positiva	8 (47%)	12 (70,5%)	20 (58,8%)
Negativa	9 (53%)	5 (29,5%)	14 (41,2%)

Figura 2. Marcação imunohistoquímica anti-Receptores de Estrógeno e Progesterona.



A e B: Receptor de Estrógeno. C e D: Receptor de Progesterona. As setas indicam a marcação na região estromal e presença de infiltrado inflamatório (em B). **Ampliação: 40x** Fonte: próprio autor.

5.3 Correlação da expressão de carboidratos e dados clínico-patológicos

A Tabela 4 demonstra a distribuição da marcação no estroma para cada carboidrato avaliado segundo os seguintes dados clínico-patológicos: idade, tamanho tumoral, positividade ou negatividade para receptores de estrógeno e progesterona.

Tabela 4. Distribuição da marcação estromal por histoquímica com lectinas (Con A e UEA-I) e imunohistoquímica (Anti-Gal-1 e anti-Gal-2) com os dados clínico-patológicos

Dados clínico-patológicos	Con A ⁺ n(%)	Con A ⁻ n(%)	UEA-I ⁺ n(%)	UEA-I ⁻ n(%)	Gal-1 ⁺ n(%)	Gal-1 ⁻ n(%)	Gal-3 ⁺ n(%)	Gal-3 ⁻ n(%)
Idade (anos)								
<50	6 (35,3)	1 (5,9)	2 (11,8)	5 (29,4)	6 (35,3)	1 (5,9)	4 (23,5)	3 (17,7)
>50	5 (29,4)	5 (29,4)	2 (11,8)	8 (47)	7 (41,2)	3 (17,6)	5 (29,4)	5 (29,4)
Tamanho (cm)								
<2.0	0 (0)	1 (5,9)	1 (5,9)	0 (0)	1 (5,9)	0 (0)	1 (5,9)	0 (0)
2.0 – 5.0	7 (41,2)	4 (23,5)	1 (5,9)	10 (58,8)	7 (41,2)	4 (23,5)	4 (23,5)	7 (41,2)
>5.0	4 (23,5)	1 (5,9)	2 (11,8)	3 (17,6)	5 (29,4)	0 (0)	4 (23,5)	1 (5,9)
RE								
Positivo	6 (35,3)	2 (11,8)	2 (11,8)	6 (35,2)	6 (35,2)	2 (11,8)	5 (29,4)	3 (17,7)
Negativo	5 (29,4)	4 (23,5)	2 (11,8)	7 (41,2)	7 (41,2)	2 (11,8)	4 (23,5)	5 (29,4)
RP								
Positivo	7 (41,2)	5 (29,4)	2 (11,8)	10 (58,8)	9 (52,9)	3 (17,7)	8 (47,1)	4 (23,5)
Negativo	4 (23,5)	1 (5,9)	2 (11,8)	3 (17,6)	4 (23,5)	1 (5,9)	1 (5,9)	4 (23,5)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona

Com relação a idade, houve prevalência de casos com idade maior que 50 anos, onde se observou maior marcação positiva para Gal-1 (41,2%) e negativa para o carboidrato metil- α -D-manose (47%). Com relação ao tamanho tumoral, houve uma prevalência maior tanto de casos positivos quanto de casos negativos com tamanho entre 2 e 5 cm.

No que diz respeito a expressão de RE e RP, observou-se uma quantidade maior de casos negativos para o estrógeno e uma quantidade de maior de casos positivos para a progesterona. Os casos que mais se destacaram foram os considerados positivos para a expressão de Gal-1 (41,2%) e os casos negativos para a marcação do carboidrato metil- α -D-manose no estroma (41,2%), ambos foram considerados negativos para receptores de estrógeno. Além disso, as amostras consideradas negativas para a marcação de metil- α -D-manose no estroma, apresentaram a maior quantidade de casos positivos para receptor de progesterona (58,8%).

Os dados obtidos pelo Stata 14 por meio da proporção logística tentaram identificar alguma relação entre a positividade ou negatividade da marcação para cada uma das lectinas do estudo com os dados clínico patológicos disponibilizados (idade, tamanho tumoral, positividade e negatividade para receptores de estrógeno e progesterona), no entanto não apresentaram resultados significativos.

