

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTROMA TUMORAL NA PROGRESSÃO DO
CARCINOMA DUCTAL IN SITU**

Recife
2018

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTROMA TUMORAL NA PROGRESSÃO DO
CARCINOMA DUCTAL IN SITU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de concentração Biologia Celular e Molecular Humana, 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

**Recife
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Geilza Carla de Lima

Avaliação da influência do estroma tumoral na progressão do carcinoma ductal in situ / Geilza Carla de Lima Silva. – 2018.

86 f. : il.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão.

Coorientador: Sinara Mônica Vitalino de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Mamas – Câncer I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Almeida, Sinara Mônica Vitalino de (coorientadora) III. Título.

616.99465
156

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 -

GEILZA CARLA DE LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTROMA TUMORAL NA PROGRESSÃO DO
CARCINOMA DUCTAL IN SITU**

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

Aprovada em: 09/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Sinara Mônica Vitalino de Almeida
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE
Universidade de Pernambuco – UPE (*Campus* Garanhuns)

Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima
Universidade de Pernambuco – UPE (*Campus* Garanhuns)

À minha mãe, **Maria Betânia de Lima Silva**. Quem me gerou em seu ventre, me deu à luz e cuidou de mim, incondicionalmente. Fez de mim sua prioridade, em todos os aspectos. Reconheço que qualquer coisa que eu faça em vida jamais chegará aos pés do que você fez/faz/fará por mim. Dedico essa dissertação pelo câncer de mama superado, por cada lágrima, por cada insegurança, por cada dor, por cada sessão de quimioterapia, por cada fio de cabelo que vi cair, por cada enjôo, por cada efeito colateral do tamoxifeno, por cada noite que chorei escondida, por toda responsabilidade que assumi ainda adolescente, e por tudo que enfrentamos, JUNTAS. Eu te amo, eternamente!

Ao meu amor mais precioso,
DEDICO.

Ao meu padrinho, **Adelton Cosme do Nascimento** (*in memoriam*), fonte de inspiração e exemplo de humanidade, bondade, caridade e amparo. Tenho a certeza de que o câncer nos tirou a oportunidade de conviver com alguém tão sublime, mas garantiu aos céus a presença de mais um anjo de luz. Alguém que, com esperança, combateu o bom combate, completou a carreira e guardou a fé. Não houve um dia sequer que eu sentasse para escrever esta dissertação que eu não lembrasse você. Essa homenagem é o mínimo que eu, em vida, poderei fazer para alguém que, desde sempre, me inspira a ser melhor.

Ao nosso herói,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à inteligência suprema, ao criador de todas as coisas, à quem cotidianamente dispensa os mais perfeitos cuidados para com a minha existência e me ama incondicionalmente. Agradeço a quem, carinhosamente, chamo de Deus.

Agradeço aos meus pais, pelo cuidado verdadeiro e amor incondicional. Ao meu pai, João, por ser meu companheiro, meu amor perfeito, meu herói, o presente mais precioso que eu recebi ao nascer. Não sei o que seriam dos meus dias sem a tua presença e teu amparo. À minha mãe, Betânia, minha melhor amiga, meu amor verdadeiro, às vezes filha e a quem devo a minha presença nesse mundo. Eu amo vocês!

Ao meu namorado Lameck Pinheiro, pelo amor, compreensão, proteção, amizade e pela oportunidade de ter alguém tão especial e importante para mim. É difícil explicar a magnitude do sentimento construído... Obrigada simplesmente por existir! Te amo muito!

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e à CAPES pelo suporte físico e financeiro.

Aos meus queridos orientadores, Dr. Eduardo Beltrão e Dra. Sinara Almeida. Pela oportunidade, pela amizade, pela brilhante orientação e atenção. Tenho certeza de que vocês serão os espelhos para minha carreira profissional, não só pela evidente competência, mas pela humanidade para com seus orientandos. Aos integrantes do BmC, pela amizade, pelo conhecimento construído e pelo exemplo de grupo de pesquisa. Aos meus professores do mestrado, por todo conhecimento construído que, sem dúvidas, contribuirá imensuravelmente na minha atuação docente.

Ao meu irmão Alexsandro e à minha cunhada Camila.

Aos meus sobrinhos, Lorena, Pedro e Rayssa. Obrigada por aliviarem os percalços do caminho, por encherem meu mundo de luz e amor e por me permitirem amar de uma forma pura.

À minha família, por todo o amor. Aos meus avós, tios e primos, por todas as energias positivas, por me proporcionarem momentos de alegria e de fraternidade. Eu não poderia ter uma família melhor. Estendo os meus agradecimentos à família Nascimento, que já é parte da minha família. Obrigada pelo carinho, amizade e por todas as mensagens de afeto compartilhadas que me traziam o aconchego do lar, mesmo nos dias solitários em Recife.

À uma parte da minha família que merece destaque, pela acolhida, pelos momentos maravilhosos e por todo o sentimento construído ao longo dessa vida. Agradeço aos meus tios

queridos Sebastião e Adeilma, meus primos Sonnally e Allysson, meus amigos (quase primos) Miriam e Osvaldo, e meus priminhos Ytalo, Yuri e agora, a princesa Agnes. Aos meus padrinhos, Adeilton (*in memoriam*) e Lourdinha e seu filho Douglas, pelo exemplo de amor, resignação, fé e resiliência. Estarão eternamente guardados no meu coração.

Às minhas companheiras de moradia em Recife, Cynthia, Danielle e Dayane. Obrigada pelos momentos de partilha, pela companhia, pela paciência e aprendizado. Em especial, à minha irmã do coração, Cynthia Layse. Obrigada por todo carinho, cuidado, companheirismo e boas risadas. Tenho certeza que nossa amizade foi um dos grandes presentes que Recife me proporcionou. Você é luz, minha amiga! Estendo os agradecimentos ao meu amigo Temístocles, pelos momentos divertidos, pelas boas conversas e amizade.

À minha turma querida do mestrado, agradeço imensamente todos os momentos vividos. Tudo teria sido mais difícil sem a amizade de vocês. Obrigada por tudo, levarei cada um de vocês no meu coração, aonde quer que eu vá! Em especial, Aline, Mirella, Wilson, Anna, André, Priscilla e Toni.

À Airlla Laana, pela amizade, afeto e companheirismo. À Leandro Andrade, pela amizade, carinho e boas risadas. À Lucas Costa, pela amizade verdadeira e por ser exemplo de ser humano pra mim. Sua amizade é um trevo de quatro folhas! À Fábio Alves, um grande amigo que a vida me presenteou, que me apoia, me estimula e compra meus sonhos como se fossem dele. Gratidão por tudo! Aos meus amigos Bianca, Deyvid e Igor, por animarem meus dias com músicas, fotos e vídeos engraçados, tornando-os mais leves e divertidos. Agradeço a amizade e o carinho de vocês.

Às minhas amigas de graduação em ciências biológicas (UEPB), pela amizade continuada, pelas boas risadas e por serem porto seguro para mim. Às minhas amigas do coração, Alanna e Priscilla, por partilharem seus dias comigo, mesmo na distância. Agradeço a amizade que perdura desde o ensino médio. Amo vocês!

À minha professora de biologia do ensino médio, Claudete Martins, e minha ex-orientadora, Karina Saraiva, hoje grandes amigas. Agradeço pelo exemplo de docente, por todas as contribuições prestadas à minha vida e pela amizade de sempre.

À todos os meus alunos, ouvintes das minhas palestras e colegas de profissão por todos os elogios, contribuições e boas energias.

Enfim, agradeço à todos que se fizeram presentes na minha vida. Agradeço por todas as combinações de acontecimentos que vivenciei, todos os lugares por onde passei, todos os sorrisos que presenciei e à plenitude em estar viva.

RESUMO

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é definido como uma proliferação neoplásica de células epiteliais confinadas ao sistema ductal-lobular. O fenótipo expresso por estes tumores não são provenientes apenas das características celulares malignas, sendo influenciado também pelo microambiente tumoral. Assim, busca-se incessantemente por biomarcadores no estroma que expliquem alguns padrões fenotípicos tumorais. Nesse contexto, destacam-se os carboidratos, visto que a glicosilação é a modificação pós-traducional mais abundante nas proteínas. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar o padrão de carboidratos do estroma de carcinomas ductais *in situ* e suas possíveis relações com os dados clínico-patológicos. Para isso, foi realizada a caracterização dos pacientes do estudo (n=17) quanto aos dados clínico-patológicos, bem como a caracterização histológica do estroma de CDIS. Além disso, foi identificada a proporção tumor-estroma das amostras e o perfil de carboidratos do estroma através de histoquímica com lectinas WGA, PNA, SNA e MAL-II. Por fim, foram avaliadas as possíveis relações da expressão de carboidratos no estroma e as características clínico-patológicas do CDIS. Como resultados, observou-se que os pacientes analisados apresentaram, em sua maioria, idade superior a 50 anos (70,59%), tumores de tamanho superior a 2cm (88,23%) e presença de lesões comedônicas (64,70%). Para a expressão de receptores hormonais, observou-se que os status positivo e negativo ocorreram em proporções similares. Na caracterização histológica, notou-se a integridade das barreiras mioepiteliais, concordando com o diagnóstico de CDIS, além da presença de traços de desmoplasia e infiltrado inflamatório. Além disso, para a proporção tumor-estroma, observou-se maioria para *Low-stromal area* (52,94%) nos grupos representantes das lectinas SNA e WGA, bem como o *High-stromal area* para os grupos MAL-II (52,94%) e PNA (58,82%). Na análise de expressão dos carboidratos no estroma, observou-se maioria em positividade para os resíduos de Sia α 2-3 (64,7%) e Gal β (1-3)-GalNac (64,70%) e maioria em negatividade para os resíduos de Sia α 2-6 (58,82%) e GlcNAc β (1-4)-GlcNAc β 1- (52,94%). Na análise estatística multivariada, verificou-se que não houve correlações ($p < 0,05$) entre a expressão dos carboidratos estudados e os dados clínico-patológicos explorados. Sendo assim, o perfil diferencial de carboidratos pode influenciar nas relações tumor-estroma, embora que, para resultados mais conclusivos, sejam necessários estudos comparativos para análise do estroma em tumores de fenótipo invasivo.

Palavras-chave: Glicobiologia. Câncer de mama. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Ductal carcinoma in situ (DCIS) is defined as a neoplastic proliferation of epithelial cells confined to the ductal-lobular system. The phenotype expressed by these tumors does not come only from malignant cellular characteristics, being also influenced by the tumor microenvironment. In this context, carbohydrates are prominent, since glycosylation is a more abundant post-translational modification in proteins. Thus, this study aims to evaluate the stromal carbohydrate pattern of ductal carcinomas in situ and their possible relationships with clinical-pathological data. For this, a characterization of the patients of the study (n = 17) was carried out regarding the clinical-pathological data, as well as a histological characterization of the DCIS stroma. In addition, the tumor-stroma ratio of the samples and stromal carbohydrate profile through histochemistry with WGA, PNA, SNA and MAL-II lectins were identified. Finally, the possible correlations between the carbohydrates expression in stroma and the clinical-pathological characteristics of the DCIS were evaluated. As a result, it was observed that the majority of patients analyzed were older than 50 years (70.59%) and they presented tumors larger than 2 cm (88.23%) and comedo lesions (64.70%). For the hormone receptors expression, it was observed that the positive and negative status occurred in similar proportions. In the histological characterization, the integrity of the myoepithelial barriers was observed, agreeing with the diagnosis of DCIS, besides the presence of desmoplasia and inflammatory infiltrate. Moreover, for the tumor-stroma proportion, a majority of low-stromal area (52.94%) were observed in the SNA and WGA lectin groups, as well as the high-stromal area for the MAL-II (52.94%) and PNA (58.82%) groups. In the analysis of carbohydrate expression in the stroma, a majority in positivity was found for the residues of Sia α 2-3 (64.7%) and Gal β (1-3)-GalNac (64.70%) and most negativity for residues of Sia α 2-6 (58.82%) and GlcNAc β (1-4)-GlcNAc β 1- (52.94%). In the multivariate statistical analysis, it was verified that there were no correlations (p <0.05) between the expression of the carbohydrates studied and the clinical-pathological data explored. Thus, the differential profile of carbohydrates may influence tumor-stroma relations, although, for more conclusive results, comparative studies for stromal analysis in tumors of invasive phenotype are necessary.

Key-words: Glycobiology. Breast cancer. Tumor microenvironment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O desenvolvimento embrionário normal da mama.....	18
Figura 2 - Anatomia da glândula mamária.	19
Figura 3 - Suprimento sanguíneo arterial da mama.....	20
Figura 4 - Linfonodos axilares responsáveis pela drenagem linfática da mama.....	21
Figura 5 - Desenho esquemático dos diferentes estágios do desenvolvimento da glândula mamária.	22
Figura 6 - Domínios proteicos do receptor de estrógeno. As letras maiúsculas no interior das barras coloridas indicam a presença de diferentes domínios proteicos do RE (A-F). Os números expressos na figura indicam o número de aminoácidos de cada domínio.....	23
Figura 7 - Subtipos morfológicos de CDIS. (5A) CDIS sólido [100X – coloração HE]; (5B) CDIS cribiforme [200X – coloração HE]; (5C) CDIS micropapilar [100X – coloração HE] e (5D) CDIS comedônico [100X – coloração HE]. A seta aponta uma região de necrose.....	26
Figura 8 - Efeito da alteração de pH no processo de malignidade do câncer de mama.	31
Figura 9 - Interação dos CAFs com células neoplásicas e células do sistema imunológico. ...	33
Figura 10 - Interação das células endoteliais com células do sistema imunológico.....	35
Figura 11 - Atuação dos TAMs na tumorigênese.....	37
Figura 12 - Influência dos neutrófilos no microambiente tumoral.....	39
Figura 13 - Atuação nos mastócitos no microambiente tumoral.	42
Figura 14 - Influência da MEC na progressão tumoral do câncer de mama.	43
Figura 15 - Expressão dos receptores de estrógeno nas amostras de CDIS, com positividade à esquerda e negatividade à direita (sob aumento de 400x).....	59
Figura 16 - Infiltrado inflamatório no estroma de CDIS (sob aumento de 400x).	62
Figura 17 - Histoquímica com lectinas em amostras de CDIS (sob aumento de 400x). (A) lectina SNA, (B) lectina MAL-II, (C) lectina WGA e (D) lectina PNA.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular dos tumores de mama. ..	27
Quadro 2 - Dados clínico-patológicos dos pacientes analisados.....	58
Quadro 3 - Quadro comparativo entre a expressão de receptores RE e RP na lesão e no estroma.	60
Quadro 4 - Classificação do estroma quanto às características histopatológicas.	61
Quadro 5 - Proporção tumor-estroma das amostras analisadas.....	63
Quadro 6 - Expressão dos carboidratos no estroma tumoral.	64
Quadro 7 - Perfil de expressão de carboidratos no estroma considerando a presença/ausência de comedos.	67
Quadro 8 - Expressão estromal dos carboidratos categorizada de acordo com o perfil clínico-patológico das pacientes.	68
Quadro 9 - Análise estatística multivariada para a expressão de carboidratos no estroma.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette
ADAM 17	A disintegrin and metalloproteinase
AF-1	Ligand-dependent activation function 1
AF-2	Ligand-dependent activation function 2
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen-presenting cell
ARG1	Arginase 1
α -SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin
ATF-2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosina Trifosfato
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BRCA	Breast cancer gene
BrCSCs	Breast Cancer Stem Cells
CAF	Cancer-associated fibroblasts
CAV-1	Caveolina 1
CCL-2	Chemokine (C-C Motif) Ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
CSCs	Cancer Stem Cells
CSF-1	Granulocyte-macrophage
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DBD	DNA-binding domain
E2	17 β -estradiol

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	Glicosaminoglicano
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
Glc	Glicose
GlcNAc	N-Acetilglicosamina
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GPCR	<i>G Protein–Coupled Receptor</i>
HD	<i>Hinge Domain</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HER-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN γ	<i>Interferon gamma</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IGFR	<i>Insulin Growth Factor Receptor</i>
IL	Interleucina
IRF	<i>Interferon Regulatory Transcription Factor</i>
kDa	Kilodalton
LBD	<i>Ligand-Binding Bomain</i>
LM	Laminina
LOX	<i>Lysyl oxidase</i>
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
Mac-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAL-II	<i>Maackia amurensis Agglutinin</i>
Man	Manose
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i>
MEC	Matriz Extracelular
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteínase</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDL	<i>Programmed cell death ligand</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PGD	<i>Phosphogluconate Dehydrogenase</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
PO ₂	Pressão de oxigênio
PPAR-γ	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RDG	<i>Tripeptide Arg-Gly-Asp Domain</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROCK	<i>Rho-associated Protein Kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	Receptor de progesterona
SDC-1	Sindecan-1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
Ser/Thr	Serina/treonina
Sia	Ácido siálico
SNA	<i>Sambucus nigra Agglutinin</i>
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophage</i>
TAN	<i>Tumor-Associated Neutrophils</i>
TEC	<i>Tumor-associated Endothelial Cells</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRIB1	<i>Tribbles Pseudokinase 1</i>
TSR	<i>Tumour-Stroma Ratio</i>
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
uPAR	<i>Urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
Zeb-1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	A MAMA	18
2.1.1	Influência hormonal	21
2.2	CÂNCER DE MAMA	24
2.3	FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS	28
2.4	MICROAMBIENTE TUMORAL	29
2.4.1	Condições físico-químicas	29
2.4.2	Populações celulares do estroma	31
2.4.3	Matriz Extracelular e câncer	42
2.5	GLICOBIOLOGIA E CÂNCER	48
3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	METODOLOGIA	54
4.1	PACIENTES	54
4.2	AMOSTRAS	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA	54
4.4	HISTOQUÍMICA COM LECTINAS	54
4.5	PROPORÇÃO TUMOR-ESTROMA	55
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4.6.1	Variáveis estatísticas	55
4.6.1.1	Idade	55
4.6.1.2	Proporção Tumor-Estroma	56
4.6.1.3	Receptores Hormonais	56
4.6.1.4	Tamanho tumoral	56
4.6.1.5	Lesões comedônicas	57
4.6.2	Testes estatísticos	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	58
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO CDIS	60

5.3	PROPORÇÃO TUMOR-ESTROMA.....	63
5.4	EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL	64
5.5	PERFIL DE CARBOIDRATOS E DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	68
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é caracterizado por ser uma doença complexa e heterogênea, apresentando-se como um dos tumores malignos mais comuns em mulheres de todo o mundo (ANDÒ et al., 2014). O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é definido como uma proliferação neoplásica de células epiteliais confinadas ao sistema ductal-lobular, sendo caracterizado por atipia citológica, bem como uma tendência a progredir para uma condição de carcinoma invasivo. No geral, ocorre em uma proporção de 20-25% dentre os cânceres de mama (CARRARO et al., 2014).

Com base num elevado grau de heterogeneidade, o carcinoma mamário não pode ser visto como uma única entidade clínico-patológica (VIALE, 2012). As particularidades expressas pelos tumores não são provenientes apenas de marcas intrínsecas da malignidade. O ambiente no qual se encontra o tumor, seja pelas condições químicas ou pelas populações celulares residentes ou transitórias, influencia de modo efetivo nos padrões de proliferação, diferenciação, invasividade e responsividade às terapias convencionais (HU; POLYAK, 2008; SEMENZA, 2015). Desse modo, analisar as relações tumor-estroma é fundamental para compreender os mecanismos de progressão tumoral.

Assim, busca-se incessantemente por biomarcadores no estroma que expliquem alguns padrões fenotípicos tumorais. Nesse contexto, destacam-se os carboidratos, macromoléculas essenciais para a fisiologia celular, intensamente envolvidos nos processos de interação celular. Em eucariotos, em torno de 50% das proteínas são glicosiladas ao longo de sua construção, corroborando que a glicosilação é a modificação pós-traducional mais abundante nas proteínas (TAKAHASHI et al., 2016). Durante a carcinogênese, podem ocorrer alterações nos padrões de carboidratos da superfície da célula neoplásica, atuando em sinergia com outros fatores moleculares para a malignidade (VAJARIA et al. 2016).

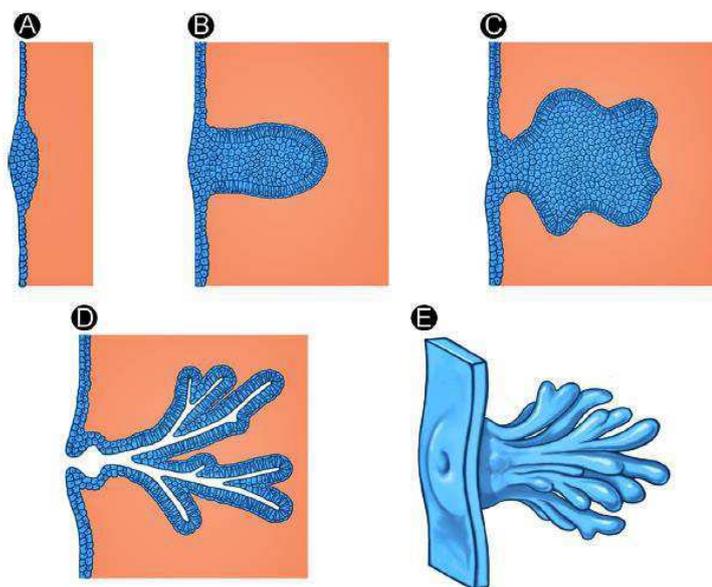
Contudo, com base na literatura existente, estudos que analisem as alterações dos carboidratos à nível estromal do CDIS ainda são escassos. Observa-se, portanto, a necessidade de entender as modificações estromais ocorridas no início da progressão tumoral que direcionam, por vezes, os tumores malignos para uma condição invasiva. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar o padrão de carboidratos do estroma de carcinomas ductais *in situ* e suas possíveis relações com os dados clínico-patológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A MAMA

A mama humana desenvolve-se sob a influência genética e hormonal a partir da camada germinativa ectoderme durante a quarta semana de vida embrionária (Figura 1). Os espessamentos ectodérmicos (denominados cumes mamários) surgem em humanos no peito, ao nível do quarto espaço intercostal e forma o broto mamário por volta da quinta semana de gestação (Fig. 1A) (ELLIS; MAHADEVAN, 2013). Entre a quinta e décima segunda semana, o broto mamário primário cresce para baixo, formando gomos secundários e lóbulos mamários (Fig. 1B-D). A partir da décima segunda semana, as papilas secundárias continuam a alongar-se, formando uma rede complexa de ductos mamários dispostos radialmente, que ligam o mamilo em desenvolvimento (invertido) com os lóbulos mamários em crescimento (Fig. 1E). O mamilo normalmente everte após o nascimento devido à proliferação lubrificante das glândulas sebáceas e o desenvolvimento do tecido erétil, bem como ocorre o aumento da pigmentação circundante da aréola (GEDDES, 2007). O estroma da mama (gordura, ligamentos, nervos, artérias, veias e vasos linfáticos) desenvolve-se ao longo de toda a gestação. Após a cessação dos efeitos dos hormônios maternos após nascimento, os seios não sofrem alterações até a puberdade (JESINGER, 2014).

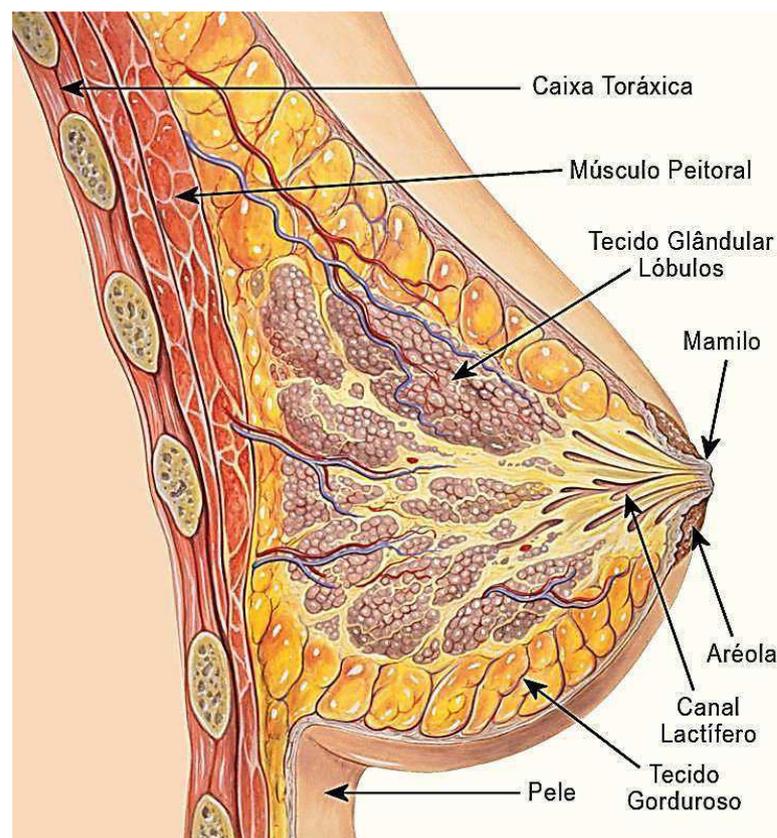
Figura 1 - O desenvolvimento embrionário normal da mama.