6 DISCUSSÃO

O estroma tumoral é um dos atores do cenário neoplásico que desempenham papel fundamental numa relação de retroalimentação com as células tumorais para aquisição e manutenção dos *hallmarks* do câncer (HANAHAN E WEINBERG, 2011). Por isso, é imprescindível entender as características e analisar, de várias perspectivas, as células e constituintes extracelulares estromais visando à obtenção de informações da biologia do câncer.

Em nosso estudo, houve uma predominância do tipo desmoplásico de estroma, seguido por um caráter inflamatório. Desde a década de 1950, pesquisadores já tinham interesse sobre a desmoplasia (JACKSON e ORR, 1957; BARSKY *et al.*, 1982; DVORAK, 1986; PERES *et al.*, 1987). Jackson e Orr (1957) desenvolveram estudos que propunham esse fenômeno como resultado da condensação do colágeno pré-existente. Em 1982, Barsky *et al.*, já tinham boas evidências de que o colágeno era sintetizado por miofibroblastos. Vários mecanismos que resultaram em ativação de miofibroblastos e síntese de colágeno foram sugeridos. Estes incluem mecanismos de citocinas do sistema imune e lesões microvasculares (DVORAK *et al.*, 1981; BARSKY *et al.*, 1982; DVORAK, 1986; PERES *et al.*, 1987) com características análogas à cicatrização de feridas (DVORAK, 1986) e ativação parácrina de miofibroblastos por fatores de crescimento liberados por células tumorais (PERES *et al.*, 1987).

O colágeno do tipo V pode constituir uma barreira natural que inibe a atividade proliferativa/ invasiva de células de câncer da mama e resultar em morte destas células. Adipócitos são um dos citotipos mais abundantes do estroma mamário tumoral responsáveis pela secreção de quantidade considerável de colágeno tipo VI. Estudos realizados em roedores e confirmados na linha celular humana MCF-7 demonstraram que o colágeno de tipo VI, estimula a proliferação de células cancerosas (LUPARELLO C, 2013).

A resposta imunológica do hospedeiro ao câncer ganhou importância por causa de avanços recentes na imunoterapia. Há evidências de que infiltrados de células imunes e inflamatórias influenciam na biologia e no desenvolvimento clínico do câncer de mama. No entanto, a função prognóstica e preditiva das

células imunes difere entre subtipos de câncer de mama. A forte associação entre infiltração linfocítica e melhoria nos resultados (incluindo maior sensibilidade à quimioterapia) nos cânceres triplo negativo e HER2 positivos também levanta novas opções terapêuticas que visam o aumento da atividade das células imunes. Os marcadores imunes servem como preditivos para selecionar pacientes para regimes imunoterapêuticos (por exemplo, inibidores do ponto de controle) (KARN T *et al*, 2015).

Um número crescente de trabalhos tem demonstrado que os carboidratos da superfície celular são modificados durante as transformações malignas, em tumores de células diferenciadas e metástases (XU *et al.*, 2000). Conseqüentemente, as proteínas ligantes de carboidratos da superfície celular (lectinas endógenas) sofrem modificações tanto funcionais quanto na sua estrutura molecular (SHINAGAWA E ANDERSON, 2000).

Nossos resultados mostram que o carboidrato que apresentou uma expressão maior foi o metil- α -D-manose, seguido pelo α -L-fucose. Os resíduos de carboidratos em cadeias de glicanos podem ser detectados *in situ* por meio de histoquímica com lectinas. As lectinas reconhecem de modo específico carboidratos em seções de tecido. Quando combinado com pré-tratamentos de deglicosilação, a histoquímica de lectinas também pode fornecer informações sobre a natureza da cadeia de glicano (BROOKS e HALL, 2012). A expressão do L-fucose foi detectada no presente estudo e como se sabe, os glicanos fucosilados já foram associados na patogênese de várias doenças humanas. Muitos exemplos de glicosilação alterada em câncer envolvem oligossacarídeos contendo fucose (BECKER DJ e LOWE JB, 2003). Foram observadas alterações por Beltrão *et al.*, (1998) de tecido mamário quanto a expressão de glicose/manose, notou-se que, na doença fibrocística (hiperplasia intraductal e fibroadenoma) e tecidos de mama com Carcinoma Ductal Invasivo (CDI), sofrem mudanças em relação ao seus açúcares em glicoconjugados de membrana.

O glicocódigo do estroma tumoral de vários cânceres ainda não foi elucidado, incluindo o CDIS. Além disso, informações sobre a expressão estromal de biomarcadores tumorais bem estabelecidos podem ser valiosas para a composição do mosaico da biologia do câncer. Exemplo desses marcadores são os RE e RP que auxiliam na escolha da terapia adjuvante em

pacientes com câncer de mama. Os tumores receptores positivos podem ser responsivos a terapia antiestrogênica, enquanto que os negativos são insensíveis. O tamoxifeno se liga ao RE α e inibe o crescimento nas células tumorais, o que reduz de forma significativa a recidiva tumoral e prolonga a sobrevida nos pacientes com carcinoma invasivo da mama (DAABS, 2012).

Avanços em glicotecnologia permitem a identificação de carboidratos que possam ser utilizados como marcadores tumorais. Esta busca objetiva criar uma marca de identificação celular e também responder a uma das grandes questões que são abordadas no estudo do câncer, que é o porquê de determinado (s) açúcar (es) específico (s) alterar (em) o seu conteúdo nas células.

Merlino e colaboradores (2017) desenvolveram um estudo na tentativa de construir assinaturas específicas para o câncer de mama de subtipos derivadas de um modelo *in vitro* reproduzindo modificações de células tumorais após a interação com células estromais ativadas ou normais. Os pacientes foram classificados como microambiente-positivo, isto é, com tumores com perfis moleculares que sugerem ativação pelo estroma ou negativo. Notou-se que pacientes com tumores receptores de estrógeno alfa positivos, HER2 negativos e com microambiente positivos, foram caracterizados por um risco 2,5 vezes maior de desenvolver metástases à distância. As assinaturas de genes derivadas *in vitro* que rastreiam a interação bidirecional com fibroblastos ativados pelo câncer são subtipo específico e adiciona informações prognósticas independentes a variáveis prognósticas clássicas em mulheres com tumores ER + / HER2.

Dentre as galectinas estudadas, a galectina-1 foi a mais expressa (76,4%), esta relaciona-se a uma série de eventos biológicos como no sistema imune, no qual a mesma altera a homeostase das células T modulando a produção de citocinas, proliferação celular e apoptose. Está relacionada também com o desenvolvimento do sistema muscular e neural (YANG *et al.*, 2008) e na iniciação do fenótipo maligno de algumas neoplasias por meio da ligação provável ao oncogene H-RAS, promovendo sua ancoragem na membrana plasmática e a ativação da Raf-1 e da proteína quinase mitogênica 1 (MAPK1), cujo mecanismo está envolvido no processo da transformação neoplásica (CAMBY *et al.*, 2002; RABINOVICH, 2005). Além disso, a galectina-

1 atua, em geral, como um regulador negativo de respostas auto-imunes e inflamatórias (RUBINSTEIN *et al.*, 2007).

A galectina-3, alvo também do nosso estudo, é uma lectina extracelular e intracelular que interage com glicoproteínas da matriz extracelular. A mesma está envolvida em uma série de eventos fisiológicos e patológicos e possui um grande número de ligantes, incluindo IgE, laminina, antígenos embrionários carcinogênicos e mucina via beta-galactosídeos, refletindo assim sua multifuncionalidade. Além disso a galectina-3 pode ser expressa tanto em células tumorais, epiteliais e do sistema imunológico. Pesquisas têm mostrado que a galectina-3 é uma proteína oncogênica multifuncional e que regula a adesão, o crescimento e proliferação celular, bem como a angiogênese e apoptose, através da sua ligação a glicoproteínas, sendo assim um excelente alvo para o melhor entendimento desta doença (MORE *et al.*, 2015).

Embora nossos resultados não tenham sido significativos, eles corroboram a importância dos fatores estudados (idade, tamanho tumoral, expressão de RE e RP) como prognósticos. Segundo Panget *al.* (2016), no manejo de pacientes com CDIS, os médicos enfrentam a questão de recomendar ou não tratamento cirúrgico de radioterapia e / ou tamoxifeno. Para auxiliar nesta decisão, são considerados vários fatores, incluindo a idade do paciente, margens do tumor, grau e tamanho, mas a evidência para suportar esses e outros recursos potenciais como prognósticos é variável.