Fonte: JESINGER (2014)

A mama (Figura 2) é primariamente composta de um tecido glandular (secretor) e um tecido adiposo unidos por estruturas de tecido conjuntivo denso chamadas ligamentos de Cooper. O tecido glandular é do tipo túbulo-alveolar, variável de acordo com o sexo, a idade e o estado fisiológico, constituídos por 15-20 seções denominadas lobos, separados por tecido fibroso. Os lobos são constituídos por um conjunto de lóbulos, que se ligam à papila através de um ducto lactífero. Os lóbulos, por sua vez, são compostos por um grupo de ácinos, onde se encontram as células produtoras de leite. Cada lobo é drenado por meio de um sistema ductal, que conduz o leite até o meio externo. Durante a lactação, há uma diminuição na quantidade de tecido adiposo em relação ao tecido glandular, onde o tamanho e peso da mama aumenta (JONES; SPENCER, 2007).

Figura 2 - Anatomia da glândula mamária.

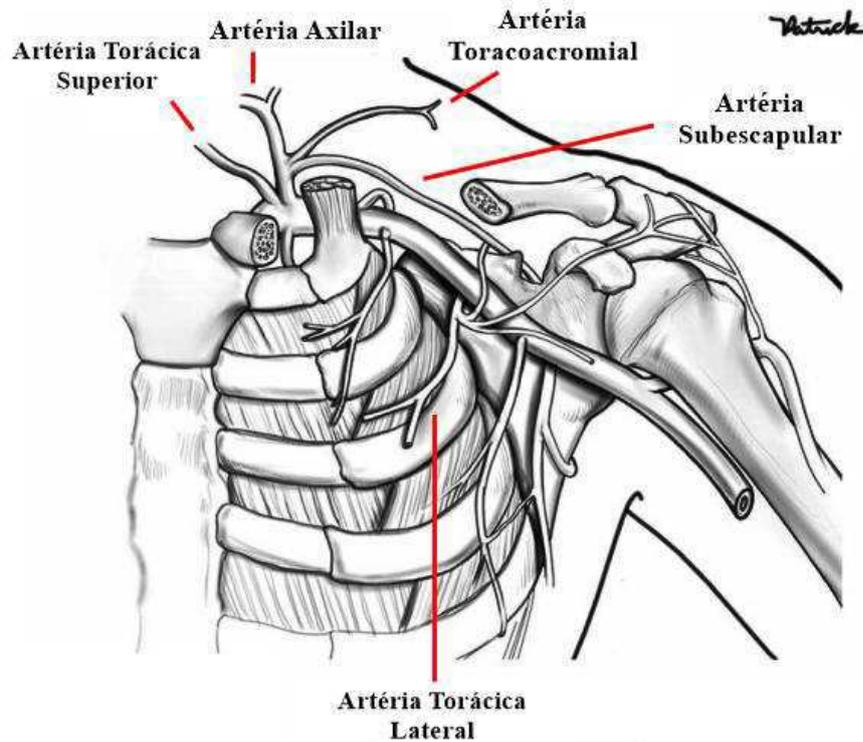


Fonte: NETTER (2015)

O suprimento de sangue da mama é uma rede rica em anastomoses derivada das artérias axilares torácicas internas e artérias intercostais (Figura 3). Os maiores vasos surgem a partir da artéria torácica interna, onde os ramos que perfuram a parede torácica adjacente ao

esterno do primeiro ao quarto espaço intercostal. Os quatro ramos da artéria axilar são: (1) torácico superior, (2) ramo peitoral acromiotorácico, (3) torácico lateral e (4) subescapular. Estes são acompanhados pelas veias correspondentes (ELLIS, 2014).

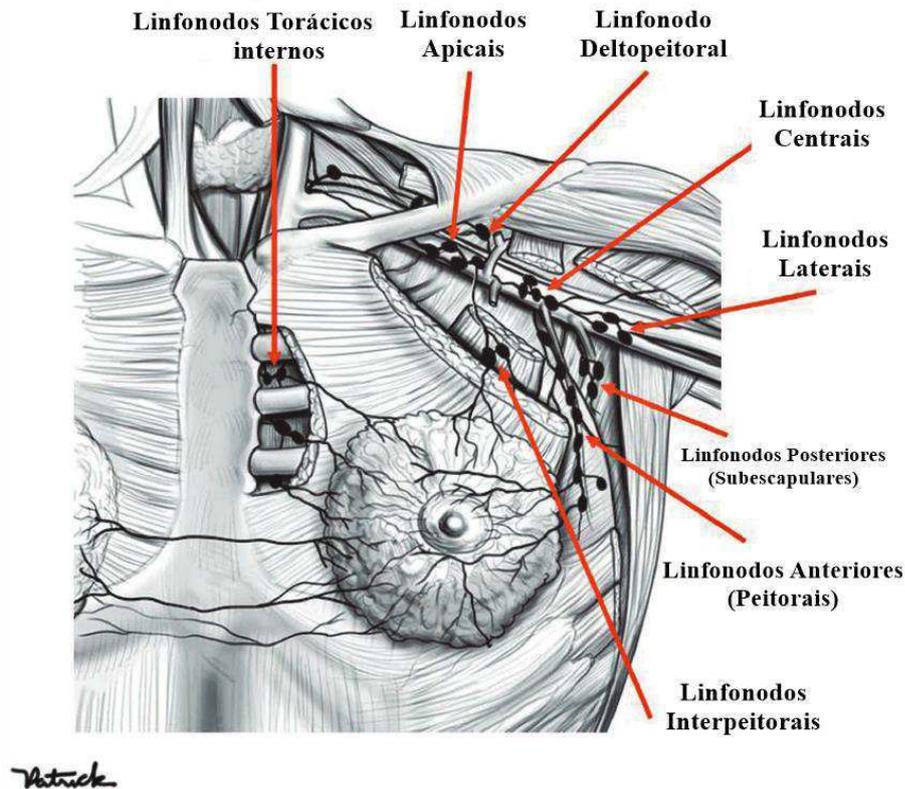
Figura 3 - Suprimento sanguíneo arterial da mama



Fonte: MACÉA; FREGNANI (2006) (Adaptado)

Além do suprimento sanguíneo, a importância da drenagem linfática da mama é evidente. Os gânglios linfáticos axilares variam em número entre 20 e 30 e são divididos em cinco grupos anatómicos não totalmente distintos (Figura 4) (ELLIS, 2014). Cirurgiões costumam classificar os linfonodos axilares em níveis de acordo com a sua relação com o músculo peitoral menor. Assim, os nódulos linfáticos localizados lateralmente ou por baixo a margem inferior do músculo peitoral menor (anteriores, posteriores e laterais) são classificados como gânglios linfáticos do nível I. Os gânglios linfáticos localizados profundamente em relação ao músculo peitoral menor constituem o nível II e são representados pelos linfonodos centrais e alguns gânglios linfáticos apicais. Finalmente, os gânglios linfáticos localizados medial ou superiormente à margem superior do músculo peitoral menor constituem nível III dos gânglios linfáticos, e este inclui os gânglios linfáticos apicais (MACÉA; FREGNANI, 2006).

Figura 4 - Linfonodos axilares responsáveis pela drenagem linfática da mama



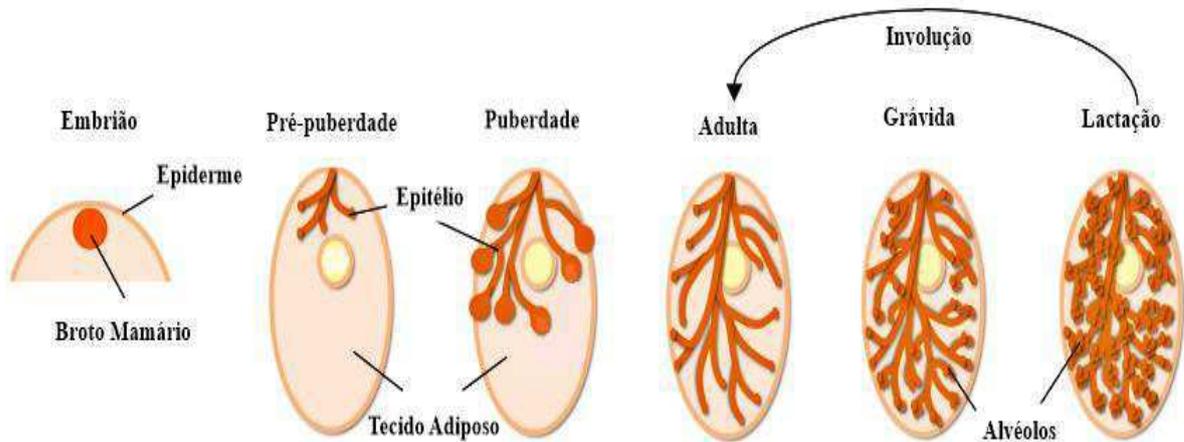
Fonte: MACÉA; FREGNANI (2006) (Adaptado)

2.1.1 Influência hormonal

A glândula mamária abriga o extraordinário potencial de proliferação e diferenciação celular (Figura 5). O desenvolvimento da glândula mamária independente de ação hormonal até a puberdade. Neste período, com a produção de estrogênio liberado pelo ovário, juntamente com o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) ocorre o estímulo para a morfogênese de ramificação (AMERONGEN et al., 2012). Sendo assim, o estrogênio é de suma importância para o crescimento e maturação das glândulas mamárias, sendo associado, muitas vezes, ao estabelecimento do câncer de mama (HALDOSÉN et al. 2014). Uma das principais mudanças ocorridas por estímulo hormonal é a invasão de tecido adiposo na região periférica da mama, arredondando-a, de modo a coincidir com a menstruação. A perda completa da expressão do receptor de estrogênio (RE), tanto no epitélio quanto no estroma leva a formação de uma glândula mamária rudimentar. Contudo, quando ocorre um epitélio *knock-out* para expressão de RE combinado com o tipo selvagem de estroma, o crescimento é

restaurado. Sendo assim, a expressão do RE no estroma mamário é importante para registrar um crescimento puberal (DALL et al., 2015).

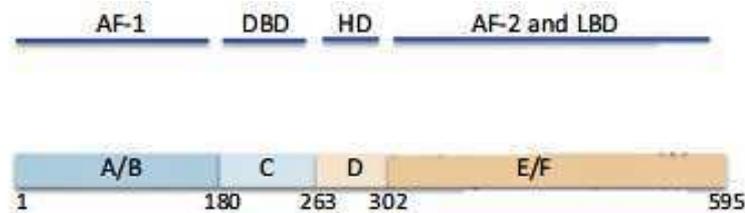
Figura 5 - Desenho esquemático dos diferentes estágios do desenvolvimento da glândula mamária.



Fonte: AMERONGEN et al. (2012) (Adaptado)

Os REs são membros da superfamília dos receptores nucleares que possibilitam os efeitos fisiológicos do estrogênio nos tecidos alvos, encontrados como receptores do tipo α ou β . Esses receptores possuem em sua estrutura proteica domínios de ligação a outras moléculas (Figura 6). Ao se ligar a um ligante, como o 17 β -estradiol (E2), eles recrutam coativadores ou correpressores e iniciam ou reprimem a transcrição, atuando como fatores de transcrição ou interagindo e alterando a atividade de outros fatores de transcrição. Assim, ligam-se diretamente às regiões de resposta ao estrogênio no DNA, desencadeando suas respectivas funções biológicas. Em condições específicas, como quando há uma sinalização exacerbada de fatores de crescimento, podem ocorrer alterações nos padrões de atividade do receptor (THOMAS; GUSTAFSSON, 2015a).

Figura 6 - Domínios proteicos do receptor de estrógeno. As letras maiúsculas no interior das barras coloridas indicam a presença de diferentes domínios proteicos do RE (A-F). Os números expressos na figura indicam o número de aminoácidos de cada domínio.



Fonte: THOMAS; GUSTAFSSON (2015) (Adaptado)

Nas mulheres pré-menopáusicas, o RE α foi bem localizado principalmente na camada celular epitelial interna (ácinos e ductos intralobulares) e nas células mioepiteliais da camada externa de ductos interlobulares. Por sua vez, o RE β foi encontrado tanto em células epiteliais quanto em células estromais. Em mulheres pós-menopáusicas, o RE α é expresso em menos de 10% das células epiteliais mamárias normais, enquanto o RE β é expresso em mais de 50% dessas células (HUANG et al., 2015). Nesse período da vida, as células estromais expressam RE β nuclear, mas não RE α . Os receptores α e β apresentam funções distintas, onde o RE α é responsável pelo efeito proliferativo do estrogênio por meio de algumas vias de sinalização de sinal, tais como AP-1/c-Jun, ATF-2, NF- κ B, p53, SP-1, and STAT (TECALCO-CRUZ et al. 2017) e o RE β reprime a proliferação e é pró-apoptótico (BRISKEN; O'MALLEY, 2010; PIPERIGKOU et al. 2016).

Um outro hormônio que exerce influência sobre as mamas é a progesterona, cuja atividade ocorre por meio de ativação do receptor de progesterona (RP), que possuem o estrogênio como coativador. Assim, há a garantia de que as funções de diferenciação do RP não sejam ativadas antes do estrogênio ter realizado as mudanças estruturais necessárias na mama e no útero, preparando esses tecidos para gestação e lactação, respectivamente (THOMAS; GUSTAFSSON, 2015b).

Durante o período gestacional, observa-se o desenvolvimento de uma árvore ductal totalmente diferenciada capaz de secretar leite (Figura 5). A liberação de progesterona, inicialmente do ovário e mais tarde a partir da placenta, induz uma ramificação generalizada que, juntamente com a prolactina, induz a formação de alvéolos necessárias à lactação. Além disso, o tecido adiposo interlobular perde seu teor lipídico para abrir caminho para estas estruturas alveolares, que se assemelham a um cacho de uvas, com rápida expansão com

secreções de leite, bem como a formação de uma rede complexa de vasos sanguíneos (KENT, 2007).

No cessação de desmame, um processo de dois estágios da involução ocorre para a glândula mamária retornar ao seu estado pré-gravidez. A primeira fase de involução é caracterizada por compreender os passos iniciais da decomposição da matriz extracelular (MEC) e uma pequena quantidade de apoptose dentro da camada epitelial. A segunda fase, por sua vez, envolve a rápida apoptose de alvéolos, afluxo de células imunológicas e reorganização da MEC, por meio do aumento dos níveis de *Transforming Growth Factor* (TGF) 1 e 3 e metaloproteases de matriz (MMP) 2, 3 e 9, bem como o retorno do componente lípido dos adipócitos que haviam sido perdidos durante a gravidez (O'BRIEN et al., 2010).

Portanto, ao longo da vida, as mamas passam por muitas variações anatômicas e fisiológicas, em grande parte, devido às alterações hormonais. Sendo assim, é necessário um rigoroso controle entre os ciclos de proliferação e de morte celular programada para manter a homeostase da glândula. Contudo, podem ocorrer erros nesses programas de controle, acarretando em algumas doenças, dentre elas o câncer de mama.

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea com inúmeras formas clínicas e histológicas. Para o Brasil, no biênio de 2018-2019, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016). Depois do tumor de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres. Sugere-se que a progressão e a resposta ao tratamento seja baseada em evidências clínicas, características histológicas do tecido tumoral e métodos moleculares que demonstram anormalidades na expressão gênica (DUECHLER et al., 2014).

O câncer de mama pode surgir em diferentes locais da glândula, sendo a partir disso, classificado em diferentes subtipos. Dentre os subtipos, destacam-se o carcinoma ductal invasivo (CDI), carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobular *in situ* (CLIS), carcinoma lobular invasivo (CLI), câncer de mama inflamatório, doença de Paget e os tipos raros de câncer de mama, que incluem linfomas, angiossarcomas, metaplásticos, entre outros (PINDER et al. 2010; CARRARO et al., 2014).

O CDIS é definido como uma proliferação neoplásica de células epiteliais confinadas ao sistema ductal-lobular, sendo caracterizado por atipia citológica, bem como uma tendência

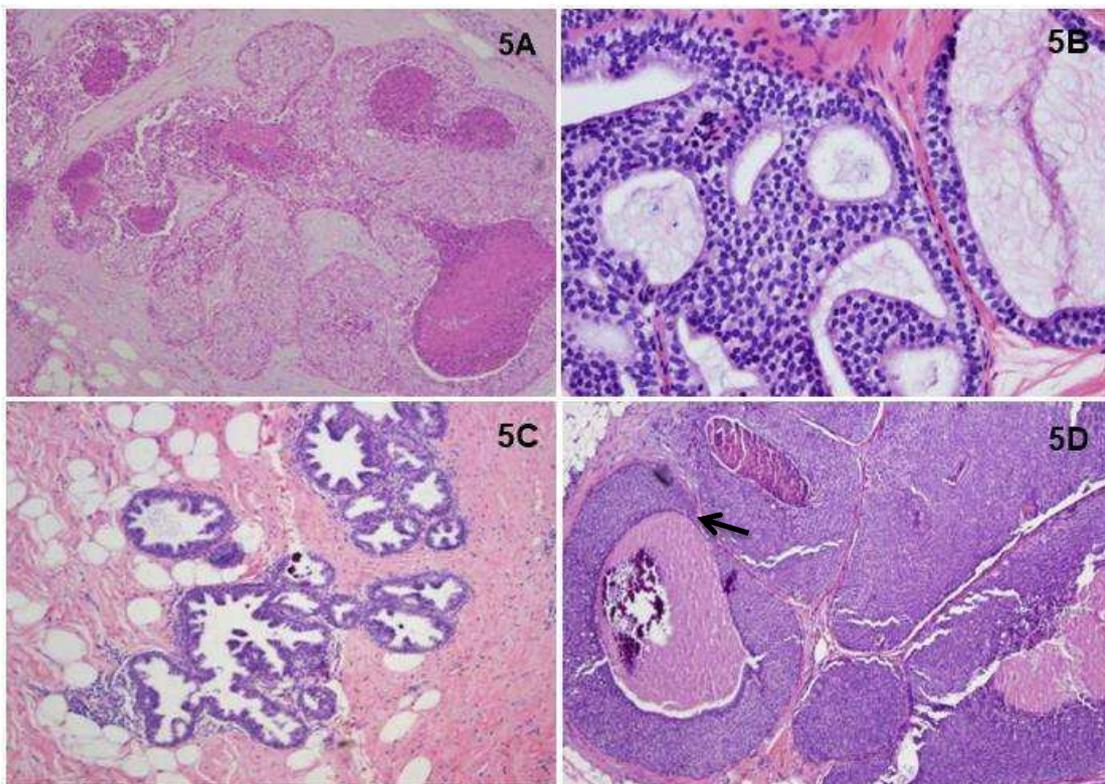
a progredir para uma condição de carcinoma invasivo. No geral, é tipicamente não palpável, assintomático e descoberto incidentalmente como microcalcificações suspeitas. Atualmente, ocorre em uma proporção de 20-25% dentre os cânceres de mama. Alguns fatores de risco aumentam a incidência de CDIS, dentre eles idade avançada, doença benigna prévia da mama, histórico familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, idade tardia da menopausa e uso prolongado de terapia de reposição hormonal pós-menopausa (CARRARO et al., 2014).

Grande parte dos sistemas de classificação atuais categoriza o CDIS com base em características citonucleares, culminando em diferentes prognósticos. Sendo assim, os tumores *in situ* podem ser divididos em grau baixo, intermediário ou alto (PINDER et al. 2010). O CDIS de alto grau é caracterizado por células grandes pleomórficas com variação em tamanho e forma, bem como ausência de polaridade. Além disso, apresenta cromatina densa, nucléolos proeminentes e mitoses muitas vezes abundantes. O núcleo tende a ter contornos irregulares, mostrando-se ampliados (2,5 a 3 vezes o tamanho de um eritrócito). O CDIS de baixo grau, por sua vez, é composto por células mais uniformes, com núcleos arredondados, localizados centralmente no citoplasma (os núcleos são 1 a 2 vezes o tamanho de um eritrócito). As células tumorais geralmente estão dispostas em padrões bem ordenados, demonstrando polaridade, além de arquiteturas mitóticas escassas. O CDIS de grau intermediário exibem pleomorfismo moderado, ausência da uniformidade encontrada em uma lesão de baixo grau. Podem ocorrer a presença de nucléolos ocasionais. Intrinsecamente, essas lesões são aquelas excluídas de um diagnóstico de baixo e alto grau (BROWN; PINDER, 2012).

O CDIS pode ser classificado quanto à sua morfologia e fisiologia celular. Observa-se que os tumores *in situ* podem ser divididos em duas categorias no que diz respeito à presença de centros necróticos - lesões comedônicas e não comedônicas. As primeiras são caracterizadas por alto grau celular, necrose central proeminente e microcalcificações pleomórficas, negatividade para a expressão RE, amplificação frequente do gene HER2, mutações no gene supressor p53 e elevadas taxas de proliferação, culminando em um prognóstico mais reservado. Por sua vez, as últimas apresentam geralmente baixo grau celular, positividade para RE, negatividade para amplificação de HER2, baixa taxa de mutações no gene p53 e baixas taxas de proliferação. Focos de microinvasão e angiogênese são mais comuns em lesões comedônicas, em comparação com lesões não comedônicas (SIZIOPIKOU, 2013).

Além disso, o CDIS pode exibir padrões de arquitetura morfológica tecidual assumidas pelas células tumorais (figura 7). Em um mesmo tumor, pode se encontrar mais de um subtipo tipo morfológico, embora um deles na maioria das vezes seja mais predominante. O subtipo sólido é caracterizado pelo preenchimento total do ducto por células tumorais, de maneira uniforme, podendo variar o grau nuclear de baixo a alto. Os tumores cribriforme apresentam morfologia crivada, ou seja, espaços entre as células tumorais são crivados formando “ilhas” vazias de células. São geralmente encontrados nos tumores de baixo grau, com células de formato uniforme e localização nuclear central, podendo estar ou não associados à necrose. Por sua vez, o subtipo papilar caracteriza-se por populações uniformes de células dispostas em torno de eixos conjuntivos vasculares, projetando-se para dentro do ducto. A forma micropapilar assume um formato semelhante, embora não exiba o eixo conjuntivo vascular (JAFFER; BLEIWEISS, 2002).

Figura 7 - Subtipos morfológicos de CDIS. (5A) CDIS sólido [100X – coloração HE]; (5B) CDIS cribriforme [200X – coloração HE]; (5C) CDIS micropapilar [100X – coloração HE] e (5D) CDIS comedônico [100X – coloração HE]. A seta aponta uma região de necrose.



Fonte: SCHUH (2011)

Além da classificação morfológica, o uso de perfis de expressão gênica tem sido aplicado para o estudo do câncer de mama, buscando desvendar a base molecular das características biológicas. Assim, com base na expressão de alguns marcadores, o câncer de mama foi subtipado em cinco tipos moleculares, sendo eles (1) luminal A, (2) luminal B, (3) HER-2 positivo, (4) basaloide e (5) triplo-negativo (CIRQUEIRA et al. 2011), descritos no quadro abaixo (quadro 1).

Quadro 1 - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular dos tumores de mama.