Shamliyan *et al.* (2010) em sua revisão sobre as características do paciente e do tumor associadas à recorrência local, encontraram: idade do paciente jovem (<40 anos) associada ao aumento do risco de recorrência em cinco ensaios clínicos randomizados e 51 estudos observacionais envolvendo um total de 173.937 Pacientes com CDIS. A alta densidade mamográfica (pelo menos 75% de densidade) tem sido associada a um risco relativo de 2,8 (IC 95% 1,3-6,1) para o desenvolvimento de recorrência local em pacientes tratados com cirurgia e radioterapia local (HABEL LA *et al.*, 2004).

Wang *et al.* (2011) realizaram uma metanálise abrangente das características do tumor de CDIS e sua relação com o risco de recorrência, cobrindo oito ensaios clínicos randomizados e 36 estudos observacionais. Esta metanálise relatou CDIS multifocal associada ao risco aumentado de recorrência ipsilateral em comparação com tumores unifocais (estimativa de

risco global 1,95, IC 95% 1,59-2,4063). Além disso, quando maior o tamanho do tumor maior o risco geral de recorrência em comparação com pequenos tumores (estimativa de risco 1,63, IC 95% 1,30 a 2,0663), embora o consenso sobre o que define um tumor pequeno ou grande não tenha sido alcançada.

Outras características histológicas associadas ao maior risco de recorrência local incluem a presença de necrose comedo (estimativa global de risco de 1,71, IC 95% 1,36-2,6666) e alta classe nuclear (estimativa de risco 1,81, IC 95% 1,53-2,1336) (WANG *et al.*, 2011). Outro parâmetro prognóstico utilizado é o status de margem, embora a definição de uma margem de excisão clara ou adequada varia. Dunne *et al.* (2009) extraíram dados sobre as margens de excisão de um total de 4.660 pacientes tratados com tumorectomia e radioterapia participantes de ensaios clínicos que examinaram o benefício da radioterapia em CDIS. A presença de células tumorais na margem de excisão ou dentro de 1 mm apresentou maior risco de recorrência em comparação com margens de pelo menos 5 mm. As margens de excisão de 2 mm conferiram menor risco de recorrência em comparação com margens de 1 mm e não foram associadas a uma diferença significativa no risco de recorrência em comparação com margens de 5 mm.

Os estudos sobre margem tumoral indicam que, embora o status da margem seja importante, a largura da margem requerida não é exata, dependendo muito do patologista e de outros fatores incontroláveis. Atualmente, não há consenso ou recomendação sobre a margem "adequada" além do mínimo de margens cirúrgicas não envolvidas e a adequação da largura da margem depende clinicamente de outras variáveis, como idade do paciente, tamanho e grau da lesão e intenção de tratar com radioterapia (PANG *et al.*, 2016).

A importância da avaliação precisa do tamanho do tumor de mama foi evidenciada em pacientes que recebiam quimioterapia neoadjuvante para o monitoramento da resposta terapêutica (HYLTON *et al.*, 2012). O tamanho tumoral foi apontado como único fator preditivo de recidiva distante após resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama operável ou localmente avançado (FEI *et al.*, 2015).

A idade é também um fator prognóstico para o câncer de mama e preditor independente dos subtipos tumorais (RE-positivo, RP-positivo, HER2-

positivo). Com o aumento da idade, os tumores são mais susceptíveis de serem RE-positivos (PARISE; BAUER; CAGGIANO, 2010). As mulheres jovens são mais propensas que as mulheres mais velhas, e as mulheres afro-americanas e hispânicas são mais propensas que as brancas a ter o subtipo ER- / PR- / HER2- ou triplonegativo (BAUER *et al.*, 2007; PARISE *et al.*, 2009).

As taxas de sobrevivência e recorrência no câncer de mama são variáveis que podem auxiliar para diagnósticos comuns e, portanto, os fundamentos biológicos da doença que determinam esses resultados ainda não foram totalmente compreendidos. Como resultado, a medicina translacional é uma das áreas de estudo de crescimento mais rápido na biologia do tumor. Com avanços em técnicas genéticas e de imagem, as biópsias arquivadas podem ser examinadas para fins diferentes do diagnóstico (CONKLIN MW, KEELY PJ, 2012)

Há uma grande evidência que aponta para o estroma como o principal regulador da progressão do tumor após os estágios iniciais da formação do tumor, e o mesmo também pode contribuir para fatores de risco que determinam a formação do tumor. Portanto, os aspectos da biologia do estroma são adequados para se concentrar nos estudos sobre o desfecho do paciente, onde as diferenças estatísticas na sobrevivência entre os pacientes fornecem evidências de que esse componente estromal é um sinal para a progressão tumoral (CONKLIN MW, KEELY PJ, 2012).

A ausência de informações posteriores sobre tratamento ou cura das pacientes do estudo não possibilitou um *follow-up*. Estudos mais complexos, incluindo assim o acompanhamento completo das pacientes e um número maior de informações sobre os mesmos poderiam ajudar na identificação dos fatores que poderiam ou não influenciar na progressão deste subtipo de câncer de mama.

7 CONCLUSÃO

- O estroma tumoral da maioria das amostras de CDIS foi classificado como desmoplásico, seguido por um caráter inflamatório.
- O carboidrato que apresentou uma expressão maior foi o metil- α -D-manose, em que 11 amostras (64,7%) apresentaram marcação positiva, enquanto para o α -L-fucose apenas 4 (23,6%) foram positivas.
- A maioria dos casos analisados foi positiva para receptores de estrógeno e progesterona (58,8%). Dentre as galectinas estudadas, a galectina-1 foi a mais expressa (76,4%).
- As marcações estromais para os carboidratos estudados (metil- α -D-manose e α -L-fucose), bem como para a expressão das Galectinas 1 e 3 no estroma não mostraram correlação com os dados clínico patológicos (idade, tamanho tumoral, marcação para receptores de estrógeno e progesterona).

REFERÊNCIAS

ALLINEN M, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 6, n. 1, p. 17–32, 2004.

ALMEIDA JRC. Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade. São Paulo: **Atheneu**, p. 61-72, 2004.

AUDETTE GF, et al. The 2.2 Å resolution structure of the O(H)-blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, p. 423-433, 2000.

BECKER DJ, LOWE JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiol**, v. 13, n. 7, p. 42-53, 2003.

BELTRÃO EIC, et al. Binding evaluation de isoform Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. Appl **Biochem Biotechn**. v. 74, p. 125-134, 1998

BALAN V, et al. Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. **Biochim Biophys Acta**, v.1803, p. 198-205, 2010.

BARONDESSH, et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807–20810, 1994.

BARSKY SH, et al. Increased content of type V collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. **Am J Pathol**, v. 108, n.3, p. 276–283, 1982.

BENNETT EP, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiology**, v. 22, p. 736–756, 2012.

BERKSON J. Application to the logistic function to bio-assay. **Journal of the American Statistical Association**, v.39, n.227, p. 357-365, 1944.

BOCKSTAL MV, LIBBRECHT L. Changes in the periductal stroma of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast yield potential biomarkers for recurrence risk prediction. **Belgian Journal of Medical Oncology**, v. 9, n. 7, p. 296–298, 2015.

BOCKSTAL M. et al. Stromal architecture and periductal decorin are potential prognostic markers for ipsilateral locoregional recurrence in ductal carcinoma in situ of the breast. **Histopathology**, v. 63, n. 4, p. 520–533, 2013.

BOEHM S, HUCK S. Presynaptic inhibition by concavalin A: are alphasaturoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? **J Neurochem**, v. 71, n. 24, p. 21–30, 1998.

BORN JM. et al. Protein v. carbohydrate intake differentially affects liking- and wanting-related brain signalling. **British Journal of Nutrition**, v.109, n.2, p.376-381, 2013.

BORGES A. Imunohistoquímica. **Instituto Politécnico De Lisboa**, v. 1, p. 127, 2013.

BLOEM K. et al. Ligand Binding and Signaling of Dendritic Cell Immunoreceptor (DCIR) Is Modulated by the Glycosylation of the Carbohydrate Recognition Domain. **Plos One**, v.8, n.6, p.1-10, 2013.

BROOKS SA, HALL DM. Lectin histochemistry to detect altered glycosylation in cells and tissues. **Methods Mol Biol**, v. 878, p. 31–50, 2012.

BUITRAGO F. et al. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com. Ciências Saúde**, v. 22, Sup 1:S69-S82, 2011.