Subtipo molecular	Padrão de imunomarcação
Luminal A	Representa cerca de 60% dos carcinomas de mama, bem como baixo grau histológico e o melhor prognóstico. Apresentam positividade para RE e RP, e negatividade para superexpressão de HER-2, além de um índice de ki-67 < 14%
Luminal B	Apresenta um pior prognóstico se comparado ao luminal A. Possuem positividade para RE e RP, um índice de ki-67 $\geq 14\%$, podendo ser positivo ou negativo para superexpressão de HER-2. No primeiro caso, é atribuída a nomenclatura luminal HER-2.
Superexpressão de HER-2	Esse subgrupo possui o pior prognóstico em relação aos demais subtipos. Possuem negatividade para os receptores hormonais RE e RP, com positividade para a superexpressão da oncoproteína HER-2.
Basaloide	Esse subtipo é caracterizado por alto grau histológico, elevado índice mitótico, presença de áreas de necrose central e infiltrado linfocitário. Apresenta negatividade para RE, RP e HER-2. Além disso, destaca-se a baixa expressão de BRCA1 e positividade para a expressão das citoqueratinas 5 ou 5/6 e EGFR.
Triplo-negativo	Esse subgrupo apresenta negatividade para RE, RP, HER-2, citoqueratinas 5 ou 5/6 e EGFR.

Fonte: CIRQUEIRA et al. (2011) (Adaptado)

A subtipagem molecular do CDIS é de grande importância para o diagnóstico e terapêutica subsequente. A partir da associação de determinados marcadores imunohistoquímicos aos subtipos dessa patologia surgiram novas estratégias terapêuticas para agir em co-adjuvância com as terapias convencionais. Assim, os tumores com expressão de

receptores hormonais podem ser tratados com sucesso por anti-estrogênios ou ainda inibidores de aromatase. Por sua vez, os tumores com superexpressão de HER2, tem se utilizado anticorpos anti-HER2, tais como o trastuzumab ou inibidores de cinase HER2 (DITTMER; LEYH, 2015).

À cada dia, pesquisas visam propor novos métodos terapêuticos para limitar o crescimento dos carcinomas de mama e suas possíveis colonizações em outros tecidos. Entretanto, essa patologia apresenta uma complexidade intrínseca e grande diversidade na sua capacidade de resposta ao tratamento, onde há influências genéticas e microambientais (MANGIA et al., 2011). Sendo assim, para a aquisição de características fenotípicas favoráveis à progressão e metástase, os tumores não se utilizam apenas de propriedades intrínsecas, mas são modulados pelo ambiente onde estão inseridos.

2.3 FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Como já descrito, o câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea. Desse modo, busca-se características e correlações entre estas que gerem padrões fenotípicos específicos para facilitar o prognóstico e a terapêutica. A classificação histopatológica do carcinoma mamário é baseada na diversidade das características morfológicas dos tumores (VIALE, 2012), que, atrelada às características clínicas fornecem um panorama da doença, classificando-a em diversos subtipos e estabelecendo prognósticos específicos.

No câncer de mama, à princípio, a classificação dos tumores baseava-se nas características histológicas categorizando-os de acordo com a localização ao longo da arquitetura mamária, bem como na determinação do estado de comprometimento linfonodal, no tamanho tumoral e no grau tumoral. Além disso, os dados clínicos como idade, *status* menopausal, uso de reposição hormonal, dentre outros, atuavam em sinergia para a compreensão da patologia (HAN; MAGLIOCCO, 2016).

Posteriormente, técnicas específicas mostraram que os tumores de mama poderiam ser classificados em subtipos moleculares de acordo com seu perfil de expressão para receptores hormonais e de amplificação de sinal proliferativo. Esse fato proporcionou mudanças no olhar clínico para o câncer de mama, perpassando o âmbito prognóstico e terapêutico (hormonoterapia e imunoterapia) (LEONG; ZHUANG, 2011).

Mais recentemente, a cancerologia experimental busca encontrar novos biomarcadores e investigar as possíveis correlações destes com os dados clínico-patológicos, permitindo aprofundar a categorização dos tumores mamários, com o objetivo final de obter reflexos na

terapêutica, visto que ainda há muitas limitações nesse aspecto em grande parte resultado da heterogeneidade da doença. No caso dos tumores *in situ*, observa-se um menor número de trabalhos sobre estes se comparados à condição invasiva. Nesse sentido, ressalta-se a importância de compreender os estágios iniciais da progressão tumoral para uma melhor visualização do panorama geral do câncer de mama.

2.4 MICROAMBIENTE TUMORAL

O tumor epitelial encontra-se envolvido em um microambiente tumoral, onde as condições físico-químicas e as populações de células residentes influenciam diretamente na progressão tumoral. Dessa forma, há uma co-evolução entre as células tumorais e as células estromais de modo que o microambiente tumoral possa modificar a proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação, capacidade de invasão e metástase das células cancerígenas. Contudo, os mecanismos moleculares desses efeitos são pobremente compreendidos (HU; POLYAK, 2008).

O estroma tumoral pode ser subdividido em: um ambiente químico, onde destacam-se a pressão de O_2 (PO_2), o pH e a concentração de outras pequenas moléculas e metabólitos; e um ambiente celular, incluindo as células tumorais, células estromais e a MEC produzida por elas (SEMENZA, 2015). Sendo assim, a combinação desses componentes faz do microambiente tumoral um ambiente variável tanto em organismos distintos, quanto em diferentes nichos metastáticos em um mesmo indivíduo.

2.4.1 Condições físico-químicas

A PO_2 é um importante parâmetro para analisar o microambiente tumoral, tendo em vista que é um gás indispensável para o metabolismo celular. A rápida proliferação celular das células cancerosas resulta em regiões de hipóxia, ou seja, baixa concentração do gás em algumas regiões do tumor. Como resposta, o tecido com déficit de O_2 retém os fatores de hipóxia (HIFs), que seriam degradados em proteossomas. Desse modo, as isoformas das subunidades (α e β) são translocadas para o núcleo, onde se tornam fatores de transcrição para diferentes conjuntos de genes responsáveis pela proliferação, sobrevivência das células e angiogênese (BLAZEJCZYK et al. 2015).

Os HIFs atuam alterando a expressão de genes envolvidos principalmente no suprimento sanguíneo e no metabolismo em resposta à baixa concentração de oxigênio. A

formação de novos vasos sanguíneos é denominada de angiogênese e esse processo desempenha um papel crucial no crescimento tumoral e metástase (NALWOGA et al., 2016). Se comparados com vasos sanguíneos normais, os vasos tumorais apresentam propriedades morfológicas e funcionais alteradas em áreas de hipóxia. Dentre as diferenças principais, resalta-se defeitos com a ramificação, perda da interconexão celular, aumento da proliferação em 50-200 vezes, anormalidades citogenéticas como aneuploidia e cromossomos anormais, além de maior responsividade aos fatores de crescimento como o EGF e resistências a alguns agentes quimioterápicos (BLAZEJCZYK et al. 2015). Nessa perspectiva, a estrutura do sistema vascular tem sido demonstrado ser crucial para a distribuição de fármacos a todas as células no tumor, sendo tais variações influentes na resposta terapêutica.

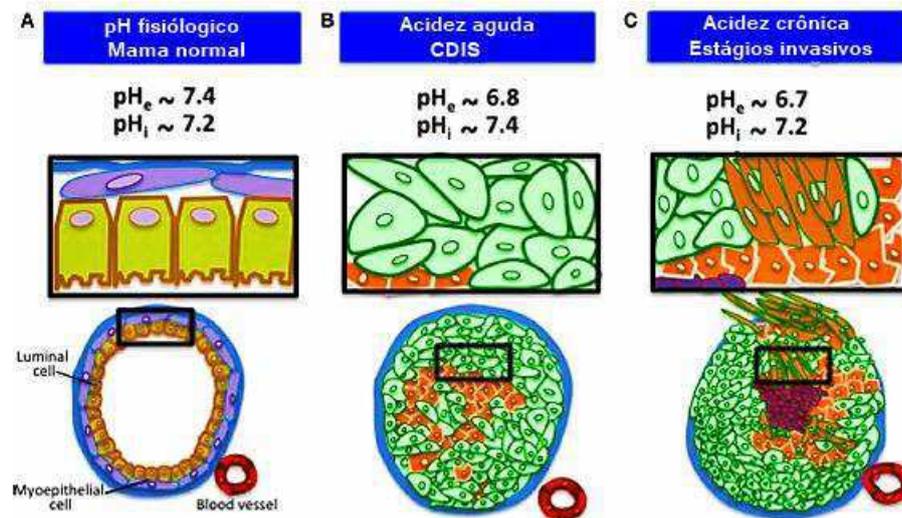
Alguns fatores de crescimento que regulam o processo de angiogênese. Entre eles, destacam-se o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento transformante alfa ($TGF\alpha$) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de algumas citocinas, como as interleucinas 1, 6 e 8 e o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), sendo as células do microambiente também fonte dessas moléculas (WU; DAI, 2016).

No que se refere ao metabolismo, com a diminuição da concentração de O_2 , as células tumorais adaptam suas atividades metabólicas para continuar a proliferação celular. Uma das estratégias utilizadas é fazer uso da fermentação para produção de ATP, tendo em vista que este processo não necessita de oxigênio. Porém, além do saldo energético ser bem menor que a fosforilação oxidativa, a atividade fermentativa aumenta a concentração de substâncias ácidas, tais como o lactato, aumentando a acidez do meio. Assim, as células tumorais precisam encontrar mecanismos de eliminar o acúmulo de tais moléculas e adaptar o seu microambiente às novas condições físico-químicas (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

O pH também é uma condição muito importante para a homeostase celular, influenciando na morfologia e fisiologia do sistema biológico. Com já descrito, as células cancerígenas, por necessidades metabólicas, geralmente tornam o pH intracelular ácido. Dessa forma, faz-se necessário estratégias para o bombeamento dos prótons (H^+) acumulados para fora da célula tumoral. Nesse contexto, destacam-se as anidrases carbônicas, transportadores de monocarboxilato, bem como os transportadores de HCO_3^- , sendo este último tipo muito presente na regulação do pH no câncer de mama, por meio de um co-transportador Na^+/HCO_3^- (BOEDTKJER et al., 2013). Assim, os prótons H^+ são direcionados ao meio extracelular, tornando o microambiente com um alto grau de acidez. Por consequência, ocorre

o aumento da proliferação celular, migração e invasão, devido a ativação de canais iônicos, proteínas e vias de sinalização específicas (Figura 8) (DAMAGHI et al., 2013).

Figura 8 - Efeito da alteração de pH no processo de malignidade do câncer de mama.



Fonte: DAMAGHI et al. (2013)

Além da concentração de O_2 e do pH, algumas moléculas estão presentes no microambiente tumoral e influenciam diretamente nas condições físico-químicas desse meio, podendo favorecer as células tumorais em sua proliferação, disseminação e neocolonização metastática. O óxido nítrico (NO) é um gás instável, lipossolúvel e de ação parácrina. O mesmo pode ser encontrado no estroma tumoral e apresenta um importante papel no processo de angiogênese, auxiliando na disseminação de células tumorais (CHOUDHARI et al., 2013). Alguns íons também exercem influência sobre a progressão tumoral, por meio de alteração da expressão de oncogenes e supressores tumorais, além de agir como cofator de muitas enzimas envolvidas no câncer. Assim, as condições físico-químicas encontradas no meio extracelular influenciam diretamente na progressão tumoral.

2.4.2 Populações celulares do estroma

Além dos aspectos físico-químicos, o microambiente tumoral abriga uma grande variedade de tipos celulares, com os quais mantem conexões físicas e/ou moleculares. Essas células, residentes ou transitórias no estroma tumoral, auxiliam emitindo sinais para as células tumorais, bem como recebendo sinais das mesmas para modificação do seu perfil fenotípico,

em detrimento às necessidades do tumor. Dentre as principais populações celulares, cabe ressaltar os fibroblastos, células endoteliais, perícitos, macrófagos, neutrófilos, células supressoras derivadas da medula óssea (MDSCs) e células-tronco cancerígenas (CHANMEE et al., 2016).

Os fibroblastos são células responsáveis pela secreção da maioria das proteínas que compõem a matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, principalmente em torno das glândulas mamárias. Essas células, por suas características morfofisiológicas, são derivadas das células estromais mesenquimais (PASANEN et al., 2016). Entretanto, podem modificar seu perfil fenotípico quando envolvidas no estroma tumoral e originar diferentes subpopulações com funções distintas (GANDELLINI et al., 2015). Aproximadamente 80% dos fibroblastos presentes no estroma do câncer de mama adquirem um fenótipo agressivo e contribuem para o crescimento, invasão e metástase, através da ativação parácrina por vários fatores de crescimento, citocinas, proteases e hormônios. Sendo assim, esses fibroblastos ativados são denominados de *cancer-associated fibroblasts* (CAFs) (LUO et al., 2015).

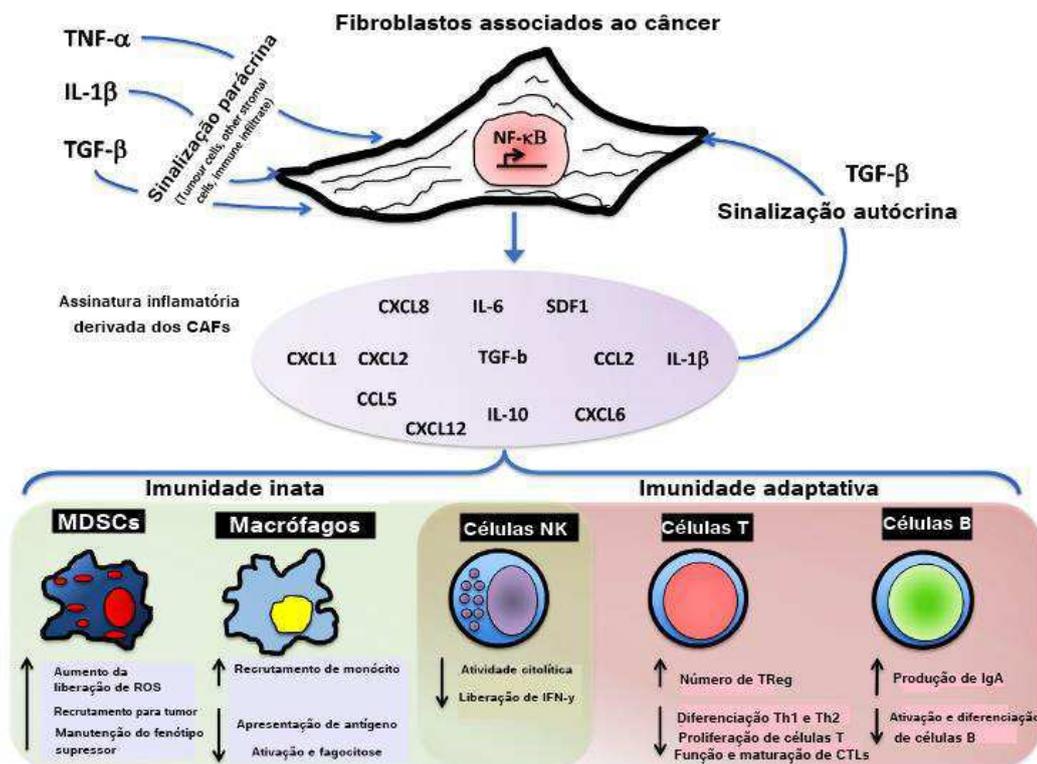
Os CAFs são originados no microambiente tumoral como resultado da (1) ativação de fibroblastos residentes, (2) das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, (3) de células do câncer que sofreram transição epitélio mesenquimal (TEM), dentre outros fatores. A modificação fenotípica pode ocorrer devido a substâncias secretadas por células neoplásicas, como TGF- β e CXCL12/SDF-1 ou ainda pela perda funcional de genes supressores tumorais, tais como PTEN, CAV-1, p53 e p21 (MAO et al., 2013).

Os CAFs atuam de modo sinérgico na progressão tumoral de vários modos. Dentre estes, destacam-se a ativação de proteases, que remodelam a MEC possibilitando novas vias de disseminação de células cancerígenas, além da ativação de fatores de crescimento e receptores por clivagem. Como exemplo, podem ser citadas as MMPs e uPA (VOSSELER et al., 2009). Um outro modo de atuação dos CAFs é por meio da produção de fatores de crescimento, tais como o *hepatocyte growth factor* (HGF), VEGFA e EGF, que ativa vias de sinalização responsáveis pela progressão tumoral. Por conseguinte, outras classes de moléculas moduladas pelos CAFs são as citocinas, como algumas interleucinas, interferons e membros do fator de necrose tumoral (TNF α), bem como genes supressores tumorais, com destaque para a proteína p53 e enzimas envolvidas no metabolismo energético celular (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010).

Sendo assim, por meio dos modos supracitados, os CAFs contribuem para muitas características do câncer através da interação com células neoplásicas e células do sistema imunológico (Figura 9), tais como manutenção dos sinais proliferativos, perda dos

supressores tumorais e resistência à morte celular, desregulação da bioenergética celular, inflamação, invasão e metástase, instabilidade genômica e mutação, além de auxiliar na indução da angiogênese e evitar a destruição pelo sistema imune (TOMMELEIN et al., 2015; HARPER; SAINSON, 2014).

Figura 9 - Interação dos CAFs com células neoplásicas e células do sistema imunológico.



Fonte: HARPER; SAINSON (2014)

As células endoteliais são responsáveis pela manutenção da homeostase vascular, de modo que o fluxo sanguíneo e a integridade vascular sejam contínuos. Geralmente, quando não ativadas, elas atuam com propriedades anti-coagulantes, anti-inflamatórias e anti-adesivas, por meio da regulação de plaquetas e células sanguíneas. Em contrapartida, quando ativadas em condições normais, sofrem mudanças dinâmicas para adequarem-se às novas condições microambientais (BLAZEJCZYK et al., 2015).

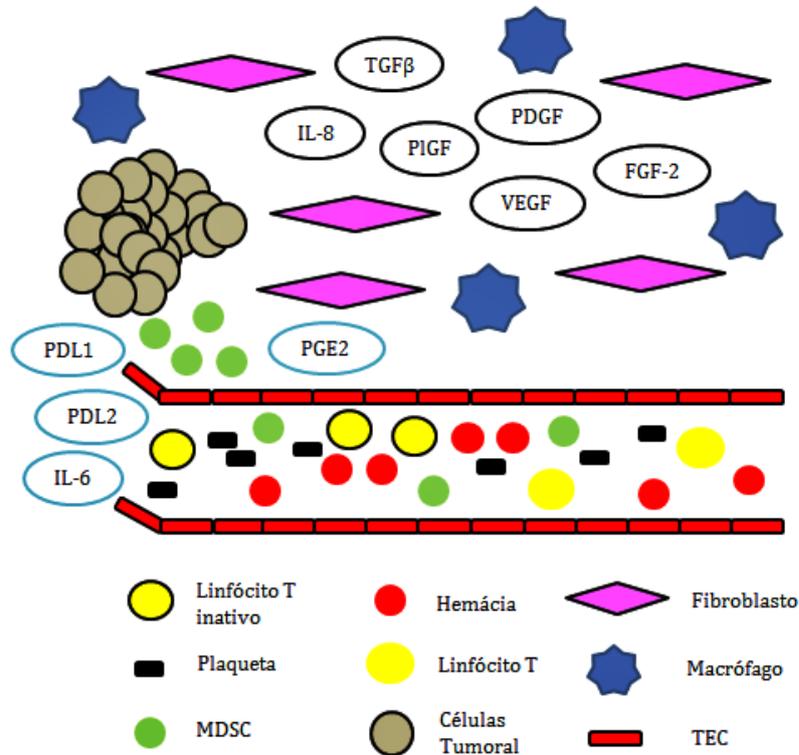
O microambiente tumoral é fonte de muitas moléculas necessárias para a ativação das células endoteliais, tais como VEGF, FGF-2, PDGF, PIGF, TGF β , IL-8, e a produção das mesmas pode ser realizada por meio das células cancerígenas, bem como das demais células que compõem o estroma (SHARMA et al., 2016). As células endoteliais envolvidas pelo

microambiente tumoral possuem características distintas das que se encontram em condições normais, tanto nos aspectos morfológicos, quanto nos aspectos funcionais, sendo caracterizadas por seus vasos possuírem um fluxo sanguíneo caótico, uma diapedese prejudicada, além de anormalidades estruturais e aberrações das propriedades adesivas. Logo, quando em um contexto tumoral, as células endoteliais são denominadas de *tumor-associated endothelial cells* (TECs) (WU; DAI, 2016).

As TECs podem modular o sistema imunológico de diversos modos (Figura 10), dentre eles, ressalta-se a redução de expressão de E-selectinas, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1), ICAM2 and *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1), que facilita a diapedese de células T mediada por integrinas (TURLEY et al., 2015). Além disso, as TECs podem suprimir a função de células T através da migração de *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) da corrente sanguínea para o interior do tumor, como também por meio de moléculas inibidoras como *programmed cell death ligand 1* (PDL1) e PDL2. A liberação de fatores solúveis como prostaglandina E2, IL-6, TGF- β , VEGF também exercem influência sobre a resposta de células T (TALMADGE; GABRILOVICH, 2013; WU; DAI, 2016).

Assim, por serem uma interface entre as células sanguíneas, as células tumorais e a MEC, as células endoteliais são moduladas pelo ambiente tumoral e exercem influência sobre o mesmo, possibilitando ao câncer propriedades importantes para sua progressão, como organização do estroma, recrutamento de leucócitos, angiogênese, e por consequência, invasão e metástase (SHARMA et al., 2016).

Figura 10 - Interação das células endoteliais com células do sistema imunológico.



Fonte: WU; DAI (2016) (Adaptado).

Os perícitos são células contrácteis em íntimo contato com células endoteliais em capilares e vênulas. Várias vias de sinalização estão envolvidas nos processos de recrutamento, diferenciação e função dos perícitos, tais como PDGF, TGF β , angiopoietina e membros da família NOTCH (PIETRAS; ÖSTMAN, 2010).

Grande parte da interface entre perícitos e células endoteliais é separado por uma membrana basal. Entretanto, em alguns pontos, há o contato entre as duas células. Embora a quantidade desses contatos possa variar entre os diferentes tecidos, em média há 1.000 contatos para uma única célula endotelial. Morfologicamente, o tipo mais comum de contato são do tipo *peg-socket*, nos quais os “dedos” citoplasmáticos dos perícitos são inseridos nas invaginações endoteliais (ARMULIK et al., 2011).

No câncer, os perícitos estão envolvidos na modulação da expressão de genes imunoregulatórios, principalmente os envolvidos na apresentação de antígenos e sinalização por interferons. Por consequência, há uma relação negativa entre a presença dos perícitos e a presença dos linfócitos citotóxicos (CD8⁺), resultado da supressão às respostas mediadas por células T através da produção de PGE2, TGF β e NO. Essa função imunomoduladora pode ser

potencializada por meio da exposição à IL-6 no microambiente tumoral, sendo este, portanto, um potente transformador de perícitos em células regulatórias (TURLEY et al., 2015).

Além disso, em grande parte dos cânceres, essas células podem interagir com as células endoteliais para apoiar o crescimento da vasculatura e manter a integridade dos vasos, promovendo a resistência das células endoteliais frente às terapias anti-angiogênicas. Dessa forma, mesmo as terapias retirando o VEGF das células endoteliais, os perícitos ativam vias pró-angiogênicas alternativas, principalmente por meio do PDGF (LIU; OUYANG, 2013).

Os macrófagos são células derivadas de células tronco hematopoiéticas na medula óssea através de monócitos circulantes. Juntamente aos neutrófilos, são fagócitos bastante eficientes envolvidos na primeira linha de defesa durante a imunidade inata. Os macrófagos estão entre as células mais plásticas do sistema hematopoiético, sendo encontrados em todos os tecidos com uma grande diversidade anatomo-funcional e estão envolvidos em processos como organogênese e manutenção da homeostase e reparo tecidual, bem como sobrevivência imunológica (LAHMAR et al., 2016).