CAPELOZZI VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **J Pneumol**, v. 27, n. 6, p.21-28, 2001.

CAVADA BS. et al. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoidae. **Prep. Biochemical & Biotecnology**, v.30, n.4, p.271-280, 2001.

CONKLIN MW, KEELY PJ. Why the stroma matters in breast cancer Insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. **Cell Adhesion & Migration** 6:3, 249–260; May/June 2012;

COTE RJ, TAYLOR CR. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. 2th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. **Major problems in pathology**, vol. 19, 1994.

CUZICK J. et al. Effect of tamoxifen and radiotherapy in women with locally excised ductal carcinoma in situ: Long-term results from the UK/ANZ DCIS trial. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 1, p. 21–29, 2011.

CHOI Y P. et al. Cancer-associated fibroblast promote transmigration through endothelial brain cells in three-dimensional in vitro models. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 9, p. 2024–2033, 2014.

DALL'OLIO. et al. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. **Front. Biosci**,v. 17, p. 670-699, 2012.

DEWAN MJ. et al. The use of antidepressants in the elderly: 1986 and 1989. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 5, n. 1, p. 40–44, 2003.

DING YM. et al. Increased expression of galectin-1 is associated with human oral squamous cell carcinoma development YU-MEI. **Oncology reports**, v. 21, p. 983–987, 2009.

DOCUMENT C.; CANCER, A.; MANUAL, S. **Invasive Breast Cancer**

Structured Reporting. [ROYAL COLLEGE OF PATHOLOGISTS OF AUSTRALASIA, 2012].

DOWSETT M. et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 17, n. 5, p. 818–826, 2006.

DUMIC J. et al. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, 2006.

DUNNE C. et al. Effect of margin status on local recurrence after breast conservation and radiation therapy for ductal carcinoma in situ. **J. Clin. Oncol**, v. 27, p. 1615–1620, 2009.

DVORAK HF. et al. Human breast carcinoma: fibrin deposits and desmoplasia. Inflammatory cell type and distribution. Microvasculature and Infarction. **J Natl Cancer Inst**, v. 67, p. 335–345, 1981.

DVORAK HF. Tumours: wounds that do not heal. Similarities between tumour stroma generation and healing. **N Engl J Med**, v. 315, p. 1650–1659, 1986.

EGEBLAD M. et al. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Dev. Cell**, v. 18, p. 884–901, 2010.

ELDER D. et al. Laboratory Methods. In: **Lever's Histopathology of the skin**. Capítulo 4, 8a Edição, Lippincott-raven (Ed.) New York, 1073pp, 1997.

ELOLA MT. et al. Galectin-1 receptors in different cell types. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, n. 1, p. 13–29, 2005.

FAY AM; BOWIE D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **The Journal of Physiology**, v.572, n.1, p.01–13, 2006.

FEI F. et al. Tumour size is the only predictive factor of distant recurrence after pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with large operable or locally advanced breast cancers: A sub-study of EORTC 10994/BIG 1-00 phase III trial. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 3, p. 301–309, 2015.

FERREIRA SA. et al. Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. **Medical mol.Morphol**,v. 46, p. 198-202, 2013.

FISHER ER. et al. Pathologic variables predictive of breast events in patients with ductal carcinoma in situ. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 128, n. 1, p. 86–91, 2007.

FOLGUEIRA MAAK. et al. Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 921–929, 2013.

FUKUMORI T. et al. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 101–108, 2007.

FUSTER MM, ESKO JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 526–542, 2005.

FREEZE HH; AEBI M. Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. **Curr Opin Struct Biol**,v. 15, n. 5, p. 490-498, 2005.

FREEZE HH. Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. **J. Biol. Chem**,v. 288, p. 6936–6945, 2013.

GABIUS HJ. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. **Naturwissenschaften**,v. 87, n. 3, p. 08-21, 2000.

GABIUS HJ. et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code.**Trends Biochem Sci**,v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GABIUS HJ; WU AM. The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. **Chang Gung Med J**,v.29, n.1, p. 37-62, 2006.

GABIUS HJ. et al. Chemical biology of the sugar code. **Chembiochem**, v. 5, n. 6, p. 40-64, 2004.

GEMEINER P. et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/ clinical diagnostic. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, p.1-15, 2009.

GONG HC. et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Research**, v. 59, n. 24, p. 6239–6245, 1999.

GOODWIN A. et al. Post-operative radiotherapy for ductal carcinoma in situ of the breast. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 11, n. 11, p. CD000563, 2013.

GREENWOOD HI. et al. Ductal Carcinoma in Situ of the Breasts: Review of MR Imaging Features. **Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc**, v. 33, n. 6, p. 1569–1588, 2013.

HABEL LA. et al. Mammographic density and breast cancer after ductal carcinoma in situ. **J. Natl Cancer Inst**, v. 96, p. 1467–1472, 2004.

HAMMOND ME. et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of

estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, p. 2784–95, 2010.

HANAHAN D; WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

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

HELMHOLZ H. et al. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, v.1006, n. (1-2), p.127-135, 2003.

HYLTON N M. et al. Locally Advanced Breast Cancer: MR Imaging for Prediction of Response to Neoadjuvant Chemotherapy--Results from ACRIN 6657/I-SPY TRIAL. **Radiology**, v. 263, n. 3, p. 663–672, 2012.

ISKRATSCH T. et al. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**. v. 386, n. 2, p. 133–146, 2009.

JACKSON JG; ORR JW. The ducts of carcinomatous breasts with particular reference to connective tissue changes. **J Pathol Bacteriol**, v. 74, p. 265–273, 1957.

JOHN CM. et al. Truncated galectin-3 inhibits tumor growth and metastasis in orthotopic nude mouse model of human breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, p. 2374-2383, 2003.

KARNOUB AE; WEINBERG RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Dis**,v. 26, p. 75–85, 2007.

KARN T. et al. The Influence of Host Factors on the Prognosis of Breast Cancer: Stroma and Immune Cell Components as Cancer Biomarkers. **Curr Cancer Drug Targets**. v. 15, n. 8, p. 652-664, 2015.

KESSENBROCK K. et al. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, p. 52–67, 2010.

LARI SA; KUERER HM. Biological markers in DCIS and risk of breast recurrence: a systematic review. **J. Cancer**, v. 2, p. 232–261, 2011.

LEFFLER H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconj J**, v. 19, p. 433-440, 2004.

LUPARELLO C. Aspects of Collagen Changes in Breast Cancer. **J Carcinogene Mutagene**, S13: 007. doi:10.4172/2157-2518.S13-007, 2013.

LLOYD MC. et al. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it?. **Journal of pathology informatics**, v. 1, p. 29, 2010.

MAN YG; SANG QXA. The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: A paradigm shift from the “protease-centered” hypothesis. **Experimental Cell Research**, v. 301, n. 2, p. 103–118, 2004.

MATTAINI RK; HEIDEN MG. Glycosylation to Adapt to Stress. **Sci**, n. 337, p. 925-926, 2012.

MATTOS LL, et al. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arq méd ABC**, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2005.

MEANY DL; CHAN DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clin Prot**, v. 8, p. 7, 2011.

MERLINO G. et al. Prognostic and functional role of subtype-specific tumor-stroma interaction in breast cancer. **Mol Oncol.** 2017

MILLS SE. Histology for Pathologists. 3 ed. New York: Lippincott Williams's e Wilkins, 1272 p., 2007.

MOREMEN KW. et al. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 448–462, 2012.

MORE. et al. N-glycans and metastasis in galectin-3 transgenic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, p. 302-307, 2015.

OSTMAN M; AUGSTEN M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. **Curr. Opin. Genet.**, v. 19, p. 67–73, 2009.

OKAZAKI. et al. Difference in *Ulex europaeus* agglutinin I binding activity of decay-accelerating factor detected in stools of patients with colorectal cancer and ulcerative colitis. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 143, n. 3, p. 169-174, 2004.

PANG. et al. Ductal carcinoma *in situ* - update on risk assessment and management. **Histopathology**, v. 68, n. 1, p. 96–109, 2016.

PERES R. et al. Frequent expression of growth factors for mesenchymal cells in human mammary carcinoma cell lines. **Cancer Res**, v. 47, p. 425– 3429, 1987.

PIERCE et al. Levels of specific glycans significantly distinguish lymph node-positive from lymph node-negative breast cancer patients. **Glycobiol.**, v. 20, n. 10, p. 1283–1288, 2010.

PINHO SS; REIS CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 540–555, 2015.