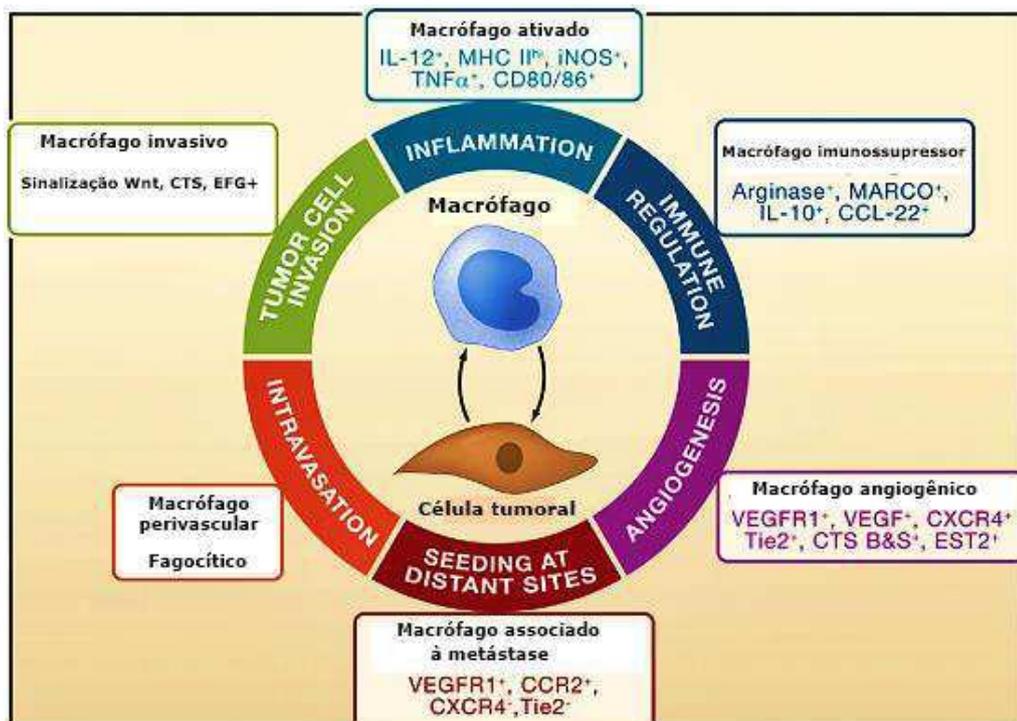
Os processos de diferenciação, crescimento e quimiotaxia dos macrófagos são regulados por fatores de crescimento, tais como *colony stimulating factor* (CSF-1), *granulocyte-macrophage* (GM)-CSF, IL-3 e quimiocinas como *chemokine (C-C Motif) Ligand 2* (CCL-2) (QIAN; POLLARD, 2010). Nesse contexto, ao longo do processo de maturação, os macrófagos podem se diferenciar em dois tipos dependendo das condições do microambiente tecidual. São eles: (1) pró-inflamatórios ou M1 e (2) anti-inflamatórios ou M2. Os macrófagos M1 podem se diferenciar através de vários fatores de transcrição IRF-1, Stat1 e NFκB e atuam amplificando respostas inflamatórias. Por sua vez, os macrófagos M2 são importantes na regulação na remodelação tecidual, reparo e em condições fisiológicas específicas. Assim como os M1, essa população celular é regulada por fatores de transcrição específicos, tais como IRF-4, Stat6, PPAR-γ, TRIB1 e remodeladores de cromatina como Jmjd3 (JINUSHI; KOMOHARA, 2015).

No contexto tumoral, o microambiente é um reservatório de substâncias bioativas como hormônios, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Logo, dependendo das condições, o estroma tumoral pode recrutar diferentes populações de macrófagos. Assim, ao longo do processo de maturação, os macrófagos expressam receptores como CD62L, CX3CR1, CCR2 e VEGFR1, que, dependendo dos ligantes produzidos no meio, são ativados e recrutados ao tumor. Em estudos experimentais, foram encontrados macrófagos de ambos os tipos, M1 e M2, conferindo suporte ao tumor (LEE et al., 2013).

Entretanto, o fenótipo M2 é mais comumente encontrados entre os macrófagos recrutados pelo tumor. Esses são denominados de *Tumor-associated macrophages* (TAMs) e secretam fatores de crescimento que promovem a angiogênese, crescimento, invasão, migração, metástase e imunossupressão (Figura 11). No câncer de mama, os TAMs são correlacionados com fatores de pobre prognóstico, como necrose, diminuição do período de vida livre da doença, alto grau tumoral, dentre outros (MOU et al., 2015; MAO et al., 2013).

A capacidade de atuar na progressão tumoral do câncer de mama se dá por meio de variadas formas, dentre elas ressalta-se a secreção de enzimas proteolíticas como as MMPs-2 e 9, que degradam componentes da membrana basal e, por consequência, facilitam a invasão de células tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos. Além disso, os TAMs também secretam citocinas que controlam mecanismos fisiológicos envolvidos na progressão tumoral, como citocinas imunossupressoras exemplificadas CCL2 e IL-10, a IL-8 que induz angiogênese, bem como o TNF α que propicia o crescimento tumoral e invasão (MOHAMED et al., 2014). Cabe ressaltar ainda que essas células também sintetizam SPARC/osteonectina, uma proteína ácida e rica em cisteína, importante para a deposição do colágeno IV, que aumenta a invasão de células tumorais e adesão a outros componentes da MEC como a fibronectina (QIAN; POLLARD, 2010).

Figura 11 - Atuação dos TAMs na tumorigênese.



Fonte: QIAN; POLLARD (2010) (Adaptado)

Os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue periférico, correspondendo a 50-70% dos leucócitos circulantes e essenciais na proteção do hospedeiro contra patógenos, atuando na primeira linha de defesa da imunidade inata junto aos macrófagos. Para tanto, o neutrófilo possui armas químicas capazes de eliminar os invasores, como lactoferrina, catelicidina, mieloperoxidase, catepsina, dentre outras (MISHALIAN et al., 2017; MOSES; BRANDAU, 2016).

Entretanto, os neutrófilos não são populações de células homogêneas, podendo apresentar diferenças na morfologia, densidade, marcadores de superfície, função e localização. Desse modo, dependendo do fenótipo apresentado, os neutrófilos podem ser classificados em anti-tumorais ou N1 e pró-tumorais ou N2. Assim, quando envolvidos pelo estroma tumoral, onde há um ambiente com condições físico-químicas e celulares peculiares, são denominados de *tumor-associated neutrophils* (TAN), e podem assumir um dos dois fenótipos, embora o subtipo N2 seja mais comum. Essas células, através dos seus mediadores químicos liberados, podem modular o microambiente tumoral e propiciar o desenvolvimento tumoral, angiogênese, progressão e metástase (SAHA; BISWAS, 2016).

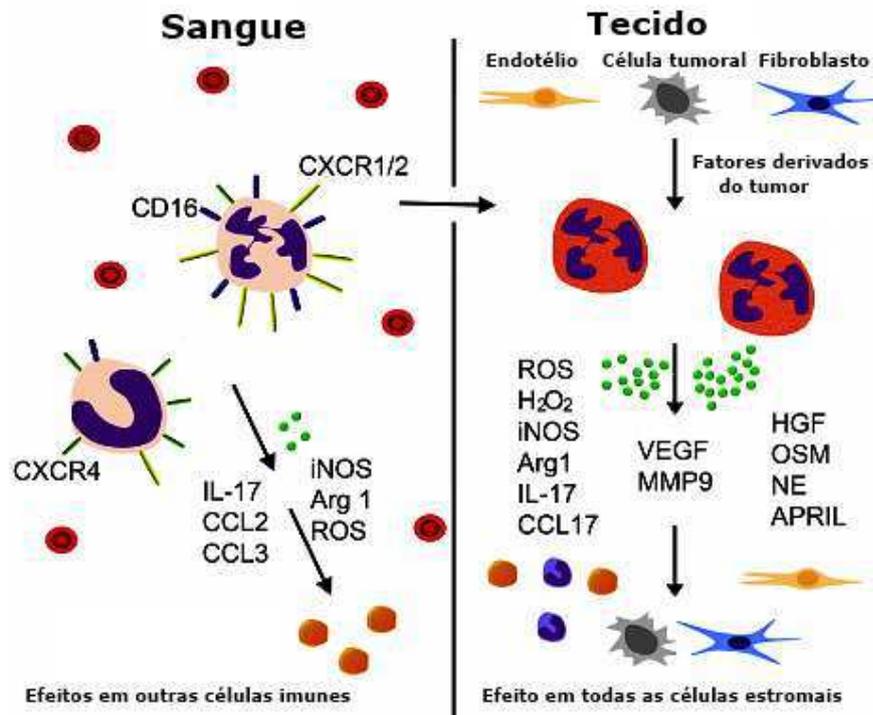
Os TANs com perfil fenotípico N1 produzem citocinas pró-inflamatórias, além de NO e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos citotóxicos para as células tumorais. Por sua vez, os TANs N2 produzem altos níveis de arginase 1 (ARG1), enzima deficiente em grande parte das células tumorais e essencial ao metabolismo de proteínas, bem como pode inibir as funções efetoras de células T. O microambiente tumoral pode influenciar diretamente na polarização dos neutrófilos e conversão do subtipos N1 em N2. O TGF β é uma das moléculas-chaves nesse processo. Na maioria das vezes, em estágios tumorigênicos iniciais, os neutrófilos possuem um fenótipo N1, e com a progressão tumoral, o microambiente propicia a aquisição do fenótipo N2 (HAGERLING; WERB, 2016).

Os neutrófilos podem atuar tanto no processo de tumorigênese, quanto na progressão tumoral (Figura 12). Essas células acompanham a inflamação crônica e criam um ambiente mutagênico capaz de iniciar e promover o desenvolvimento de um tumor, por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), com o surgimento de células pré-malignas, quebras no DNA, mutações pontuais, dentre outros (ELINAV et al., 2013).

No que diz respeito à progressão tumoral, os neutrófilos podem induzir a angiogênese por meio da degranulação de VEGF e remodelamento da MEC através da MMP-9. Em adição, em sítios metastáticos, os neutrófilos facilitam a neocolonização por células tumorais circundantes através da integrina-2 e *macrophage-1 antigen* (Mac-1) nos neutrófilos, que se

ligam ao ICAM-1 das células tumorais, ancorando-as em um novo local (HAGERLING; WERB, 2016).

Figura 12 - Influência dos neutrófilos no microambiente tumoral.



Fonte: MOSES; BRANDAU (2016) (Adaptado)

As MDSCs representam uma população heterogênea de células mielóides em estágios iniciais de desenvolvimento. Sob condições fisiológicas, correspondem a 20-30% das células da medula óssea. Contudo, podem se acumular em órgãos linfoides em condições patológicas como o câncer (TRIKHA; CARSON-III, 2014).

As MDSCs podem possibilitar a progressão tumoral por meio de mecanismos não imunossupressores e imunossupressores. Para exemplificar a primeira situação, salienta-se a promoção de angiogênese via MMPs (QU et al., 2016). No segundo caso, destaca-se (1) a inibição da ativação e função de células T por produção de ROS e RNS, interrupção da sinalização do receptor de IL-2 e por prevenir o reconhecimento peptídico entre antígeno/MHC de classe I, (2) depleção de arginina e cisteína, aminoácidos essenciais para a ativação e proliferação de células T, (3) inibição de células *natural killer* (NK) e sua consequente produção de IFN γ , (4) rompimento da migração de células T para os linfonodos através da secreção de ADAM 17 que interfere na ação da selectina I, bem

como (5) a expansão de células T regulatórias por meio da produção de IL-10, TGF β , IFN γ e interações ligante-receptor CD40 (OSTRAND-ROSENBERG et al., 2012).

Algumas moléculas, por meio de suas respectivas vias de sinalização, regulam a ativação e funcionalidade das MDSCs. Nesse contexto, cabe ressaltar que os fatores estimulantes de colônias e algumas citocinas contribuem para a expansão dessas células e outras citocinas pró-inflamatórias ativam-nas. Dentre os fatores estimulantes de colônias, destacam-se *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) e *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), produzidos por células tumorais e/ou estromais. No que se refere às citocinas, são importantes para a atuação das MDSCs a IL-3, IL-4, IL-6, IL-13 e INF- γ (DE-SANCTIS et al., 2016).

No decorrer do processo de progressão tumoral, as células neoplásicas podem progressivamente alterar o seu genótipo e, por consequência seu fenótipo, de modo a aproximarem-se de uma célula-tronco. Quando isso ocorre, são denominadas de *cancer stem cells* (CSCs). Desse modo, essas células adquirem um perfil invasivo devido a transição epitélio mesenquimal e, posteriormente, conseguem extravasar em órgãos distantes para formar macrometástases (BILL; CHRISTOFORI, 2015).

O microambiente tumoral influencia diretamente nessa conversão fenotípica de células tumorais à CSCs, tanto pelas condições físico-químicas, bem como pelas populações celulares. Em condições de hipóxias, com a produção de HIF1 α , sozinhos ou em cooperação com outros fatores de transcrição, há a ativação genes importantes para a TEM, como BMI1, TWIST, NOTCH, SNAI1 e Zeb-1. Um ambiente inflamatório também é bastante influente na TEM, através de citocinas inflamatórias, como TGF β , TNF α e IL-6, que ativam vias importantes para a transformação das células tumorais. Além disso, as células estromais podem ativar genes responsáveis por contribuir para a conversão de células tumorais em CSCs. Como exemplo, as células endoteliais podem ativar os genes EGF e Jagged, macrófagos podem atuar por meio da IL-18, plaquetas quando associadas à células tumorais circulantes (CTCs) secretam TGF β 1 e CAFs através de citocinas, quimiocinas (CXCL12 e CCL) e MMPs (PIETILÄ et al., 2016).

As CSCs são definidas como uma subpopulação de células resistentes à vários tratamentos com capacidades de autorrenovação e metástase que mantém o crescimento de tumores primários e secundários, devido a mecanismos moleculares intracelulares que auxiliam na redução da citotoxicidade proveniente de fármacos. Assim, após um ciclo de

tratamento, algumas subpopulações tumorais são destruídas, enquanto que as CSCs conseguem permanecer para repovoar o tumor (SKVORTSOV et al., 2015).

Para a resistência às terapias anti-câncer, há nessas células uma superexpressão de bombas de fármacos, que conseguem bombeá-los para o meio extracelular como os transportadores *adenosine triphosphate-binding cassette* (ABC) e enzimas envolvidas na detoxificação como a aldeído desidrogenase 1 (ALDH1). Além disso, as características morfológicas e funcionais das CSCs podem ser justificadas por várias vias de sinalização e marcadores moleculares presentes nas CSCs. Células tronco do câncer de mama (BrCSCs), por exemplo, são conhecidas por apresentarem positividade para CD44⁺ e baixa expressão de CD24. Dentre as vias de sinalização mais estudadas, salienta-se a NOTCH, Hedgehog, Wnt/ β -catenina, PDGF e EGF (VERA-RAMIREZ et al., 2010).

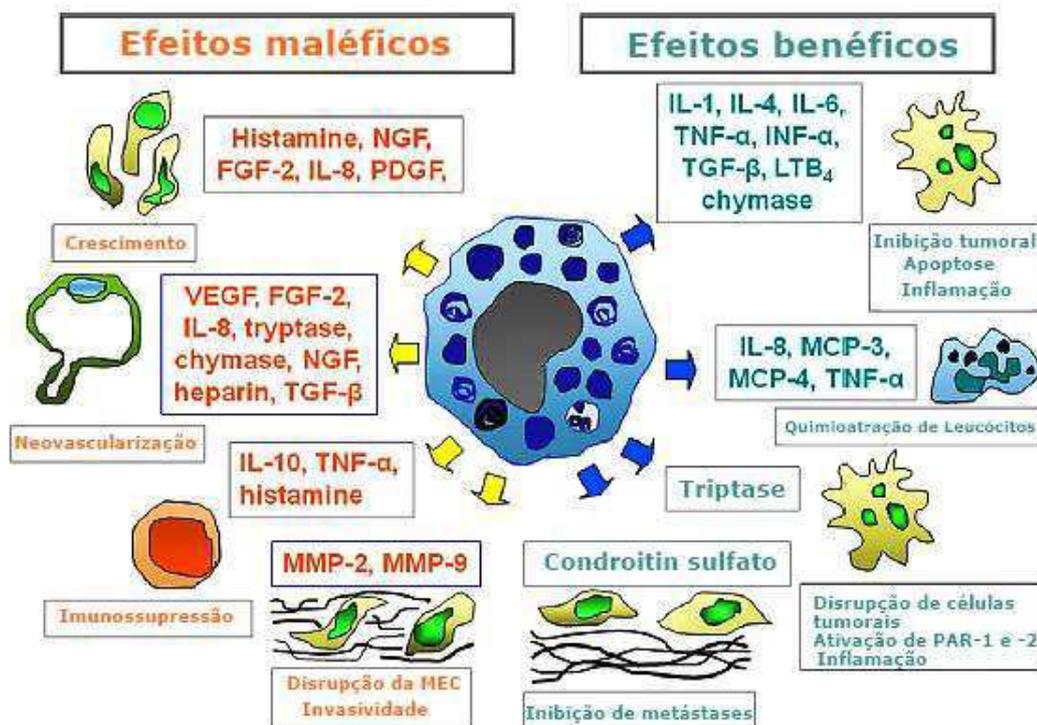
Os mastócitos são células secretórias derivadas da medula óssea identificadas em todas as classes de vertebrados, de peixes até os mamíferos mais derivados. Localizam-se estrategicamente em interfaces ambientais, como pele, vias aéreas, trato gastrointestinal e urogenital, próximos a vasos sanguíneos, nervos e epitélios (RIBATTI, 2015). Os mastócitos podem ser ativados através da ligação entre as imunoglobulinas (Ig) E e IgG em receptores específicos. Além das Igs mencionadas, outros sinais podem ativar essas células, tais como fatores complemento, citocinas, mediadores inflamatórios, ligantes dos *Toll-like receptors*, bem como células T (KORMELINK et al., 2014).

Essas células estão envolvidas em uma ampla gama de reações teciduais, desde inflamações até processos de cicatrização, na patogênese de várias doenças humanas (RIBATTI, 2015). No câncer, quando ativados, os mastócitos exercem papel importante no crescimento tumoral por meio de três grandes classes de mediadores: (1) granulares como a histamina, serotonina e proteases, (2) lipídicos como os leucotrienos - LTC₄ e LTB₄, e prostaglandinas (PG) - PGE₂ e PGD₂ e (3) citocinas e quimiocinas. Esses mediadores possibilitam o surgimento de um microambiente tumoral pelo aumento da angiogênese, promoção da proliferação celular, degradação e remodelamento da MEC, além de imunossupressão (Figura 13) (SHARMA et al., 2016).

Os mastócitos são a maior fonte de histamina, uma substância vasodilatadora, indutora de proliferação celular e supressora do sistema imune. Além disso, sintetizam e estocam fatores angiogênicos, como FGF-2, VEGF, IL-8, TNF α , TGF β e NGF, bem como MMPs que, juntos, promovem a vascularização e invasão tumoral, respectivamente (RIBATTI, 2016a; RIBATTI, 2016b). Essas células também podem atuar por meio de proteases como a triptase, enzima que aumenta a expressão de vários genes envolvidos

nas vias de sinalização de progressão do câncer, como VEGF, IL-8, MMP-9 e uPA. Uma outra contribuição dos mastócitos para o estroma tumoral é a interação destes com outras células do sistema imunológico, como as MDSCs através do aumento da produção de IL-17 e CCL2, e células T_{reg} por meio da IL-9, favorecendo a um microambiente inflamatório (SHARMA et al. 2016).

Figura 13 - Atuação nos mastócitos no microambiente tumoral.



Fonte: RIBATTI, 2016a (Adaptado)

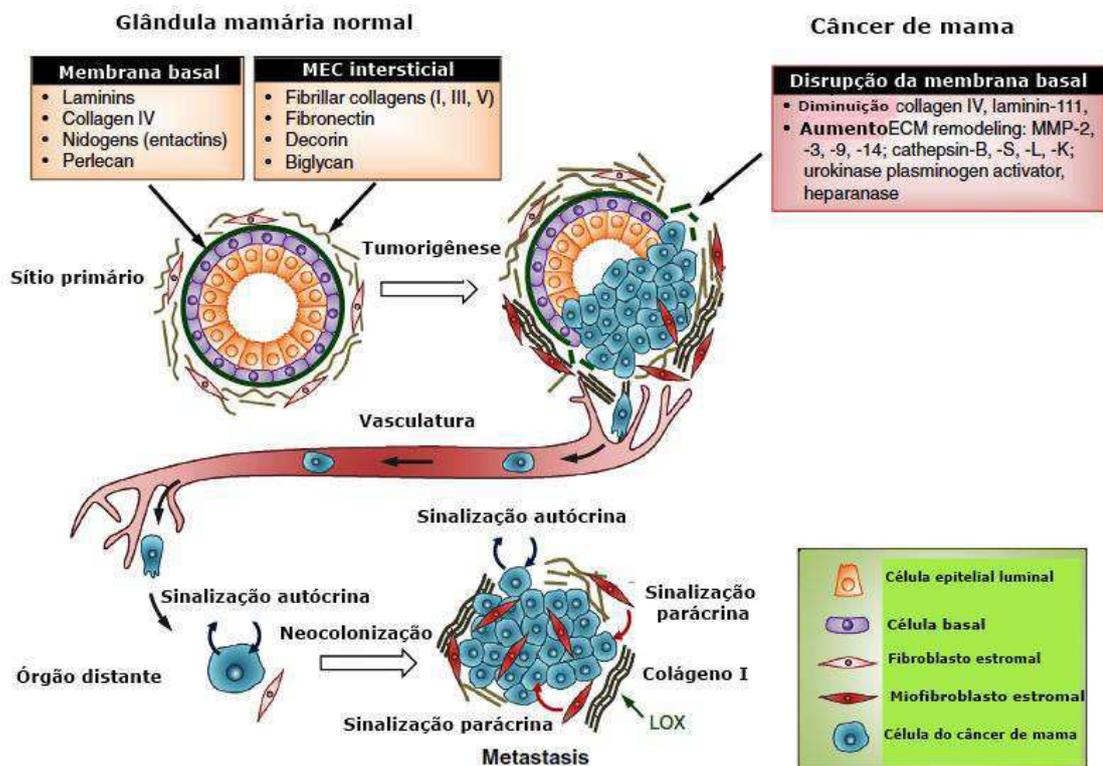
2.4.3 Matriz Extracelular e câncer

Um componente essencial para o desenvolvimento normal da glândula mamária é a sua matriz extracelular (MEC). Esta apresenta propriedades bioquímicas e biomecânicas que a torna uma estrutura versátil par modular vários comportamentos celulares, dentre eles a migração, sinalização e sensibilidade mecânica. Sendo assim, o remodelamento da MEC atua nos processos do desenvolvimento mamário, incluindo ramificação epitelial e diferenciação (HOWARD; LU, 2014).

A MEC é composta por uma mistura de componentes, dentre eles proteínas, proteoglicanos e polissacarídeos (Figura 14). Alterações nas propriedades bioquímicas e físicas na MEC estão associados à progressão tumoral e resistência à terapias. Além disso, o

remodelamento na arquitetura da matriz através dos componentes supracitados, interfere nas células estromais que envolvem o tumor, vindo a favorecer o desenvolvimento do mesmo (GIUSSANI et al., 2015).

Figura 14 - Influência da MEC na progressão tumoral do câncer de mama.



Fonte: INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON (2015) (Adaptado)

Dentre os componentes encontrados na MEC, encontra-se o colágeno, uma família proteica composta por aproximadamente 28 espécies geneticamente distintas. É constituído por meio do enrolamento de três polipeptídeos de cerca de 1000 aminoácidos, chamado de cadeias α . Cada uma delas caracterizada por uma unidade repetitiva $(\text{Gli-X-Y})_n$, com prolina e 4-hidroxiprolina representando uma grande fração de X e Y, embora possuindo um certo grau de heterogeneidade bioquímico e funcional, bem como a especificidade tecidual. Desse modo, os colágenos acumulam-se no MEC e interagem entre si e com outros componentes microambientais, como receptores de células (LUPARELLO, 2013).

O colágeno pode atuar na progressão tumoral do câncer de mama de vários modos. Dentre eles, destacam-se (1) a atuação como suporte para facilitar a migração de células neoplásicas ou células estromais infiltrantes, onde a disposição das fibras colágenas criam caminhos para a disseminação celular, (2) influência na diferenciação e proliferação de

células epiteliais mamárias, através do mecanismo dependente de proteína cinase associada à Rho (ROCK) e da ativação da via de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), respectivamente. Além destes, o colágeno pode ainda favorecer à progressão tumoral reativando células cancerígenas em dormência, por meio da PI3K, conferindo às mesmas um fenótipo invasivo (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2015).