PINHO. et al. Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin Nglycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions. **PLoS ONE**, n. 7, v. 3, p. 33191, 2012.

PONTI A. et al. International variation in management of screen-detected ductal carcinoma in situ of the breast. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 15, p. 2695–2704, 2014.

POTAPENKO IO. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Mol Oncol**, v. 4, p. 98-118, 2010.

QIAN BZ; POLLARD JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**,v. 141, p. 39–51, 2010.

RABINOVICH GA. et al. An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons form experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. **Scand J Immunol**,v. 66, p. 143-58, 2007.

RAKHA EA. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p. 25-32, 2007.

RATING D. Journal Club. **Zeitschrift fur Epileptologie**, v. 23, n. 1, p. 53–55, 2010.

REIS CA. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J Clin Pathol**, v. 63, n. 4, p. 322-329, 2010.

RONNOV JL; PETERSEN OW. Induction of α -smooth muscle actin by transforming growth factor- β 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. **Lab Invest**,v. 68, p. 696–707, 1993.

RUBINSTEIN N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: a potential mechanism of tumor immune privilege. **Cancer Cell**,v. 5, p. 241-251, 2004.

RUDNICK JA; KUPERWASSER C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 29, p. 663–672, 2012.

RUFFELL B. et al. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 8, p. 2796–2801, 2012.

SALLES MA. et al. Abordagem atual do carcinoma ductal *in situ* da mama. **FEMINA**,v. 35,n. 1, 2004.

SALLES MA. et al. Variação inter-observador no diagnóstico histopatológico do carcinoma ductal *in situ* da mama. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n.1, p. 1-6, 2005.

SANNINO P; SHOUSHA S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave ove processing. **J Clin Pathol**, v. 47, p. 90-92, 1994.

SAUSSEZ S. et al. GALECTINS AS MODULATORS OF TUMOR PROGRESSION IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS. **Wiley InterScience**, v. 36, n. 10, p. 1391, 2007.

SILVEIRA AS. Câncer ginecológico: Diagnóstico e tratamento. In: Gil RA. Fatores prognósticos, preditivos e marcadores tumorais no câncer ginecológico. Florianópolis: UFSC; 2005:135-52.

SHAMLIYAN T. et al. Association between patient and tumor characteristics with clinical outcomes in women with ductal carcinoma *in situ*. **J. Natl Cancer**,p. 121–129, 2010.

SHARON N. Lectins: carbohydrates-specific reagents and biological recognition molecules. **J Biol Chem**,v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

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

SHEKHAR MPV. et al. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: Implications for tumor development and progression. **Cancer Research**, v. 61, n. 4, p. 1320–1326, 2001.

SHINAGAWA K; ANDERSON GP. Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. **J. Immunol. Meth.**v. 237, p. 65-72, 2000.

SPICER SS; SCHULTE BA. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: A perspective. **J. Histochem. Cytochem.**v. 40, n. 1, p. 1-38, 1992.

TRAN DT; TEN HAGEN KG. Mucin-type O-glycosylation during development. **J Biol Chem**, v. 288, n. 10, p. 6921-6929, 2013.

TRUE L; NELSON PS. promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. v. 18, n. 9, p. 1359–1368, 2013.

VIRNIG BA. et al. Ductal Carcinoma In Situ : Risk Factors and Impact of Screening. **J Natl Cancer Inst Monogr**,v. 41, p. 113-116, 2010.

VIALE G. et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **Journal of Clinical Oncology**,v. 25, p. 3846–3852, 2007.

VOLINIA S. et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 8, p. 3024–3029, 2012.

WALKER R A. The complexities of breast cancer desmoplasia. **Breast Cancer Res**, v. 3, p. 143–145, 2001.

WANG LX; HUANG W. Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. **Curr Opin Chem Biol**, v. 13, p. 592-600, 2009.

WANG SY. et al. Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. **Breast Cancer Res. Treat**, v. 127, p. 1–14, 2011.

XU XC. et al. Differential binding activities of lectins and neoglycoproteins in human testicular tumors. **Urol. Res**, v. 28, n. 1, p. 62-68, 2000.

YAN MAO. et al. Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 0, p. 303–315, 2013.

ZHANG W. et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 13, p. 3420–3430, 2010.

ZHOU W. et al. Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. **BMC Cancer**, v.13, 2013.