A fibronectina é uma glicoproteína componente da MEC, que influencia positivamente em alguns processos celulares como crescimento, adesão, migração e transformação oncogênica. O motivo proteico RDG (arginina-glicina-aspartato) liga a fibronectina às integrinas, uma família proteica de superfície celular. Essa ligação propicia o aumento da expressão de algumas enzimas de remodelamento como a MMP-9 via cinase de adesão focal (FAK), resultando na sobrevivência celular e angiogênese (JEON et al., 2015). No contexto tumoral, a fibronectina pode ser sintetizada tanto por células neoplásicas, quanto por CAFs, onde o aumento dessa glicoproteína, aumenta também a compressão e, por sua vez, estimula o comportamento migratório de células tumorais. Quando encontrada em órgãos secundários, por estímulo de citocinas, a fibronectina pode auxiliar na formação de novos nichos metastáticos. Além disso, pode modular vias de sinalização responsáveis pela progressão tumoral como MAPK, STAT3 e IGFBP-3 (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2015).

Por sua vez, as lamininas (LMs) são proteínas glicosiladas das membranas basais, que auxiliam na polaridade celular e enviam sinais que comandam os processos de migração, diferenciação e expressão de alguns genes importantes. Estruturalmente, são heterotrímeros compostos por três subunidades α , β e γ variantes, de modo a formar 15 isoformas distintas (ZHANG et al., 2011). Funcionalmente, LMs podem ativar múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo componentes como GPCR, MAPK, fosfatases, pequenas GTPases da família Rho e componentes do citoesqueleto (KIKKAWA et al., 2016). No câncer de mama, algumas LMs são chaves para a progressão tumoral. Dentre elas, destacam-se a LM-111 componente da membrana basal e quebrada ao longo da progressão do câncer e a LM-332 produzidas por miofibroblastos e auxiliadoras na sobrevivência celular via PI3K-AKT, bem como indutoras de invasão e migração via integrina $\alpha 3$. Além destas, em menor proporção, a LM-511 atua na migração, invasão tumoral e metástase (OSKARSSON, 2013).

Os proteoglicanos (PGs) estão entre as biomoléculas mais importantes nos aspectos estrutural e funcional dos tecidos. Morfologicamente, elas consistem em um eixo proteico, onde uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) estão ligadas covalentemente. Podem ser localizados intra ou extracelularmente, onde interagem com inúmeros fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, receptores de superfície celular e moléculas da MEC,

influenciando em processos celulares como proliferação, migração, diferenciação, apoptose e adesão (SCHAEFER, 2014; THEOCHARIS et al., 2016).

Os GAGs são longos heteropolissacarídeos com grande quantidade de cargas negativas que apresentam repetições de dissacarídeos compostos principalmente por N-acetil hexosaminas e ácidos D/L-hexurônicos, biossintetizadas na membrana celular e não no aparelho de Golgi (THEOCHARIS et al., 2016). Assim, bastante presentes na MEC, possuem grande diversidade funcional, influenciando na estruturação e organização tecidual, coagulação sanguínea, morfogênese, imunologia e processos patológicos. A maioria dos GAGs apresentam sítios de ligação para proteínas, como FGFs e VEGF, além de citocinas e quimiocinas importantes na migração celular, resposta imune e rolamento de leucócitos pelas células endoteliais (ROBINSON et al., 2012).

Ao longo da transformação maligna, os GAGs são altamente modificados pelo microambiente tumoral, no qual as células estromais alteram a expressão de enzimas envolvidas na produção dessas moléculas, como epimerases e sulfotransferases, afetando a sinalização das células neoplásicas, crescimento, adesão celular, migração e angiogênese (SKANDALIS et al. 2014). Em tumores malignos, incluindo o câncer de mama, observou-se um aumento na expressão de GAGs, associado à um pobre prognóstico. Essas observações são corroboradas por estudos *in vivo* em linhagens celulares de câncer de mama de ratos, onde os GAGs aumentaram a motilidade celular e invasão (DU et al., 2012).

Além disso, outros estudos demonstraram interações entre GAGs e fatores de crescimento de MMPs, resultando na ativação de pró-MMPs e sua consequente ação no remodelamento na MEC, sugerindo um mecanismo de ação para a atuação dos GAGs na invasão e metástase (BOURIS et al., 2015). Em contrapartida, alguns GAGs atuam suprimindo a proliferação celular, como é o caso da decorina, que pode regular negativamente a produção de fatores pró-angiogênicos e interagir com o EGFR e IGFR para evitar ativação de vias de sinalização para proliferação celular (FEUGAING et al., 2013).

Além dos componentes estruturais, a MEC apresenta proteínas com ação enzimática que atuam no seu remodelamento. Na mama, essas enzimas são por vezes ativas para auxiliar na involução da glândula após o período de lactação. Contudo, a ativação das mesmas pode ocorrer em função de alguma condição patológica, como por exemplo em neoplasias mamárias. Dentre as principais enzimas remodeladoras da MEC, destacam-se as MMPs, o *urokinase plasminogen activator* (uPA), as catepsinas e as enzimas da família lisil oxidase (LOX) (OSKARSSON, 2013).

As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio que necessitam do íon zinco como cofator para exercer sua função catalítica. Essas enzimas são importantes para a degradação estromal, e conseqüentemente, relevantes na invasão tumoral e metástase. Além disso, as MMPs atuam clivando fatores de crescimento, fatores pró-apoptóticos, receptores de superfície celular, moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, ativando-os e propiciando às células tumorais um fenótipo agressivo (CID et al., 2016).

No câncer, as MMPs são bastante expressas nos CAFs, resultando em uma grande influência no remodelamento da MEC e, dessa forma, acelerando a aquisição de propriedades importantes para a progressão tumoral como angiogênese, crescimento e metástase. A regulação da expressão dessas enzimas se dá por meio de modificações pós-transcricionais, dependência de zinco para ativação e presença de inibidores teciduais de MMPs. Desse modo, as condições microambientais geradas pelo tumor desregulam um ou mais mecanismos regulatórios supracitados e favorece uma superexpressão desses remodeladores de MEC (CATHCART et al., 2015).

Ao longo do desenvolvimento mamário, os processos de morfogênese são regulados por MMPs, tais como a -2 e a -3, que remodelam a MEC para a ramificação dos ductos. Durante o processo de involução ou câncer, algumas MMPs são superexpressas como a MMP-2, -3, -9, -14 (OSKARSSON, 2013). Para MMP-2 e -9, um estudo foi realizado com 90 pacientes portadoras de câncer de mama, onde foram analisadas amostras teciduais e soro, refletindo em uma associação entre a concentração dessas enzimas e o tamanho tumoral (LIU et al., 2006).

Em linhagens de células epiteliais mamárias, observou-se que a superexpressão de MMP-3 é suficiente para indução espontânea da progressão da doença. Shay et al. (2015) ressalta que a MMP-9 não apenas promove a invasão tumoral, mas também é responsável pelo recrutamento de MDSC ao nicho metastático. Por sua vez, a MMP-14 atua estimulando os CAFs na liberação de sindecan-1 (SDC-1), um GAG importante na promoção de fenótipos agressivos em células tumorais via FGF-2 (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2015).

O uPA, uma serinoprotease que atua clivando o plasminogênio inativo em plasmina ativa, e seu receptor *urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR) compõem um sistema importante no remodelamento da MEC, onde as interações entre estes exercem papéis críticos no processo de invasão e metástase. O sistema uPAR-uPA está envolvido com a ativação de vias de sinalização como MAPK, Src, Fak, PI3K-Akt que tem uma grande atuação na migração celular (PAVÓN et al., 2016).

A regulação da expressão desses genes (uPA e uPAR) é importante para compreender as condições nas quais os mesmos são necessários ao desenvolvimento tumoral. Nesse contexto, o promotor do gene uPAR contém alguns sítios de ligações a algumas moléculas, dentre elas o HIF1 α , demonstrando que condições de hipóxia são estimulantes para a ativação desse sistema remodelador da MEC (NOH et al., 2013).

No câncer de mama, há uma relevante associação entre a atividade do sistema uPA-uPAR e a progressão, metástase e pobre prognóstico clínico da doença. Além disso, a alta expressão de uPAR é usada como um marcador de curta sobrevivência livre da doença (TANG; HAN, 2013). Em alguns subtipos de câncer de mama, como o HER-2 por exemplo, há uma cooperação entre esse oncogene e o sistema uPA-uPAR, potencializando as propriedades invasivas do tumor (CHANDRAN et al., 2015).

Uma outra classe de enzimas importantes para a remodelação da MEC são as que pertencem a família lisil oxidase (LOX), amino oxidases dependentes de cobre que catalizam a reticulação de colágenos e elastina na MEC, auxiliando na homeostase celular. Contudo, em alguns cânceres incluindo o de mama, enzimas da família LOX estão em elevada atividade, o que resulta no aumento da tensão da MEC e rigidez, fatores relevantes para a progressão de tumores mamários, por meio da sinalização de integrinas. Assim, há uma correlação entre a expressão de LOX e o aumento da malignidade e invasividade (MOHAMMED et al., 2015; HAN et al., 2016). Além do mecanismo de remodelamento da MEC, as LOXs podem contribuir para o aumento de um perfil invasivo no câncer de mama via segundos mensageiros gerados pela reticulação dos colágenos e elastina, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (TAYLOR et al., 2011).

No câncer de mama, evidencia-se que a LOX-12 é superexpressa e tem influência direta na tumorigênese através da proliferação celular, inibição da apoptose e aumento da taxa de mutações. Tumores de mama HER2+ possuem uma maior expressão de LOX-12, se comparados com tumores HER2-. Além disso, há uma associação entre a superexpressão de LOX-12 e o comprometimento linfonodal (SCHNEIDER; POZZI, 2011).

No que diz respeito à influência do microambiente, observa-se que, sob condições de hipóxia, células tumorais mamárias secretam concentrações altas de LOXs induzindo lesões ósseas, principalmente em pacientes RE (-), bem como disrupção de junções aderentes derivadas de E-caderina e N-caderina osteogênica, favorecendo metástases ósseas (KIMBUNGA et al., 2015).

As catepsinas também são enzimas relevantes para as alterações na morfologia da MEC. São proteínas localizadas no interior dos lisossomos, e possuem uma cisteína

conjugada à uma histidina em seu sítio ativo. Há onze catepsinas conhecidas na espécie humana, sendo diferenciadas por letras maiúsculas - B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X. A expressão dessas proteínas varia em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento, onde sua regulação é feita por modificações pós-transcricionais e inibidores endógenos (NANUT et al., 2014; VERBOVSEK et al., 2015).

Embora as catepsinas sejam importantes para a homeostase celular, em condições patológicas, elas podem estar superexpressas e, desse modo, contribuir com a progressão da doença. No câncer, essas enzimas geralmente apresentam localização celular alterada, além de atuação em processos distintos como angiogênese, invasão através da MEC e metástase (WITHANA et al., 2012).

No câncer de mama, a catepsina B está envolvida na degradação do colágeno tipo IV e invasão tumoral (IMBRAHIM et al., 2016). Por sua vez, a catepsina K têm sido observada em CAFs e TAMs de carcinoma mamário, exercendo funções de degradação da MEC, angiogênese e invasividade via interações parácrinas, bem como osteólise e metástases ósseas (VERBOVSEK et al., 2015). Em subtipos específicos, observa-se que em tumores HER2+ há uma maior atividade da catepsina B e L propiciando uma maior invasão celular (RAFN et al., 2012), assim como em cânceres de mama inflamatórios, a catepsina B é correlacionada com o aumento do número de linfonodos comprometidos e uma maior invasividade, tendo em vista que essa enzima redistribui-se dentro de vesículas endocíticas da periferia celular, ocasionando sua secreção e associação à superfície celular para degradar os componentes da MEC, principalmente o colágeno tipo IV, como já mencionado (VICTOR et al., 2011).

2.5 GLICOBIOLOGIA E CÂNCER

Os carboidratos apresentam-se de maneira abundante na natureza e praticamente todos os organismos sintetizam e/ou metabolizam essas macromoléculas. A grande heterogeneidade dos carboidratos é resultado das inúmeras combinações entre tipos e números de resíduos através de ligações glicosídicas, das características estruturais dessas moléculas, do tipo de ligação anomérica e da ausência/presença de ramificação (GHAZARIAN et al. 2011).

Em eucariotos, mais de 50% das proteínas são glicosiladas ao longo de sua formação, confirmando que a glicosilação é a modificação pós-traducional mais abundante nas proteínas (TAKAHASHI et al., 2016). Os carboidratos vêm ganhando bastante atenção devido a sua complexidade e não codificação no genoma, expandindo o campo da glicobiologia (GHAZARIAN et al. 2011). Assim, estudar a estrutura e função dos carboidratos nos

organismos permite uma melhor compreensão da dinâmica de inúmeros processos patológicos.

O perfil celular de carboidratos depende do balanço na concentração de duas classes enzimáticas – glicosiltransferases e glicosidases. As glicosiltransferases e as glicosidases são as enzimas responsáveis pela adição e subtração de monômeros, respectivamente, em estruturas de carboidratos. Quando associados à proteínas, estes modulam a interação da mesma com seu microambiente, influenciando em características importantes para a funcionalidade proteica, como meia-vida, solubilidade, capacidade de ligação e especificidade. A localização intracelular dessas enzimas incluem o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, citosol e núcleo. Elas são responsáveis pelos dois principais tipos de glicosilação proteica: (1) glicosilação N-ligada e (2) glicosilação O-ligada (GLAVEY et al., 2015).

A glicosilação N-ligada inicia-se na face citoplasmática da membrana do retículo endoplasmático a partir de uma molécula de dolicol fosfato. Esta recebe, primeiramente, uma molécula de N-acetilglicosamina (GlcNAc). Subsequentemente, ocorre a adição de mais uma molécula de GlcNAc e cinco resíduos de manose (Man), originando $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Nesse momento, essa cadeia é translocada para a face interna na membrana do retículo por meio de flipases e recebe mais quatro resíduos de Man. Por fim, é adicionado a cadeia três resíduos de glicose (Glc) para gerar a cadeia $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Esta é adicionada a sequência Asn-X-Ser/Thr dos polipeptídeos alvos (BANERJEE, 2012; AEBI, 2013).

Por sua vez, a glicosilação O-ligada ocorre nas vesículas do Golgi e é iniciada pela ligação de uma GalNAc a um resíduo de serina ou treonina, gerando uma cadeia GalNAc-Ser/Thr. Esta é incomum em proteínas normais, porém muito encontrada em tumores, sendo considerada um antígeno neoplásico. Além deste, a adição de ácido siálico à GalNAc pode ser considerado também um antígeno tumoral denominado *Sialyl-Tn*. A glicosilação O-ligada está estruturada em *cores* – 1, 2, 3 e 4. Para gerar o core 1, é adicionado à cadeia GalNAc-Ser/Thr uma galactosamina (Gal), que pode ser seguida de ácido siálico ou GlcNAc para prevenir o core 2. A adição de GlcNAc e Gal à GalNAc inicial dão origem ao core 2. Para gerar o core 3, a molécula de Gal ligada ao GalNAc inicial é retirada e dá lugar a uma GlcNAc, que pode ser seguida de ácido siálico e Gal, para estabilizar o core 3 e prevenir o core 4. Por fim, para originar o core 4, é adicionado à GalNAc inicial uma molécula de GlcNAc e uma Gal (CHIA et al., 2016).

No câncer, os carboidratos exercem influência sobre vários mecanismos celulares e moleculares de progressão tumoral, como sinalização e comunicação celular, perda de adesão

e invasão, interações células-matriz, angiogênese, modulação imune e metástase, oferecendo suporte para as relações entre o tumor e seu respectivo microambiente, bem como um conjunto de alvos para diagnóstico e estratégias terapêuticas (PINHO; REIS, 2015).

Nesse contexto, as lectinas são proteínas ou glicoproteínas altamente específicas que tem capacidade de ligar-se, de modo específico, a carboidratos por meio de domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs). São encontradas em bactérias, plantas e animais, onde nestes últimos estão geralmente relacionadas com as interações celulares (CHAN; NG, 2013; YAU et al., 2015).

As lectinas podem interagir não apenas com oligossacarídeos de superfície celular, mas também com monossacarídeos circulantes. As interações das lectinas com seus respectivos carboidratos-alvos podem ser tão específicas quanto outras conexões biológicas, tais como antígeno-anticorpo e substrato-enzima. Além disso, uma peculiaridade das lectinas é que suas ligações com os carboidratos são relativamente fracas com dissociações constantes (GHAZARIAN et al. 2011). Sendo assim, o que mantém a interação é o número de ligações entre os componentes e não a força de cada ligação.

Algumas lectinas apresentam afinidade por ácido siálico, onde os receptores com afinidade para esse carboidrato são amplamente encontrados em vírus e superfícies celulares. Dessa forma, essas lectinas podem fornecer ferramentas úteis para estudos bioquímicos de sialoglicoconjugados. A lectina proveniente de *Maackia amurensis* (MAA) é bastante utilizada como um controle positivo para comparar as constantes de ligação de novas lectinas de ligação ao ácido siálico, sendo isolada de sementes dessa espécie. Estruturalmente, essa lectina apresenta-se como um dímero, composto por subunidades proteicas de 70 kDa (KIM et al., 2015; KUMAR; SUROLIA, 2017). Estudos de afinidade revelaram que a MAA pode ligar-se a ácidos siálicos α 2-3-ligados a galactose (Gal), mas não α 2-6-ligados a galactose. Sendo assim, esses resultados confirmaram que a ligação dessa lectina tem mais afinidade pela terminação carboidrática Sia α 2-3-Gal β 1-4Glc(NAc) em glicídios N-ligados (GEISLER; JARVIS, 2011).

Uma outra lectina que apresenta afinidade pelo ácido siálico é a lectina isolada da espécie *Sambucus nigra* (SNA-I). O primeiro relatório de uma lectina de sabugueira que descreve o isolamento e a caracterização parcial dessa molécula no tecido de casca dessa espécie data de 1984. Poucos anos depois, descobriu-se que esta lectina exibe especificidade única para a terminação glicídica Sia α -2-6-Gal/GalNAc, o que faz dela uma ferramenta poderosa na pesquisa de glicoconjugados (SHAHIDI-NOGHABI et al., 2010; SHANG; VAN DAMME, 2014).

Os ácidos siálicos compõem uma família de aproximadamente 50 carboidratos ácidos, cuja cadeia principal apresenta nove carbonos carboxilados. Estes são encontrados geralmente nas subunidades terminais dos carboidratos e glicoconjugados, podendo sofrer modificações no grupamento amino do carbono 5 por meio de radicais acetil e glicolil ou nas hidroxilas dos carbonos 4, 7, 8 e 9 por meio de acetatos, lactatos, sulfatos, dentre outros (AMON et al., 2014).

Os ácidos siálicos conferem importantes propriedades biológicas e biofísicas aos organismos, auxiliando-os na manutenção da homeostase. No que diz respeito às propriedades biofísicas, observa-se que os ácidos siálicos conferem (1) hidrofiliabilidade à superfície celular, (2) repulsão entre moléculas de superfície celular adjacentes, (3) interação com receptores endógenos como as selectinas, bem como (4) mascaram potentes ligantes para interação com macrófagos (VARKI; GAGNEUX, 2012).

Na imunomodulação, esses carboidratos estão envolvidos no processo de “fuga” do sistema complemento, interação com células endoteliais para escape da corrente sanguínea via selectinas, comprometimento da atividade de células NK, inibição da atividade de células T, alteração do fenótipo de macrófagos normais para TAMs, além de dificultar a maturação de células apresentadoras de antígenos (APCs) (PILLAI et al., 2012; BÜLL et al., 2014). Desse modo, o aumento da sialilação em células tumorais contribui para o escape dos ataques do sistema imunológico, bem como a modulação do microambiente e aquisição de propriedades invasivas.

A lectina conhecida como *Peanut agglutinin* (PNA), é uma lectina derivada do vegetal *Arachis hypogaea* (amendoim) e demonstra afinidade por β -galactosídeos em relação à outros monossacarídeos, demonstrando maior preferência pela sequência de carboidrato Gal β (1-3)-GalNac (NAKATA et al., 2016). A lectina de PNA tem sido amplamente utilizada no campo da glicobiologia em estudos de subtipagem de carboidratos em diversas linhagens celulares, inclusive tumorais (CANO et al., 2017).

A Gal é um monossacarídeo de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. A presença desse carboidrato contribui para a malignidade de tumores e aquisição de fenótipos metastáticos. Em condições de hipóxia, há um aumento da expressão de Gal nas células endoteliais que facilita o rolamento de células da corrente sanguínea e favorece a angiogênese. Além disso, tem sido demonstrado que a ligação desse carboidrato à família de lectinas mencionadas contribuem para a imunossupressão por modulação das atividades de células T, NK e APCs (HOCKL et al., 2016).

A lectina do germén de trigo (WGA), isolada da espécie *Triticum vulgare*, é uma proteína homodimérica estável (36 kDa) com oito locais de ligação específicos para N-acetilglicosamina (GlcNAc), que são separados por uma distância de 14 ångström (Å). Esta lectina exhibe especificidade para a terminação glicídica GlcNAc β (1-4)-GlcNAc β 1- e é composta por unidades monoméricas organizadas em quatro domínios com diferentes afinidades para GlcNAc. Tais características estruturais tornam essa lectina um modelo biológico exemplar para investigar o perfil de carboidratos e avaliar a influência de modificações estruturais dessas macromoléculas (KUMARI et al., 2016).

GlcNAc é um aminoaçúcar derivado de glicose com fórmula molecular C₈H₁₅NO₆. Em condições patológicas, como o câncer, a GlcNAc modula várias propriedades tumorais e microambientais. Com o aumento da expressão desse carboidrato, por meio da O-glicosilação, há um aumento no crescimento, invasão e metástase tumoral. GlcNAc regula a fosforilação de muitas proteínas importantes para a progressão tumoral, como oncogenes e supressores tumorais, bem como angiogênese por meio da regulação positiva de VEGF e metaloproteases, e invasão e metástase via E-caderinas e integrinas β 1 (GLAVEY et al., 2015; PINHO; REIS, 2015).

Assim, as lectinas vêm ganhando destaque em diversos aspectos nas pesquisas da área de oncologia, seja no âmbito do diagnóstico, terapêutica e prognóstico. Dentre estas, essas moléculas podem ser usadas para estudo de expressão com carboidratos, visando buscar correlações com evidências clinico-patológicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ❖ Investigar o perfil de carboidratos do estroma de CDIS e suas possíveis relações com os dados clínico-patológicos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar os pacientes do estudo quanto aos dados clínico-patológicos
- ❖ Caracterizar histologicamente o estroma de CDIS
- ❖ Identificar a proporção tumor-estroma das amostras
- ❖ Avaliar o perfil de carboidratos do estroma de CDIS a partir das lectinas WGA, PNA, SNA e MAA.
- ❖ Avaliar a relação entre a expressão de carboidratos no estroma e as características clínico-patológicas do CDIS

4 METODOLOGIA

4.1 PACIENTES

Os pacientes foram selecionados com base no seu diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Todos os pacientes que receberam qualquer tratamento oncológico antes do procedimento de biópsia de diagnóstico foram excluídos do estudo. Os dados clínicos e histopatológicos utilizados na caracterização dos pacientes foram idade, tamanho do tumor e status de receptores hormonais (estrógeno e progesterona).

4.2 AMOSTRAS

17 biópsias de CDIS (com representação estromal) foram selecionadas e requisitadas no Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HCP). O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 06586612.9.0000.5208 – N°. 140.876).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA

O estroma de CDIS foi identificado e classificado sob microscopia óptica (100x). As lâminas foram analisadas ao longo de toda sua extensão, diferenciando-se as áreas entre três categorias: (1) inclassificável, (2) tumor (células de câncer viável) e (3) estroma (fibrose, necrose, inflamação, lúmen [rodeado por células de tumor em todos os lados], muco e do músculo liso (PANAYIOTOU et al., 2015). Além disso, foram notificadas as modificações teciduais em decorrência da lesão, classificando o estroma em inflamatório, desmoplásico e normal (CAGNACCI-NETO, 2014).

4.4 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS

Foram utilizadas as lectinas WGA (Agglutinina de Gérmen de Trigo), MAL-II (Lectina de *Maackia Amurensis*), SNA (Lectina de *Sambucus nigra*) e PNA (Lectina de Amendoim) todas conjugadas à biotina (Vector Laboratories Inc., EUA). As especificidades das lectinas estão descritas na tabela 3. Para a histoquímica, cortes de tecidos em parafina (4µm) foram

desparafinizados em xilol e reidratados em etanol seriado (100 – 70%). As amostras foram, então, tratadas com solução de tripsina a 0,1% por 15 min a 37°C e incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS (tampão fosfato 100mM pH 7,2 contendo NaCl 150mM) por 30 min a 25°C. O PBS foi utilizado para lavagens entre cada etapa (2x 5min). Na sequência os tecidos foram incubados, separadamente, com as lectinas por 2 horas a 4°C. Após lavagem com PBS as lâminas foram incubadas com o polímero streptavidinaperoxidase (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) por 45 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com a diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina. Nos controles negativos, as lectinas foram substituídas pelo tampão PBS (VIEIRA-DE-MELLO et al., 2013).

4.5 PROPORÇÃO TUMOR-ESTROMA

A proporção tumor-estroma está emergindo rapidamente como um indicador prognóstico significativo em diferentes tipos de câncer. Coletivamente, muitos deles documentam uma associação de alto conteúdo estromal com pior prognóstico, porém no câncer de mama esses resultados ainda são controversos (DOWNEY et al., 2014). As lesões foram analisadas quanto à proporção de estroma adjacente ao tumor, sob um aumento de 100x em microscopia óptica, onde foram escolhidos três campos aleatórios, classificando-os em duas categorias: (1) estroma >50% (*High-stromal area*) e (2) estroma <50% (*Low-stromal area*) (MOORMAN et al., 2012). Cabe ressaltar que somente campos onde o estroma e o tumor estavam presentes foram classificados, com a presença de células tumorais por todos os lados da imagem microscópica (KRUIJF et al., 2011).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Variáveis estatísticas

4.6.1.1 Idade

A idade é um dado utilizado como fator preditivo de maior risco, afetando, por exemplo, os índices de sobrevida global e a frequência na ocorrência de metástases (CLAGNAN et al., 2008). Tumores com prognóstico mais reservado foram associados com uma faixa etária mais jovem, bem como tumores com melhor prognóstico foram associados

com uma faixa etária mais tardia (BENZ, 2008; PIRONE et al., 2012). Além disso, ao longo do processo de envelhecimento, é perceptível a modificação do estroma mamário no que diz respeito ao tipo, quantidade e organização da matriz extracelular (SANDHU et al., 2016), podendo ter influência sobre a glicosilação, tendo em vista que grande parte das proteínas estromais são glicosiladas.

4.6.1.2 Proporção Tumor-Estroma

Sendo o estroma peça fundamental no processo de carcinogênese e de progressão tumoral, a proporção tumor-estroma vem sendo bastante utilizada como fator prognóstico tanto em tumores portadores de receptores hormonais, quanto nos tumores que não apresentam os mesmos (DOWNEY et al., 2014; MOORMAN et al., 2012). Além disso, a localização do câncer de mama do tipo CDIS sofre influência da densidade estromal (HUO et al., 2016; URSIN et al., 2005), onde está comumente associado a outros fatores prognósticos (tais como grau histológico, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, entre outros), demonstrando assim a importância de se avaliar esse componente.

4.6.1.3 Receptores Hormonais

Os hormônios esteróides sexuais estimulam o crescimento e a divisão das células da mama, onde a observação de que os níveis endógenos de esteróides sexuais estão associados ao risco de câncer de mama e ao crescimento progressivo do tumor em mulheres pós-menopáusicas (FOLKERD; DOWSETT, 2013). No CDIS, alguns dados revelaram que a presença de receptores hormonais podem ser um fator prognóstico, influenciando no tempo de vida livre da doença ou padrão de invasividade (KARLSSON et al., 2014). Os receptores de esteróides podem estar envolvidos em alterações nos padrões de glicosilação por meio da mudança na expressão de enzimas responsáveis por estes processos (SALDOVA et al., 2014; NIANG et al., 2016; KOUSIDOU et al., 2008; KANWAL et al., 2013). Além disso, a expressão de receptores hormonais não se restringem às células tumorais. Células do estroma podem expressar esses receptores, atuando em sinergia para a modulação da progressão tumoral (HUANG et al., 2015).

4.6.1.4 Tamanho tumoral

O tamanho tumoral é o fator prognóstico tradicional que se correlaciona com a sobrevida global, o intervalo livre de metástases distantes, o status dos linfonodos axilares e o grau histológico (BAEK et al., 2014; FEI et al., 2015). Além disso, o tamanho do tumor no câncer de mama é importante também para a previsão do prognóstico, opções cirúrgicas, planejamento do tratamento adequado e monitoramento da resposta da terapêutica (BAEK et al., 2014; ISLAMI et al., 2015).

4.6.1.5 Lesões comedônicas

O CDIS pode apresentar regiões comedônicas, ou seja, um subtipo histológico de lesão mamária pré-invasiva caracterizada pela apoptose proeminente de células e maior potencial maligno se comparado a outros subtipos de CDIS (SHEKHAR et al., 2008). A presença de necrose do tipo comedo tem se associado fortemente com o risco de recorrência ipsilateral do câncer de mama, alto grau tumoral e, por consequência, uma prognóstico mais reservado (BANE, 2013). A presença de centros necróticos indicam um estado inflamatório devido a intensa degradação tecidual. Durante a inflamação, pode haver alterações nos padrões de glicosilação de muitas enzimas envolvidas na degradação estromal e, conseqüentemente, influência direta na progressão do CDIS para uma condição invasiva (GE et al., 2015).

4.6.2 Testes estatísticos

Os testes estatísticos foram realizados com o *software* Stata/MP 14.0. Para organizar os quadros com as informações descritivas, foram utilizadas frequências simples para cada evento. Para analisar os resultados da histoquímica com lectinas, a análise estatística foi realizada de acordo com Dos-Santos et al. (2012), considerando como positivo (3+: coloração positiva intensa e 2+: coloração positiva moderada) ou negativo (1+: coloração positiva fraca e 0: coloração negativa) para o estroma tumoral. Para investigar as possíveis correlações dos padrões glicídicos com os dados clínico-patológicos, foi utilizada uma regressão logística (LOGIT), tendo em vista que a variável dependente e algumas das variáveis independentes tem distribuição binomial. Os resultados foram considerados significativos com o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Os dados clínico-patológicos analisados para cada paciente foram a idade, tamanho tumoral, presença de lesões comedônicas, bem como o status de receptores hormonais no tumor (RE e RP). Os resultados estão sumarizados no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 - Dados clínico-patológicos dos pacientes analisados.

Dados clínico-patológicos		Nº de pacientes
Idade (anos)	< 50	5
	> 50	12
Tamanho tumoral (cm)	< 2,0 (T1)	2
	2.0-5.0 (T2)	9
	> 5.0 (T3)	6
Lesões comedônicas	Sim	11
	Não	6
Receptor de estrógeno	Positivo	9
	Negativo	8
Receptor de progesterona	Positivo	11
	Negativo	6

Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

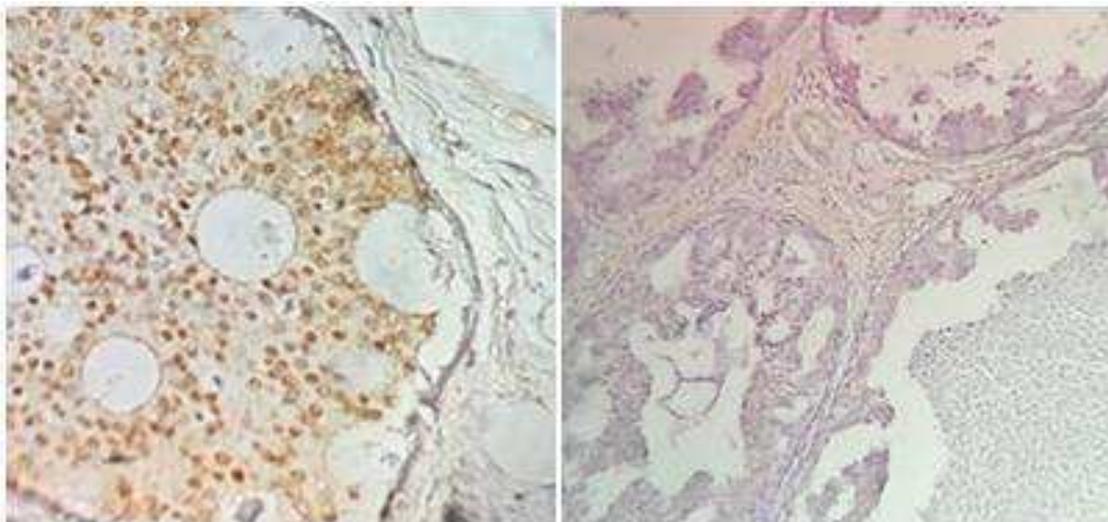
Há evidências, por métodos estatísticos, de que uma distribuição bimodal de idade fornece um melhor ajuste dos dados do que um modelo de distribuição unimodal (BENZ, 2008). Os pacientes analisados apresentaram, em sua maioria (70,59%), idade superior a 50 anos, corroborando o comportamento gradual a microevolutivo do câncer. Assim, é mais comum a presença do CDIS em mulheres acima dos 45-50 anos.

Como já descrito, o tamanho tumoral é o fator prognóstico tradicional, importante também para a previsão do prognóstico, opções cirúrgicas, planejamento do tratamento adequado, bem como o monitoramento da resposta da terapêutica (BAEK et al., 2014). O tamanho tumoral foi dividido em três categorias, segundo o sistema atual de classificação dos tumores mamários – sistema TNM. Observou-se que apenas duas pacientes (11,76%) apresentaram tumores menores que 2,0 cm (T1); isso pode ser resultado do perfil assintomático e não palpável do CDIS somado à ausência de rastreamento periódico das mamas. Assim, a maioria das pacientes apresentaram tumores de tamanho T2 e T3, com 52,94% e 35,29%, respectivamente.

No que diz respeito à presença de lesões comedônicas, nota-se que estas mostraram-se presentes em 64,70% dos pacientes. Esses centros necróticos, como já descrito, são caracterizados por alto grau celular, necrose central proeminente e microcalcificações pleomórficas, além de elevadas taxas de proliferação, culminando em um prognóstico mais reservado (SIZIOPIKOU, 2013).

Além desses fatores, analisaram-se também a presença/ausência dos receptores hormonais (progesterona e estrógeno) que, como já explicado, muitas vezes atuam em sinergismo na progressão da doença, já que tem influência no metabolismo das células tumorais. No caso do RE, observou-se quase uma simetria dos resultados, tendo em vista que o status positivo e negativo ocorreram em proporções similares (figura 15).

Figura 15 - Expressão dos receptores de estrógeno nas amostras de CDIS, com positividade à esquerda e negatividade à direita (sob aumento de 400x).



Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

O *status* para os receptores hormonais também foram avaliados no estroma, como ferramenta comparativa. Os resultados estão sumarizados no quadro a seguir (Quadro 3).

Quadro 3 - Quadro comparativo entre a expressão de receptores RE e RP na lesão e no estroma.

	<i>Status</i> do RE		<i>Status</i> do RP	
	Lesão	Estroma	Lesão	Estroma
Positivo	9	8	11	11
Negativo	8	9	6	6

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Diante dos resultados, percebe-se uma concordância entre a presença/ausência do receptores hormonais supracitados. Essa evidência pode ser resultado de um intercâmbio entre as células luminais normais e o estroma, ou ainda uma alteração da expressão gênica das células estromais mediante influência tumoral.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO CDIS

As lesões foram analisadas juntamente com o estroma circundante e algumas características histopatológicas foram assinaladas. Observou-se a integridade das barreiras mioepiteliais, concordando com o diagnóstico de CDIS. As células mioepiteliais são elementos de origem epitelial que adquiriram características mesenquimais parciais e funções contrácteis. Os marcadores mais proeminentes para essas células são citoqueratinas basais (5/6, 14 e 17), além de P-caderina, CD10, vimentina e α -SMA. As células mioepiteliais produzem proteínas da matriz de membrana basal, como lamininas e colágeno IV. A LM-1 está associada ao papel supressor de tumor dessas células, nas quais a má formação dessa isoforma causa desorganização da barreira, evidenciada em condições invasivas (INGTHORSSON et al., 2015).

Como já descrito, o estroma do CDIS foi classificado em três categorias – inflamatório, desmoplásico e normal. Os resultados encontram-se sumarizados, por grupo de lectinas, no quadro 4.

Quadro 4 - Classificação do estroma quanto às características histopatológicas.

Pacientes	Característica predominante no estroma	
	Inflamatório (%)	Desmoplásico (%)
MAL-II	47,06%	52,94%
PNA	47,06%	52,94%
SNA	47,06%	52,94%
WGA	58,82%	41,18%

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Com base nos resultados, notou-se que nenhum dos pacientes apresentaram uma estroma na condição normal, com o tecido conjuntivo adjacente bem organizado, fibras colágenas e elásticas com orientação unidirecional, bem como ausência de infiltrado inflamatório.

Para aos grupos das lectinas MAL-II, PNA e SNA, observou-se uma predominância discreta para um estroma desmoplásico, correspondendo a 52,94% das amostras, se comparado ao estroma inflamatório (47,06%). Para o grupo da lectina WGA, percebeu-se uma inversão onde 58,82% das amostras apresentaram um estroma inflamatório, se comparado ao desmoplásico (41,18%). Essa diferenciação entre o último grupo descrito pode ser explicada pelos diferentes planos de corte das lesões para confecção das lâminas, ou ainda os campos aleatórios escolhidos para análise.

A grande maioria dos cânceres de mama estão associados a uma resposta estromal gerada pela presença do tumor, assim como ocorre durante a cicatrização crônica de uma ferida. Uma das características observadas nessa reação estromal é a desmoplasia, condição estromal com aumento no número de fibras do tecido conjuntivo, além de uma mínima quantidade de componente celular. Este tipo de resposta estromal foi classicamente associado à presença de tumores com fenótipo maligno e benigno (ABBAS; MAHALINGAM, 2011).

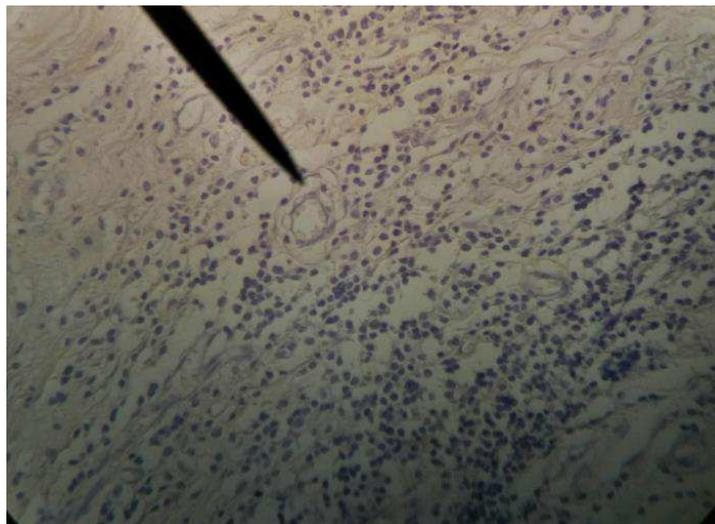
Muitas vezes, o aumento na densidade estromal pode estar relacionada à formação e progressão do tumor. Em modelos animais, observou-se que um incremento na densidade estromal provocou um aumento de 3 vezes na formação de tumores e metástases, o que sugere uma ligação entre o aumento do colágeno (através da LOX) e a progressão tumoral. Essas

transformações no estroma podem ter influência das alterações nos níveis circulantes de hormônios e o IGF-1, que desempenham um papel efetor na alteração da expressão gênica em seios densos (KHAMIS et al., 2012).

Além disso, a reação estromal pode ser um indicativo de remodelação da MEC, secreção de fatores de crescimento, migração celular e angiogênese. Assim, ocorre aumento acentuado da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, deposição de fibrina, ativação de plaquetas e infiltração de células inflamatórias, culminando na presença de um tecido de granulação, que juntos resultam na liberação de numerosas citocinas (RUDNICK; KUPERWASSER, 2012).

A presença do infiltrado inflamatório é considerado um dos *hallmarks* do câncer, ressaltando o importante papel das células imunes para essa doença (figura 16). O papel dessas células é uma verdadeira via de mão dupla; a presença de um infiltrado inflamatório no tecido tumoral está associado tanto a ação anti-tumoral, onde essas células do sistema imune atuam efetivamente no controle e na eliminação das células neoplásicas. No entanto, dependendo do fenótipo dessas células, pode ocorrer uma ação inversa; elas podem ser moduladas pelo tumor para exercer uma função pró-tumoral. Assim, uma reação imune eficiente exige que os leucócitos estejam no lugar certo e no tempo certo (MOUAWAD et al., 2011).

Figura 16 - Infiltrado inflamatório no estroma de CDIS (sob aumento de 400x).



Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

5.3 PROPORÇÃO TUMOR-ESTROMA

A presença de células estromais localizadas próximo ou no interior do tumor é parcialmente determinante da sua capacidade (pré) metastática. Ao longo da última década, a proporção tumor-estroma, do inglês TSR (*Tumor-stroma ratio*), ganhou interesse significativo na predição da doença de pacientes com câncer de mama, cólon, esôfago, pulmão e cervical (ZHANG et al., 2015). Assim, é aplicável para vários tipos de tumores sólidos, onde distingue-se tumores *high-stromal area* e *low-stromal area*.

Os resultados encontrados para o TSR das amostras analisadas, separadas por pacientes de cada grupo de lectinas, estão sumarizados no quadro a seguir (Quadro 5).

Quadro 5 - Proporção tumor-estroma das amostras analisadas.

Tumor-stroma ratio (TSR)		Lectinas			
		MAL-II (n)	PNA (n)	SNA (n)	WGA (n)
<i>High-stromal area</i>	>50%	9	10	8	8
<i>Low-stromal area</i>	<50%	8	7	9	9

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Para os pacientes representantes das lectinas SNA e WGA, observou-se uma predominância discreta (não significativa estatisticamente) para um *low-stromal area*, correspondendo a 52,94% das amostras, se comparado ao *high-stromal area* (47,06%). Para o grupo de pacientes representantes da lectina MAL-II, observou-se o inverso, onde o *high-stromal area* obteve 52,94%, se comparado ao *low-stromal area* (47,06%). Por fim, observa-se que os pacientes representantes da lectina PNA, apresentaram maioria para um estroma mais proeminente, com 58,82% do total. Mais uma vez, as diferenças entre os grupos podem ser resultado da aleatoriedade dos campos em análise.

Em estudos com tumores de mama, os resultados para o TSR como um fator prognóstico ainda é controverso. Moorman et al. (2012) mostraram que uma alta porcentagem de estroma prediz uma fraca sobrevivência em câncer de mama CDI triplo-negativo. Kruijff et al. (2011) também estudaram o valor prognóstico dessa variável e seus resultados

corroboraram os estudos anteriormente descritos, mostrando que o TSR como um fator prognóstico independente para a sobrevivência livre de recaída em pacientes com câncer de mama, especialmente o tumores triplo-negativo.

Por sua vez, Downey et al. (2014) demonstraram que, em tumores CDI RE-positivos não-inflamatórios, altas porcentagens de estroma estão relacionados com uma melhor sobrevida em ambos os gêneros, destacando a importância do *status* de RE para interpretação dos dados. Além desse estudo, Downey et al. (2015) estudaram ainda as relações entre o TSR e alguns dados clínico-patológicos em cânceres de mama inflamatórios e demonstraram que não há evidências de que a variável em questão tenha significado prognóstico nesse subtipo de câncer de mama. Quando comparado com os dados publicados no carcinoma de mama não inflamatório (anteriormente citado), observa-se que há diferenças na biologia do estroma dos tumores nos diferentes tipos de câncer de mama, ressaltando a heterogeneidade do microambiente tumoral e a importância de considerar isso ao interpretar o valor prognóstico da TSR.

5.4 EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL

Os glicídios são mediadores importantes na comunicação célula-célula, contribuindo para o intercâmbio de informações entre estas, fato importante quando se analisa as conexões entre o tumor e o microambiente tumoral. Sendo assim, alterações no perfil glicídico das células estromais podem modular processos fisiológicos importantes para a progressão tumoral (VAJARIA et al. 2016).

Os resultados obtidos na análise da expressão dos carboidratos nas amostras estão sumarizados no quadro abaixo (quadro 6) e ilustrados na figura 17.

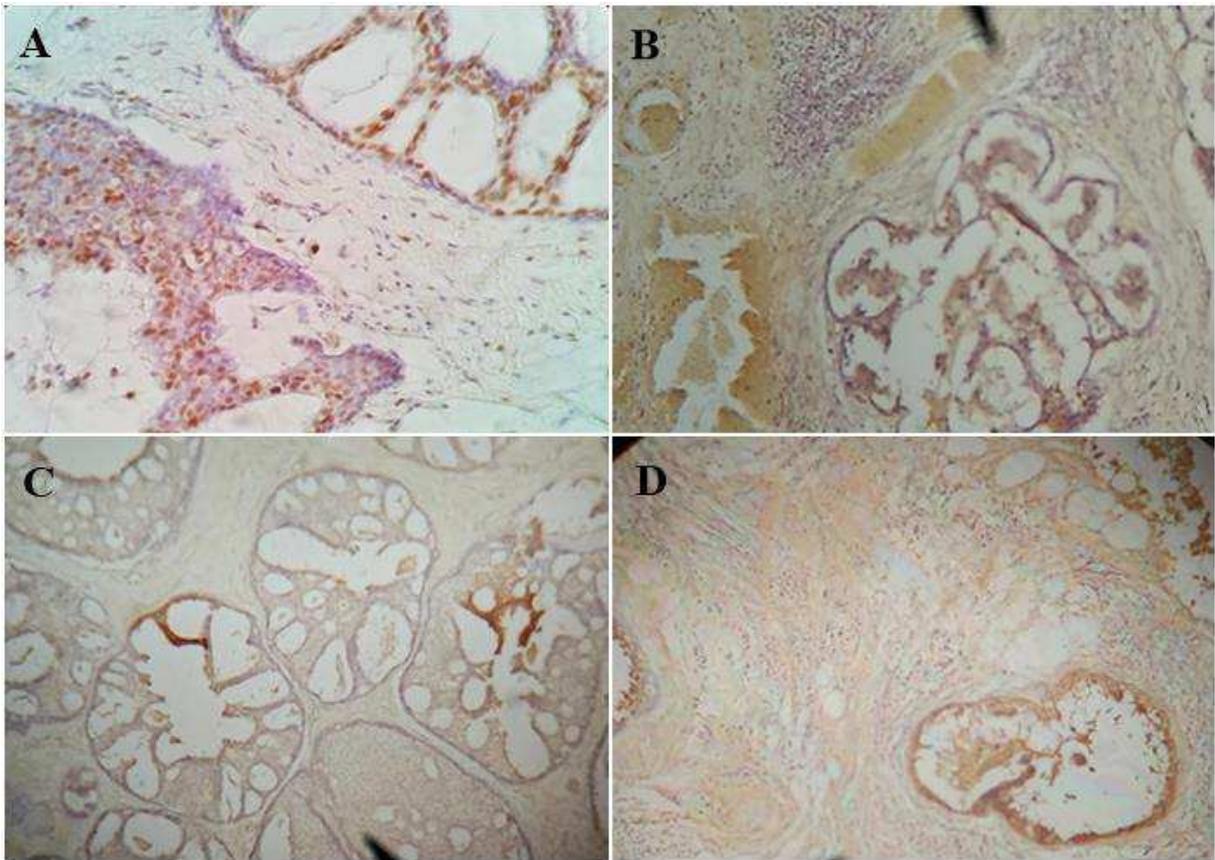
Quadro 6 - Expressão dos carboidratos no estroma tumoral.

Lectinas	Status	Nº de pacientes (%)
MAL-II	Positivo	11 (64,70%)
	Negativo	6 (35,30%)
PNA	Positivo	11 (64,70%)
	Negativo	6 (35,30%)

SNA	Positivo	7 (41,18%)
	Negativo	10 (58,82%)
WGA	Positivo	8 (47,06%)
	Negativo	9 (52,94%)

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Figura 17 - Histoquímica com lectinas em amostras de CDIS (sob aumento de 400x). (A) lectina SNA, (B) lectina MAL-II, (C) lectina WGA e (D) lectina PNA.



Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

De acordo com os dados obtidos, no que diz respeito à expressão de ácido siálico, observa-se que essa expressão no estroma tumoral é, em sua maioria, positiva (64,7%) para o resíduo de Sia α 2-3 e negativa (58,82%) para o resíduo de Sia α 2-6 (quadro 6). A alta expressão de ácidos siálicos apresenta relação com o potencial metastático nas células tumorais, de linhagens celulares de mama e outros tecidos, tais como cervical e gástrico

(LÓPEZ-MORALES et al. 2010; WANG et al., 2009). Assim, a presença desses resíduos na superfície celular aumenta a capacidade migratória dessas células (CUI et al., 2011). Além disso, durante o processo de migração, esses resíduos de carboidratos auxiliam na imunomodulação através da evasão do sistema complemento, bem como de células do sistema imunológico, tais como células *Natural Killer*, células mieloides, células dendríticas e células T CD4⁺ (BÜLL et al., 2014).

Os dados demonstraram que a expressão estromal de ácido siálico no CDIS apresenta, em maioria, negatividade para Sia α 2-6. Esse resíduo está intrinsecamente relacionado com a mobilidade celular, uma vez que apresenta a capacidade de modular os receptores de integrinas, proporcionando sua interação com o colágeno e a fibronectina, fato essencial para o traslado na MEC (YUAN et al., 2016). Além disso, a hipersialilação de células tumorais podem modular a eficácia de fármacos antineoplásicos e conferir resistência à radioterapia (BÜLL et al., 2017). Tendo em vista que o estroma atua, muitas vezes, de modo sinérgico para a progressão tumoral, o perfil de carboidratos dessas células podem atuar influenciando o perfil fenotípico de células neoplásicas. Sendo assim, a expressão de ácido siálico do estroma pode auxiliar o tumor ao longo do processo migratório, permitindo uma maior invasividade. Para o CDIS, observou-se uma maioria negativa para a expressão deste carboidrato, corroborando o comportamento desse tipo de tumor de mama, que ainda acumulou modificações necessárias para adquirir um perfil invasivo.

A expressão estromal de ácido siálico no CDIS apresenta, em maioria, positividade para Sia α 2-3. Burchell et al. (1999) mostraram que, em tecidos mamários tumorais, há uma maior expressão desse resíduo de carboidrato se comparados com tecidos mamários normais. Além disso, os resíduos de Sia α 2-3 estão correlacionados positivamente com o comprometimento linfonodal axilar, bem como a redução da sobrevida global dos pacientes (RECCHI et al., 1998; HEBBAR et al., 2003). Cui e colaboradores (2016) demonstraram que, em linhagens MDA-MB-231, o aumento na expressão de resíduos de Sia α 2-3 foi correlacionado positivamente com a invasão e a migração celular, além da modulação da expressão de moléculas envolvidas no processo de invasão, tais como integrina β 1, MMPs 2 e 9, além de COX-2. Esses dados solidificam a ideia de que os resíduos carboidráticos em questão auxiliam para uma condição invasiva da doença. Em confronto com os dados obtidos nesse trabalho, nota-se que a positividade encontrada para a expressão no microambiente tumoral pode significar uma atividade preparatória do mesmo para uma condição invasiva posterior.

No quadro abaixo (Quadro 7), encontra-se o perfil de expressão dos carboidratos no estroma considerando a presença/ausência de comedos.

Quadro 7 - Perfil de expressão de carboidratos no estroma considerando a presença/ausência de comedos.

Lectinas	Status	Comedônico	Não-comedônico
		n (%)	n (%)
MAL-II	Positivo	5 (29,41)	6 (35,30)
	Negativo	5 (29,41)	1 (5,88)
PNA	Positivo	7 (41,17)	4 (23,53)
	Negativo	4 (23,53)	2 (11,76)
SNA	Positivo	4 (23,53)	3 (17,65)
	Negativo	7 (41,17)	3 (17,65)
WGA	Positivo	7 (41,17)	1 (5,88)
	Negativo	4 (23,53)	5 (29,41)

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Para a expressão do resíduo Gal β (1-3)-GalNac, marcado pela lectina PNA, foi encontrado maioria positiva (64,70%) nas amostras (dados expostos no quadro 6). O resíduo em questão, conhecido como antígeno Thomsen–Friedenreich (TF), geralmente encontra-se mascarado por outros carboidratos em células normais. Em contrapartida, essa estrutura é conhecida por ocorrer em cerca de 90% de todos os cânceres (SINDREWICZ et al., 2016). Esse resíduo de carboidrato, por manter potenciais interações com a galectina-3, está envolvido em vários processos celulares fundamentais como o *splicing* de pré-mRNAs, crescimento e diferenciação celular, regulação da apoptose, bem como o reconhecimento e a adesão celular. Com isso, esse carboidrato também está associado com um aumento do fenótipo maligno e metastático (GLINSKY et al., 2001). Sendo assim, o estroma tumoral nas amostras de CDIS demonstraram uma positividade para a expressão desse carboidrato, podendo ser um indício de modulação inicial do estroma para o suporte tumoral.

Por sua vez, os resíduos de GlcNAc β (1-4)-GlcNAc β 1- apresentaram uma expressão muito proporcional no estroma das amostras de CDIS, observando-se uma negatividade muito discreta para o mesmo (52,94%) (quadro 6). Esse resíduos carboidráticos estão envolvidos em uma série de eventos para que contribuem para a progressão tumoral. Ma e Vosseller (2014) destacam a ação desses resíduos em vários hallmarks no câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Para a proliferação celular, esses carboidratos conferem estabilidade para moléculas

envolvidas no ciclo celular, como a ciclina D e o c-myc. Esse formato de glicosilação propicia ainda uma maior sobrevivência celular por meio da ativação da via NFκB, bem como favorecem à angiogênese e ao processo de invasão e metástase por meio da expressão de VEGF/MMPs 2 e 9 e estabilidade de moléculas envolvidas na TEM, respectivamente. Os resíduos de GlcNAc atuam ainda como um “sensor nutricional”, regulando o metabolismo energético da célula (JÓZWIAK et al., 2014). Em confronto com nossos dados, percebe-se uma expressão discreta desse carboidrato, concordando com o fenótipo do CDIS.

Em suma, supõe-se que a expressão dos carboidratos no estroma podem estar em concordância com o fenótipo que o tumor apresenta. À medida que ocorre a progressão tumoral, mais características vão sendo adquiridas e, por meio da modulação tumoral via comunicação tumor-estroma, a expressão dos carboidratos no microambiente podem ir se modificando para atender às necessidades da doença. Contudo, para observar essas modificações, se faz necessário avaliar a expressão desses carboidratos em tumores de condição invasiva.

5.5 PERFIL DE CARBOIDRATOS E DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Como já descrito, os dados clínico patológicos apresentam uma grande importância para uma melhor compreensão da doença, tendo por consequência um melhor delineamento terapêutico. No quadro abaixo (quadro 8), encontram-se o perfil de expressão estromal dos carboidratos analisados nesse trabalho, estratificado de acordo com os dados clínico-patológicos das pacientes.

Quadro 8 - Expressão estromal dos carboidratos categorizada de acordo com o perfil clínico-patológico das pacientes.

Fatores clínico-patológicos	MAL ⁺ n (%)	MAL ⁻ n (%)	PNA ⁺ n (%)	PNA ⁻ n (%)	SNA ⁺ n (%)	SNA ⁻ n (%)	WGA ⁺ n (%)	WGA ⁻ n (%)
Idade (anos)								
< 50	4 (23,53)	1 (5,88)	4 (23,53)	1 (5,88)	2 (11,76)	3 (17,65)	2 (11,76)	3 (17,65)
> 50	7 (41,18)	5 (29,41)	7 (41,18)	5 (29,41)	5 (29,41)	7 (41,18)	6 (35,29)	6 (35,29)
Tamanho tumoral (cm)								
<2,0	0 (0)	1 (5,88)	1 (5,88)	1 (5,88)	0 (0)	2 (11,76)	1 (5,88)	1 (5,88)
2.0-5.0	6 (35,29)	4 (23,53)	8 (47,06)	1 (5,88)	5 (29,41)	4 (23,53)	5 (29,41)	4 (23,53)

> 5.0	5 (29,41)	1 (5,88)	2 (11,76)	4 (23,53)	2 (11,76)	4 (23,53)	2 (11,76)	4 (23,53)
Lesões comedônicas								
Sim	5 (29,41)	5 (29,41)	7 (41,18)	4 (23,53)	4 (23,53)	7 (41,18)	7 (41,18)	4 (23,53)
Não	6 (35,29)	1 (5,88)	4 (23,53)	2 (11,76)	3 (17,65)	3 (17,65)	1 (5,88)	5 (29,41)
Estrógeno								
Positivo	5 (29,41)	3 (17,65)	4 (23,53)	5 (29,41)	3 (17,65)	6 (35,29)	6 (35,29)	3 (17,65)
Negativo	6 (35,29)	3 (17,65)	7 (41,18)	1 (5,88)	4 (23,53)	4 (23,53)	2 (11,76)	6 (35,29)
Progesterona								
Positivo	7 (41,18)	4 (23,53)	7 (41,18)	4 (23,53)	4 (23,53)	7 (41,18)	7 (41,18)	4 (23,53)
Negativo	4 (23,53)	2 (11,76)	4 (23,53)	2 (11,76)	3 (17,65)	3 (17,65)	1 (5,88)	5 (29,41)
TSR								
>50%	7 (41,18)	2 (11,76)	7 (41,18)	3 (17,65)	2 (11,76)	6 (35,29)	3 (17,65)	5 (29,41)
<50%	4 (23,53)	4 (23,53)	4 (23,53)	3 (17,65)	5 (29,41)	4 (23,53)	5 (29,41)	4 (23,53)

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

Na análise estatística multivariada, verificou-se que não houve correlações ($p < 0,05$) entre a expressão dos carboidratos estudados e os dados clínico-patológicos explorados. Esses resultados, de certeza, devem ser analisados sob a luz de uma população amostral reduzida. Sendo assim, estudos com um número maior de pacientes precisam ser realizados para conclusões mais precisas. Abaixo, no quadro 9, seguem os resultados estatísticos obtidos para as lectinas utilizadas ao longo do trabalho.

Quadro 9 - Análise estatística multivariada para a expressão de carboidratos no estroma.

Variáveis	Lectina MAL-II		Lectina PNA		Lectina SNA		Lectina WGA	
	z	p > z	z	p > z	z	p > z	Z	p > z
Idade	-0.95	0.344	-0.87	0.384	1.36	0.175	0.68	0.494
Tamanho	1.54	0.125	-1.78	0.075	-0.26	0.795	0.55	0.584
RP	-0.08	0.936	-1.37	0.169	-1.23	0.220	0.67	0.502
RE	0.05	0.958	-0.59	0.556	0.84	0.403	1.10	0.270
TSR	0.69	0.487	1.18	0.240	-1.44	0.149	0.67	0.503
Comedo	-1.75	0.081	0.21	0.833	-0.38	0.705	1.37	0.170
_cons	0.57	0.572	1.59	0.112	-0.87	0.384	1.10	0.272

Fonte: Dados da Pesquisa (2017).

6 CONCLUSÃO

- ❖ Os pacientes analisados apresentaram, em sua maioria, idade superior a 50 anos (70,59%), tumores de tamanho superior a 2cm (88,23%) e presença de lesões comedônicas (64,70%).
- ❖ As amostras foram caracterizadas como carcinoma ductal *in situ*, apresentando as características histopatológicas peculiares para tal.
- ❖ O estroma das amostras mostrou-se reativo, apresentando desmoplasia e/ou infiltrado inflamatório e corroborando à premissa de que o microambiente sofre modificações para dar suporte aos tumores.
- ❖ A proporção tumor-estroma nas amostras de CDIS mostraram-se equivalentes, com tumores *high-stromal* e *low-stromal areas*.
- ❖ O estroma das amostras mostrou positividade para a expressão de resíduos de Sia α 2-3 e Gal β (1-3)-GalNac, bem como negatividade para Sia α 2-6 e GlcNAc β (1-4)-GlcNAc β 1, concordando com o fenótipo ainda não invasivo do CDIS.
- ❖ Não houve correlação entre os dados clínico-patológicos analisados e a expressão dos carboidratos no estroma, sob a luz da população amostral utilizada.
- ❖ Estudos comparativos para análise do estroma em tumores de fenótipo invasivo são necessários para obtenção de respostas mais completas sobre a influência do perfil glicobiológico na progressão tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, O.; MAHALINGAM, M. Desmoplasia: not always a bad thing. **Histopathology**, v. 58, n. 5, p. 643–659, 2011.
- AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2430–2437, 2013.
- AMERONGEN, R. V.; BOWMAN, A. N.; NUSSE, R. Developmental Stage and Time Dictate the Fate of Wnt/b-Catenin-Responsive Stem Cells in the Mammary Gland. **Cell Stem Cell**, v.11, n. 3, p. 387–400, 2012.
- AMON, R.; REUVEN, E. M.; BEN-ARYE, S. L.; PADLER-KARAVANI, V. Glycans in immune recognition and response. **Carbohydrate Research**, v. 389, p. 115–122, 2014.
- ANDÒ et al. The multifaceted mechanism of Leptin signaling within tumor microenvironment in driving breast cancer growth and progression. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. 340, p. 1-6, 2014.
- ARMULIK, A.; GENOVE, G.; BETSHOLTZ, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. **Developmental Cell**, v. 21, n. 2, p. 193-215, 2011.
- BAEK, J.; CHAE, B.; SONG, B.; JUNG, S. The potential role of estrogen receptor β 2 in breast cancer. **International Journal of Surgery**, v. 14, p. 17-22, 2015.
- BANE, A. Ductal Carcinoma *In Situ*: What the Pathologist Needs to Know and Why. **International Journal of Breast Cancer** (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/914053>
- BANERJEE, D. K. N-glycans in cell survival and death: Cross-talk between glycosyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1338–1346, 2012.
- BENZ, C. C. Impact of aging on the biology of breast cancer. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 66, n. 1, p. 65–74, 2008.
- BILL, R.; CHRISTOFORI, G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? **FEBS Letters**, Switzerland, v. 589, p. 1577–1587, 2015.
- BLAZEJCZYK et al. Endothelium and cancer metastasis: Perspectives for antimetastatic therapy. **Pharmacological Reports**, Poland, v. 67, p. 711–718, 2015.
- BOEDTKJER, E.; MOREIRA, J.M.; MELE, M.; VAHL, P.; WIELENGA, V.T.; CHRISTIANSEN, P.M. Contribution of Na⁺, HCO₃⁻-cotransport to cellular pH control in human breast cancer: a role for the breast cancer susceptibility locus NBCn1 (SLC4A7). **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 1288–1299, 2013.
- BOURIS, P.; SKANDALIS, S. S.; PIPERIGKOU, Z.; AFRATIS, N. A.; KARAMANOVA, K.; ALETRAS, A. J.; MOUSTAKASC, A.; THEOCHARISA, A. D.; KARAMANOSA, N. K. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of

specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. **Matrix Biology**, v. 43, p. 42–60, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. 122p.

BRISKEN, C.; O'MALLEY, B. Hormone Action in the Mammary Gland. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 12, p. 1-16, 2010.

BROWN, J. P.; PINDER, S. E. Ductal carcinoma in situ: current morphological and molecular subtypes. **Diagnostic Histopathology**, v. 18, n. 3, p. 112-118, 2012.

BÜLL, C.; DEN BROK, M. H.; ADEMA, G. J. Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1846, n. 1, p. 238–246, 2014.

BÜLL, C.; STOEL, M. A.; DEN BROK, M. H.; ADEMA, G. J. Sialic Acids Sweeten a Tumor's Life. **Cancer Research**, v. 74, n. 12, p. 1–6, 2017.

BURCHELL, J.; POULSOM, R.; HANBY, A.; WHITEHOUSE, C.; COOPER, L.; CLAUSEN, H.; MILES, D.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. An α 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. **Glycobiology**, v. 9, n. 12, p. 1307–1311, 1999.

CAGNACCI-NETO, R. **Carcinoma ductal in situ de mama: avaliação de potenciais fatores prognósticos**. 2014. 66f. Dissertação de Mestrado em Ciências (área de concentração – oncologia), Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2014.

CANO, M. E.; VARELA, O.; GARCÍA-MORENO, M. I.; FERNÁNDEZ, J. M. G.; KOVENSKY, J.; UHRIG, M. L. Synthesis of β -galactosylamides as ligands of the peanut lectin. Insights into the recognition process. **Carbohydrate Research**, v. 443-444, p. 58-67, 2017.

CARRARO, D. M.; ELIAS, L. V.; ANDRADE, V. P. Ductal carcinoma *in situ* of the breast: morphological and molecular features implicated in progression. **Bioscience Reports**, v. 34, n.1, p. 19-28, 2014.

CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. **Genes & Diseases**, v. 2, n. 1, p. 26-34, 2015.

CHAN, Y. S.; NG, T. B. A Lectin with Highly Potent Inhibitory Activity toward Breast Cancer Cells from Edible Tubers of *Dioscorea opposita* cv. Nagaimo. **PlosOne**, v. 8, n. 1, p. e54212, 2013.

CHANDRAN, V. I.; EPPENBERGER-CASTORI, S.; VENKATESH, T.; VINE, K. L.; RANSON, M. HER2 and uPAR cooperativity contribute to metastatic phenotype of HER2-positive breast cancer. **Oncoscience**, v. 2, n. 3, p. 207–224, 2015.

CHANMEE, T.; ONTONG, P.; ITANO, N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. **Cancer Letters**, v. 375, n. 1, p. 20–30, 2016.

CHIA, J.; GOH, G.; BARD, F. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, n. 8, p. 1623–1639, 2016.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n.118, p. 1-11, 2013.

CID, S.; EIRO, N.; GONZÁLEZ, L. O.; BERIDZE, N.; VAZQUEZ, J.; VIZOSO, F. J. Expression and Clinical Significance of Metalloproteases and Their Inhibitors by Endothelial Cells From Invasive Breast Carcinomas. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 4, p. 83-91, 2016.

CIRQUEIRA, M. B.; MOREIRA, M. A. R.; SOARES, L. R.; FREITAS-JÚNIOR, R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CLAGNAN, W. S.; ANDRADE, J. M.; CARRARA, H. H. A.; TIEZZI, D. G.; REIS, F. J. C.; MARANA, H. R. C.; ABRÃO, R. A. Idade como fator independente de prognóstico no câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 30, n. 2, p. 67-74, 2008.

COLEMAN, R. E.; GREGORY, W.; MARSHALL, H.; WILSON, C.; HOLEN, I. The metastatic microenvironment of breast cancer: Clinical implications. **The Breast**, v. 22, p. S50-S56, 2013.

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

CUI, H.; WANG, H.; WANG, Y.; SONG, J.; TIAN, H.; XIA, C.; SHEN, Y. ST3Gal III modulates breast cancer cell adhesion and invasion by altering the expression of invasion-related molecules. **Oncology Reports**, v. 36, n. 6, p. 3317-3324, 2016.

DALL, G.; RISBRIDGER, G.; BRITT, K. Mammary stem cells and parity-induced breast cancer protection- new insights. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.018>

DAMAGHI, M.; WOJTKOWIAK, J. W.; GILLIES, R. J. pH sensing and regulation in cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 370, p. 1-10, 2013.

DE-SANCTIS, F.; SOLITO, S.; UGEL, S.; MOLON, B.; BRONTE, V.; MARIGO, I. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n.1, p. 35–48, 2016.

DITTMER, J.; LEYH, B. The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 3–15, 2015.

DOS-SANTOS, P. B.; ZANETTI, J. S.; RIBEIRO-SILVA, A.; BELTRÃO, E. I. C. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagnostic Pathology**, v. 104, n. 7, p. 1-9, 2012.

DOWNEY, C. L.; SIMPKINS, S. A.; WHITE, J.; HOLLIDAY, D. L.; JONES, J. L.; JORDAN, L. B.; KULKA, J.; POLLOCK, S.; RAJAN, S. S.; THYGESEN, H. H.; HANBY, A. M.; SPEIRS, V. The prognostic significance of tumour-stroma ratio in oestrogen receptor-positive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1744–1747, 2014.

DOWNEY, C. L.; THYGESEN, H. H.; SHARMA, N.; SHAABAN, A. M. Prognostic significance of tumour stroma ratio in inflammatory breast cancer. **Springer Plus**, v. 4, n. 68, p. 1-4, 2015.

DU, W. W.; FANG, L.; YANG, W.; SHENG, W.; ZHANG, Y.; SETH, A.; YANG, B. B.; YEE, A. J. The role of versican G3 domain in regulating breast cancer cell motility including effects on osteoblast cell growth and differentiation in vitro — evaluation towards understanding breast cancer cell bone metastasis. **BMC Cancer**, v. 12, n. 341, p. 1-16, 2012.

DUECHLER, M.; PECZEK, L.; ZUK, K.; ZALESNA, I.; JEZIORSKI, A.; CZYZ, M. The heterogeneous immune microenvironment in breast cancer is affected by hypoxia-related genes. **Immunobiology**, v. 219, n.2, p. 158– 165, 2014.

ELINAV, E.; NOWARSKI, R.; THAISS, C. A.; HU, B.; JIN, C.; FLAVELL, R. A. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. , p. 759-771, 2013.

ELLIS, H. Anatomy of the breast. **Surgery**, v. 28, n. 3, p. 114-116, 2014.

ELLIS, H.; MAHADEVAN, V. Anatomy and physiology of the breast. **Surgery**, v. 31, n. 1, p. 11-14, 2013.

FEI, F.; MESSINA, C.; SLAETS, L.; CHAKIBA, C.; CAMERON, D.; BOGAERTS, J.; BONNEFOI, H. 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.

FEUGAING, D. D. S.; GOTTE, M.; VIOLA, M. More than matrix: The multifaceted role of decorin in cancer. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 1, p. 1-11, 2013.

FOLKERD, E.; DOWSETT, M. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. **The Breast**, v. 22, p. S38-S43, 2013.

GANDELLINI et al. Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression patterns identify both common and unique features of tumour-

stroma crosstalk across cancer types. **Seminars in Cancer Biology**, Italy, v. 35, p. 96–106, 2015.

GE, H.; YUAN, W.; LIU, J.; HE, Q.; DING, S.; PU, J.; HE, B. Functional Relevance of Protein Glycosylation to the Pro-Inflammatory Effects of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) on Monocytes/ Macrophages. **Plos One** (2015), 10.1371/journal.pone.0117463

GEDDES, D. T. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 52, n. 6, p. 556-563, 2007.

GEISLER, C.; JARVIS, D. L. Effective glycoanalysis with Maackia amurensis lectins requires a clear understanding of their binding specificities. **Glycobiology**, v. 21, n. 8, p. 988–993, 2011.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011.

GIUSSANI et al. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. **Seminars in Cancer Biology**, Italy, v. 35, p. 3-10, 2015.

GLAVEY, S. V.; HUYNH, D.; REAGAN, M. R.; MANIER, S.; MOSCHETTA, M.; KAWANO, Y.; ROCCARO, A. M.; GHOBRIAL, I. M.; JOSHI, L.; O'DWYER, M. E. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. **Blood Reviews**, v. 29, n. 4, p. 269–279, 2015.

GLINSKY, V. V.; GLINSKY, G. V.; RITTENHOUSE-OLSON, K.; HUFLEJT, M. E.; GLINSKII, O. V.; DEUTSCHER, S. L.; QUINN, T. P. The Role of Thomsen-Friedenreich Antigen in Adhesion of Human Breast and Prostate Cancer Cells to the Endothelium. **Cancer Research**, v. 61, n. 12, p. 4851–4857, 2001.

GUJAM, F. J. A.; EDWARDS, J.; MOHAMMED, Z. M. A.; GOING, J. J.; MCMILLAN, D. C. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n.1, p. 157–165, 2014.

HAGERLING, C.; WERB, Z. Neutrophils: Critical components in experimental animal models of cancer. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 197–204, 2016.

HALDOSÉN, L.; ZHAO, C.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Estrogen receptor beta in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 665–672, 2014.

HAN H. S.; MAGLIOCCO, A. M. Molecular Testing and the Pathologist's Role in Clinical Trials of Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 16, n. 3, p.166-79, 2016.

HAN, Y.; LIAN, S.; CUI, X.; MENG, K.; GYÖRFFY, B.; JIN, T.; HUANG, D. Potential options for managing LOX+ ER– breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32893-32901, 2016.

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

HARPER, J.; SAINSON, R. C. A. Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. **Seminars in Cancer Biology**, v. 25, p. 69–77, 2014.

HEBBAR, M.; KRZEWINSKI-RECCHI, M. A.; HORNEZ, L.; VERDIÈRE, A.; HARDUIN-LEPERS, A.; BONNETERRE, J.; DELANNOY, P.; PEYRAT, J. P. Prognostic value of tumoral sialyltransferase expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. **The International Journal of Biological Markers**, v. 18, n. 2, p. 116-122, 2003.

HOCKL, P. F.; WOLOSUIK, A.; PÉREZ-SÁEZ, J. M.; BORDONI, A. V.; CROCI, D. O.; TOUM-TERRONES, Y.; SOLER-ILLIA, G. J. A. A.; RABINOVICH, G. A. Glyco-nano-oncology: Novel therapeutic opportunities by combining small and sweet. **Pharmacological Research**, v. 109, p. 45–54, 2016.

HOWARD, B. A.; LU, P. Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 25–26, p. 43–51, 2014.

HU, M.; POLYAK, K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 44, n.18, p. 2760–2765, 2008.

HUANG, B.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, n. 9, p. 240-244, 2015.

HUO, C. W.; WALTHAM, M.; KHOO, C.; FOX, S. B.; HILL, P.; CHEN, S.; CHEW, G. L.; PRICE, J. T.; NGUYEN, C. H.; WILLIAMS, L. D.; HENDERSON, M.; THOMPSON, E. W.; BRITT, K. L. Mammographically dense human breast tissue stimulates MCF10DCIS.com progression to invasive lesions and metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 106, p. 1-13, 2016.

IBRAHIM, S. A.; EL-GHONAIMY, E. A.; HASSAN, H.; MAHANA, N.; MAHMOUD, M. A.; EL-MAMLOUK, T.; EL-SHINAWI, M.; MOHAMED, M. M. Hormonal-receptor positive breast cancer: IL-6 augments invasion and lymph node metastasis via stimulating cathepsin B expression. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 5, p. 661–670, 2016.

INGTHORSSON, S.; HILMARSDOTTIR, B.; KRICKER, J.; MAGNUSSON, M. K.; GUDJONSSON, T. Context-Dependent Function of Myoepithelial Cells in Breast Morphogenesis and Neoplasia. **Current Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 4, p.168–174, 2015.

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41-55, 2016.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Histologic Classification of Ductal Carcinoma In Situ. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 2, p. 92–101, 2002.

JEON, M.; LEE, J.; NAM, S. J.; SHIN, I.; LEE, J. E.; KIM, S. Induction of fibronectin by HER2 overexpression triggers adhesion and invasion of breast cancer cells. **Experimental Cell Research**, v. 333, n. 1, p. 116–126, 2015.

JESINGER, R. A. Breast Anatomy for the Interventionalist. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, v. 17, n. 1, p. 3-9, 2014.

JINUSHI, M.; KOMOHARA, Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1855, n. 2, p. 123–130, 2015.

JONES, E.; SPENCER, S. A. The physiology of lactation. **Paediatrics and Child Health**, v. 17, n. 6, p. 244-248, 2007.

JÓZWIAK, P.; FORMA, E.; BRYŚ, M.; KRZESLA, A. O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. 145, p. 1-13, 2014.

KANWAL, S.; FARDINI, Y.; PAGESY, P.; N'TUMBABYN, T.; PIERRE-EUGÈNE, C.; MASSON, E.; HAMPE, C.; ISSAD, T. O-GlcNAcylation-Inducing Treatments Inhibit Estrogen Receptor α Expression and Confer Resistance to 4-OHTamoxifen in Human Breast Cancer-Derived MCF-7 Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69150, 2013.

KARLSSON, A.; SANDELIN, K.; APPELGREN, J.; ZHOU, W.; JIRSTROM, K.; BERGH, J.; WARNBERG, F. Clonal alteration of breast cancer receptors between primary ductal carcinoma in situ (DCIS) and corresponding local events. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 517– 524, 2014.

KENT, J. C. How Breastfeeding Works. **Journal of midwifery & women's health**, v. 52, n. 6, p. 564-70, 2007.

KHAMIS, Z. I.; SAHAB, Z. J.; AND SANG, Q. X. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis. **International Journal of Breast Cancer** (2012), doi:10.1155/2012/574025.

KIKKAWA, Y.; HARASHIMA, N.; IKARI, K.; FUJII, S.; KATAGIRI, K.; HOZUMI, K.; NOMIZU, M. Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK)

pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. **Experimental Cell Research**, v. 344, n. 1, p. 76–85, 2016.

KIM, B. S.; HWANG, H. S.; PARK, H.; KIM, H. H. Effects of selective cleavage of high-mannose-type glycans of Maackia amurensis leucoagglutinin on sialic acid-binding activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 9, p. 1815–1821, 2015.

KIMBUNG, S.; LOMAN, N.; HEDENFALK, I. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, n. , p. 85–95, 2015.

KORMELINK, T. G.; POWE, D. G.; KUIJPERS, S. A.; ABUDUKELIMU, A.; FENS, M. H. A. M.; PIETERS, E. H. E.; KASSING-VAN DER VEN, W. W.; HABASHY, H. O.; ELLIS, I. O.; BLOKHUIS, B. R.; THIO, M.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; REDEGELD, F. A.; SCHIFFELERS, R. M. Immunoglobulin free light chains are biomarkers of poor prognosis in basal-like breast cancer and are potential targets in tumor-associated inflammation. **Oncotarget**, v. 5, n. 10, p. 3159-3167, 2014.

KOUSIDOU, O. C.; BERDIAKI, A.; KLETSAS, D.; ZAFIROPOULOS, A.; THEOCHARIS, A. D.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Estradiol–estrogen receptor: A key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. **Molecular Oncology**, v. 2, n. , p. 223–232, 2008.

KRUIJF, E. M.; VAN NES, J. G. H.; VAN DE VELDE, C. J. H.; PUTTER, H.; SMIT, V. T. H. B. M.; LIEFERS, G. J.; KUPPEN, P. J. K.; TOLLENAAR, R. A. E. M.; MESKER, W. E. Tumor–stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. **Breast cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 687–696, 2011.

KUMAR, B.S. G.; SUROLIA, A. Comprehensive analysis of α -2–3-linked sialic acid specific Maackiaamurensis leukagglutinin reveals differentially occupied N-glycans and C-terminal processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 114–121, 2017.

KUMARI, A.; KOYAMA, T.; HATANO, K.; MATSUOKA, K. Synthetic assembly of novel avidin-biotin-GlcNAc (ABG) complex as a attractive bio-probe and its interaction with wheat germ agglutinin (WGA). **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 219–225, 2016.

LAHMAR, Q.; KEIRSSE, J.; LAOUI, D.; MOVAHEDI, K.; VAN OVERMEIRE, E.; VAN GINDERACHTER, J. A. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1865, n. 1, p. 23-34, 2016.

LEE, H.; CHOI, H.; HA, S.; LEE, K.; KWON, Y. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1835, n. 2, p. 170–179, 2013.

LEONG, A. S. Y.; ZHUANG, Z. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Pathobiology**, v. 78, n. 2, p. 99–114, 2011.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. **41**, n. **3**, p. 211–218, 2016.

LIU, A. Y.; OUYANG, G. Tumor Angiogenesis: A New Source of Pericytes. **Current Biology**, v. 23, n. 13, p. 565-568, 2013.

LIU, S. C.; YANG, S. F.; YEH, K. T., YEH, C. M.; CHIOU, H. L.; LEE, C. Y.; CHOU, M. C.; HSIEH, Y. S. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 371, n. 1-2, p. 92-96, 2006.

LÓPEZ-MORALES, D.; REYES-LEYVA, J.; SANTOS-LÓPEZ, G.; ZENTENO, E.; VALLEJO-RUIZ, V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 74, p. 1-5, 2010.

LUO, H.; TU, G.; LIU, Z.; LIU, M. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. **Cancer Letters**, v. 361, n. 2, p. 155–163, 2015.

LUPARELLO, C. Aspects of Collagen Changes in Breast Cancer. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 813, p. 1-6, 2013.

MA, Z.; VOSSELLER, K. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 50, p. 34457-34465, 2014.

MACÉA, J. R.; FREGNANI, J. H. T. G. Anatomy of the Thoracic Wall, Axilla and Breast. **International Journal of Morphology**, v.24, n. 4, p. 691-704, 2006.

MANGIA, A.; Malfettone, A.; SIMONE, G.; DARVISHIAN, F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 24–30, 2011.

MANGIA, A.; Malfettone, A.; SIMONE, G.; DARVISHIAN, F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 24-30, 2011.

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K.; WANG, J. Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 32 n.0, p. 303–315, 2013.

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K.; WANG, J. Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 303–315, 2013.

MISHALIAN, I.; GRANOT, Z.; FRIDLENDER, Z. G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. **Immunobiology**, v. 222, n. 1, p. 82-88, 2017.

- MOHAMED, M. M.; EL-GHONAIMY, E. A.; NOUH, M. A. SCHNEIDER, R. J.; SLOANE, B. F.; EL-SHINAWI, M. Cytokines secreted by macrophages isolated from tumormicroenvironment of inflammatory breast cancer patients possesschemotactic properties. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 46, p. 138– 147, 2014.
- MOHAMMED, M. K.; SHAO, C.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C. Opening the LOX to bone metastasis: The role of secreted lysyl oxidase in skeletal recurrence of breast cancers. **Genes & Diseases**, v. 2, p. 288-290, 2015.
- MOORMAN, A. M.; VINK, R.; HEIJMANS, H.J.; VAN DER PALEN, J.; KOUWENHOVEN, E. A. The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 38, n.4, p. 307-313, 2012.
- MOSES, K.; BRAND, S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 187–196, 2016.
- MOU, W.; XU, Y.; YE, Y.; CHEN, S.; LI, X.; GONG, K.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LI, X.; TIAN, Y.; XIANG, R.; LI, N. Expression of *Sox2* in breast cancer cells promotes the recruitment of M2 macrophages to tumor microenvironment. **Cancer Letters**, v. 358, n. 2, p. 115–123, 2015.
- MOUAWAD, R.; SPANO, J.; KHAYAT, D. Lymphocyte Infiltration in Breast Cancer: A Key Prognostic Factor That Should Not Be Ignored. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1935-1936.
- NAKATA, H.; WAKAYAMA, T.; ASANO, T.; NISHIUCHI, T.; ISEKI, S. Identification of sperm equatorial segment protein 1 in the acrosome as the primary binding target of peanut agglutinin (PNA) in the mouse testis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 147, n. 1, p.27-38, 2017.
- NALWOGA, H.; AHMED, L.; ARNES, J. B.; WABINGA, H.; AKSLEN, L. A. Strong Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Is Associated with Axl Expression and Features of Aggressive Tumors in African Breast Cancer. **Plos One** (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146823>
- NANUT, M. P.; SABOTIC, J.; JEWETT, A.; KOS, J. Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 616, p. 1-10, 2014.
- NIANG, B.; JIN, L.; CHEN, X.; GUO, X.; ZHANG, H.; WU, Q.; PADHIAR, A. A.; XIAO, M.; FANG, D.; ZHANG, J. GalNAc-T4 putatively modulates the estrogen regulatory network through FOXA1 glycosylation in human breast cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 411, n. 1-2, p. 393-402, 2016.
- NOH, H.; HONG, S.; HUANG, S. Role of Urokinase Receptor in Tumor Progression and Development. **Theranostics**, v. 3, n. 7, p. 487-495, 2013.

O'BRIEN, J.; LYONS, T.; MONKS, J.; LUCIA, M. S.; WILSON, R. S.; HINES, L.; MAN, Y.; BORGES, V.; SCHEDIN, P. Alternatively Activated Macrophages and Collagen Remodeling Characterize the Postpartum Involuting Mammary Gland across Species. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 3, p. 1241-1255, 2010.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **The Breast**, v. 22, p. S66-S72, 2013.

OSTRAND-ROSENBERG, S.; SINHA, P.; BEURY, D. W.; CLEMENTS, V. K. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 4, p. 275– 281, 2012.

PANAYIOTOU, H.; ORSI, N. M.; THYGESEN, H. H.; WRIGHT, A. I.; WINDER, M.; HUTSON, R.; CUMMINGS, M. The prognostic significance of tumour stroma ratio in endometrial carcinoma. **BioMed Central**, v. 15, n. 955, p. 1-8, 2015.

PASANEN, I.; LEHTONEN, S.; SORMUNEN, R.; SKARP, S.; LEHTILAHTI, E.; PIETILÄ, M.; SEQUEIROS, R. B.; LEHENKARI, P.; KUVAJA, P. Breast cancer carcinoma-associated fibroblasts differ from breast fibroblasts in immunological and extracellular matrix regulating pathways. **Experimental Cell Research**, v. 344, n. 1, p. 53–66, 2016.

PAVÓN, M. A.; ARROYO-SOLERA, I.; CÉSPEDES, M. V.; CASANOVA, I.; LEÓN, X.; MANGUES, M. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 57351–57366, 2016.

PIETILA, M.; IVASKA, J.; MANI, S. A. Whom to blame for metastasis, the epithelial–mesenchymal transition or the tumor microenvironment? **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 359-368, 2016.

PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 1324-1331, 2010.

PILLAI, S.; NETRAVALI, I. A.; CARIAPPA, A.; MATTOO, H. Siglecs and Immune Regulation. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 357-392, 2012.

PINDER, S. E.; DUGGAN, C.; ELLIS, I. O.; CUZICK, J.; FORBES, J. F.; BISHOP, H.; FENTIMAN, I. S.; GEORGE, W. D. A new pathological system for grading DCIS with improved prediction of local recurrence: results from the UKCCCR/ANZ DCIS trial. **British Journal of Cancer**, v. 103, n. 1, p. 94-100, 2010.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540-555, 2015.

PIPERIGKOU, Z.; BOURIS, P.; ONISTO, M.; FRANCI, M.; KLETSAS, K.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Estrogen receptor beta modulates breast

cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 56, p.4-23, 2016.

PIRONE, J. R.; D'ARCY, M.; STEWART, D. A.; HINES, W. C.; JOHNSON, M.; GOULD, M. N.; YASWEN, P.; JERRY, D. J.; SCHNEIDER, S. S.; TROESTER, M. A. Age-associated gene expression in normal breast tissue mirrors qualitative age-at-incidence patterns for breast cancer. **Cancer epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 21, n. 10, p. 1735–1744, 2012.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.

QIAN, B. Z. AND POLLARD, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell, USA**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

QU, P.; WANG, L.; LIN, P. C. Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 253-256, 2016.

RAFN, B.; NIELSEN, C. F.; ANDERSEN, S. H.; SZYNIAROWSKI, P.; CORCELLE-TERMEAU, E.; VALO, E.; FEHRENBACHER, N.; OLSEN, C. J.; DAUGAARD, M. EGEBJERG, C.; BØTTZAUW, T.; KOHONEN, P.; NYLANDSTED, J.; HAUTANIEMI, S.; MOREIRA, J.; JAATTELA, M.; KALLUNKI, T. ErbB2-Driven Breast Cancer Cell Invasion Depends on a Complex Signaling Network Activating Myeloid Zinc Finger-1-Dependent Cathepsin B Expression. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 764–776, 2012.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 2713-2722, 2010.

RECCHI, M. A.; HARDUIN-LEPERS, A.; BOILLY-MARER, Y.; VERBERT, A.; DELANNOY, P. Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 1, p. 19–27, 1998.

RIBATTI, D. Mast cells as therapeutic target in cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 778, p. 152–157, 2016a.

RIBATTI, D. Mast cells in lymphomas. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 101, p. 207–212, 2016b.

RIBATTI, D. The crucial role of mast cells in blood-brain barrier alterations. **Experimental cell research**, v. 338, n. 1, p. 119-125, 2015.

ROBINSON, D. E.; BUTTLE, D. J.; SHORT, R. D.; MCARTHUR, S. L.; STEELE, D. A.; WHITTLE, J. D. Glycosaminoglycan (GAG) binding surfaces for characterizing GAG-protein interactions. **Biomaterials**, v. 33, n. 4, p. 1007-1016, 2012.

RUDNICK, J. A.; KUPERWASSER, C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 29, n. 7, p. 663-672, 2012.

SAHA, S.; BISWAS, S. K. Tumor-Associated Neutrophils Show Phenotypic and Functional Divergence in Human Lung Cancer. **Cancer Cell**, v. 30, n. 1, p. 11-13, 2016.

SALDOVA, R.; SHEHNI, A. A.; HAAKENSEN, V. D.; STEINFELD, I.; HILLIARD, M.; KIFER, I.; HELLAND, A.; YAKHINI, Z.; BØRRESEN-DALE, A.; RUDD, P. M. Association of N-Glycosylation with Breast Carcinoma and Systemic Features Using High-Resolution Quantitative UPLC. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2314–2327, 2014.

SANDHU, R.; CHOLLET-HINTON, L.; KIRK, E. L.; MIDKIFF, B.; TROESTER, M. A. Digital histologic analysis reveals morphometric patterns of age-related involution in breast epithelium and stroma. **Human Pathology**, v. 48, p. 60–68, 2016.

SCHAEFER, L. Proteoglycans, key regulators of cell–matrix dynamics. **Matrix Biology**, v. 35, p. 1–2, 2014.

SCHNEIDER, C.; POZZI, A. Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, p. 277–294, 2011.

SCHUH, F. **Sistemas de classificação do carcinoma ductal in situ de mama: concordância diagnóstica do grau nuclear de black modificado entre os patologistas e proposta de um questionário eletrônico online para o diagnóstico de graduação patológica**. 2011. 120f. Tese de Doutorado em Medicina: Ciências Médicas – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SEMENZA, G. L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.036>

SHAHIDI-NOGHABI, S.; VAN DAMME, E. J. M.; IGA, M.; SMAGGHE, G. Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1101–1107, 2010.

SHANG, C.; VAN DAMME, E. J. M. Comparative analysis of carbohydrate binding properties of *Sambucus nigra* lectins and ribosome-inactivating proteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 5, p. 345-54, 2014.

SHARMA, S. H.; THULASINGAM, S.; NAGARAJAN, S. Chemopreventive agents targeting tumor microenvironment. **Life Sciences**, v. 145, p. 74–84, 2016.

SHAY, G.; LYNCH, C. C.; FINGLETON, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 200–206, 2015.

SHEKHAR, M. P. V.; KATO, I.; NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L. Comedo-DCIS is a precursor lesion for basal-like breast carcinoma: identification of a novel p63/Her2/neu expressing subgroup. **Oncotarget**, v. 4, n. 2, p. 231-241, 2013.

- SINDREWICZ, P.; LIAN, L.; YU, L. interaction of the Oncofetal Thomsen–Friedenreich Antigen with Galectins in Cancer Progression and Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. 79, p. 1-7, 2016.
- SIZIOPIKOU, K. P. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Current Concepts and Future Directions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 4, p. 462-466, 2013.
- SKANDALIS, S. S.; AFRATIS, N.; SMIRLAKI, G.; NIKITOVIC, D.; THEOCHARIS, A. D.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: Focus on the role and impact of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 35, p. 182–193, 2014.
- SKVORTSOV, S.; DEBBAGE, P.; LUKAS, P.; SKVORTSOVA, I. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 36–42, 2015.
- TAKAHASHI, M.; KIZUKA, Y.; OHTSUBO, K.; GU, J.; TANIGUCHI, N. Disease-associated glycans on cell surface proteins. **Molecular Aspects of Medicine** (2016), doi: 10.1016/j.mam.2016.04.008
- TALMADGE, J. E.; GABRILOVICH, D. I. History of myeloid-derived suppressor cells, **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n.10, p. 739-752.
- TANG, L.; HAN, X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis, **Biomedicine & Pharmacotherapy** , v. 67, n. 2, p. 179–182, 2013.
- TAYLOR, M. A.; AMIN, J. D.; KIRSCHMANN, D. A.; SCHIEMANN, W. P. Lysyl oxidase contributes to mechanotransduction-mediated regulation of transforming growth factor- β signaling in breast cancer cells. **Neoplasia**, v. 13, n. 5, p. 406-18, 2011.
- TECALCO-CRUZ, A. C.; PÉREZ-ALVARADO, I. A.; RAMÍREZ-JARQUÍN, J. O.; ROCHA-ZVALETA, L. Nucleo-cytoplasmic transport of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. **Cellular Signalling**, v. 34, p. 121–132, 2017.
- THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- THOMAS, C.; GUSTAFSSON, A. Progesterone receptor-estrogen receptor crosstalk: a novel insight. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 9, p. 453-454, 2015b.
- THOMAS, C.; GUSTAFSSON, J. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 9, p.467-476, 2015a.
- TOMMELEIN, J.; VERSET, L.; BOTERBERG, T.; DEMETTER, P.; BRACKE, M.; DE WEVER, O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. 63, p. 1-11, 2015.
- TRIKHA, P.; CARSON III, W. E. Signaling pathways involved in MDSC regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1846, n. 1, p. 55–65, 2014.

TURLEY, S. J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J. L. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n.11, p. 669-682, 2015.

URSIN, G.; HOVANESSIAN-LARSEN, L.; PARISKY, Y. R.; PIKE, M. C.; WU, A. H. Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 605–608, 2005.

VAJARIA, B. N.; PATEL, K. R.; BEGUM, R.; PATEL, P. S. Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. **Pathology and Oncology Research**, v. 22, n. 3, p. 443-447, 2016.

VARKI, A.; GAGNEUX, P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1253, n. 1, p. 16–36, 2012.

VERA-RAMIREZ et al. Gene-expression profiles, tumor microenvironment, and cancer stem cells in breast cancer: Latest advances towards an integrated approach. **Cancer Treatment Reviews**, Spain, v. 36, p. 477–484, 2010.

VERBOVSEK, U.; VAN NOORDEN, C. J. F.; LAH, T. T. Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 71–84, 2015.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, p. 207-210, 2012.

VICTOR, B. C.; ANBALAGAN, A.; MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F.; CAVALLO-MEDVED, D. Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1-14 , 2011.

VIEIRA-DE-MELLO, G. S. **Avaliação do glicocódigo presente no carcinoma ductal in situ de mama e sua relação na determinação do prognóstico e diagnóstico**. 2014. 128f. Tese de Doutorado em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

VOSELER, S.; LEDERLE, W.; AIROLA, W.; OBERMUELLER, E.; FUSENIG, N. E.; MUELLER, M. M. Distinct progression-associated expression of tumor and stromal MMPs in HaCaT skin SCCs correlates with onset of invasion. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 10, p. 2296–2306, 2009.

WANG, F.; CUI, S.; SUN, L.; QU, X.; XIE, Y.; ZHOU, L.; MU, Y.; TANG, W.; WANG, Y. High expression of a 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 32, n. 5-6, p. 437–443, 2009.

WITHANA, N. P.; BLUM, G.; SAMENI, M.; SLANEY, C.; ANBALAGAN, A.; OLIVE, M. B.; BIDWELL, B. N.; EDGINGTON, L.; WANG, L.; MOIN, K.; SLOANE, B. F.; ANDERSON, B. L.; BOGYO, M. S.; PARKER, B. S. Cathepsin B Inhibition Limits Bone Metastasis in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1199-1209, 2012.

WU, T.; DAI, Y. Tumor Microenvironment and Therapeutic Response. **Cancer Letters** (2016), doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.043

YAU, T.; DAN, X.; NG, C. C. W.; NG, T. Z. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791-3810, 2015.

YUAN, Y.; WU, L.; SHEN, S.; WU, S.; BURDICK, M. M. Effect of alpha 2,6 Sialylation on Integrin-mediated Adhesion of Breast Cancer Cells to Fibronectin and Collagen IV. **Life sciences**, v. 149, p. 138–145, 2016.

ZHANG, T.; XU, J.; SHEN, H.; DONG, W.; NI, Y.; DU, J. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in NSCLC. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11348-11355, 2015.

ZHANG, Z.; CHOMETON, G.; WEN, T.; QU, H.; MAUCH, C.; KRIEG, T.; AUMAILLEY, M. Migration of epithelial cells on laminins: RhoA antagonizes directionally persistent migration. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 1, p. 1–12, 2011.