

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Steffany de Almeida Ferreira

**Análise da Expressão de Glicosiltransferases em Tumores
Cutâneos Não Melanomas.**

Recife

2012

Steffany de Almeida Ferreira

**Análise da Expressão de Glicosiltransferases em Tumores
Cutâneos Não Melanomas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

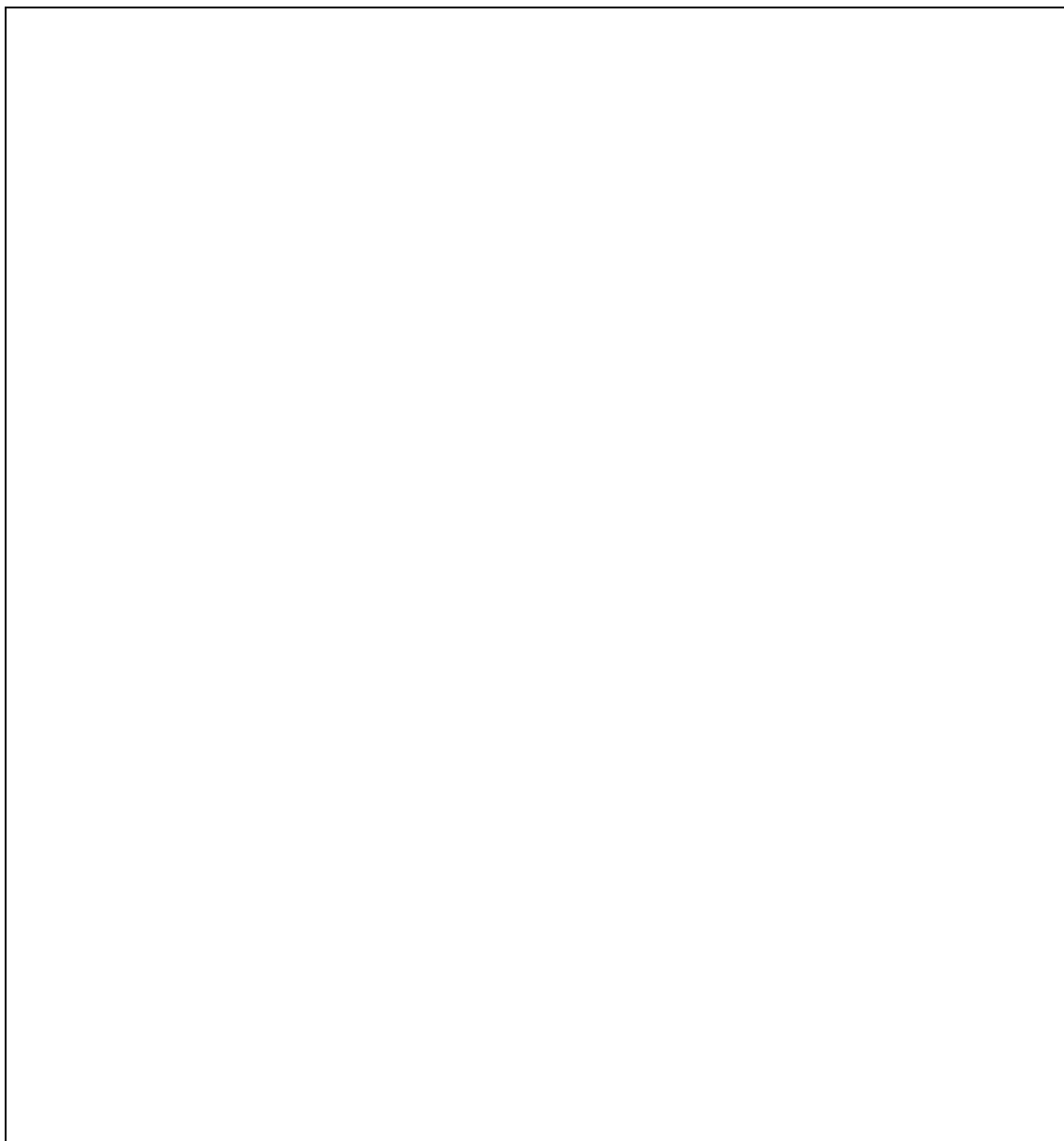
Orientador: Prof. Dr. Eduardo I. C. Beltrão

Recife

2012

Ferreira, S.A.	Análise da Expressão de Glicosiltransferases em Tumores Cutâneos Não Melanomas.	2,5 cm espaço reservado para etiqueta de localização	Mestrado PPGIT/UFPE 2012
----------------	---	--	--------------------------------

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof(a). Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Ângela Maria Isidro Farias

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof(a). Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

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

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

Ferreira, Steffany de Almeida

Análise da expressão de glicosiltransferases em tumores cutâneos não melanomas./ Steffany de Almeida Ferreira. – Recife: O Autor, 2012.

86 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo I. C. Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Cancer de pele 2. Histoquímica 3. Lectinas I. Beltrão, Eduardo I.C. II. Título.**

571.978

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-105

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: FERREIRA, Steffany de Almeida

Título: Análise da Expressão de Glicosiltransferases em Tumores Cutâneos Não Melanomas.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Instituição: Depto. Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Claudio Gabriel Rodrigues

Instituição: Depto. Biofísica – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Márcia Vanuza da Silva

Instituição: Depto. Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Instituição: Depto. Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

Prof(a). Dr. Dr. Moacyr Jesus de Melo Barreto Rêgo

Instituição: DINE – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cristina e Aguinaldo,
ao meu noivo Márcio e a
todos os meus amigos
e familiares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar minha vida e guiar meus passos em busca da superação dos obstáculos e concretização de meus sonhos.

Aos meus pais, Cristina e Aguinaldo, especialmente minha mãe, meu amor maior, pelo apoio, paciência, dedicação e todo o carinho e confiança depositados em mim.

A minha vó Lála pelo amor, apoio e compreensão por minha constante ausência.

Ao meu noivo Márcio pelo companheirismo, apoio, incentivo, compreensão e paciência em toda esta trajetória.

Aos meus familiares, tias e tios, primos e primas pelo carinho, apoio e incentivo.

Às minhas eternas amigas Poliana Silva, Rubiane Quezado e Scheilla Xavier pela fidelidade e amizade atemporal.

Aos meus amigos de jornada Amanda Aliança, Isabelle Freire, Jana Sandes, Renato Silva, Luís Claudio do Nascimento, Lívia Bandeira, Rafael Freitas, Veridiana Sales, Pollyana Costa, Julliana Ribeiro, Wheverton Nascimento, Gutemberg Leite e Mônica Emmanuella.

Ao programa de pós-graduação em inovação terapêutica (PPGIT) e a profa. Suelly Galdino pela oportunidade e pelos ensinamentos.

A Paulo Germano, secretário do PPGIT, pela paciência, disponibilidade e prestatividade.

Aos meus amigos do BmC Juliana Vasconcelos, Juliana Brandão, Luiza Amorim, João Quirino, Lúcia Patrícia, Sinara Mônica, Moacyr Barreto, Petra, Gabriela Melo, Ana Rosa, Eduardo Ramalho, Bruno Trajano, Renato Ferreira, Marek Ekert, Marina Ferraz, Antônio, Edso Henrique, Paula Fernanda, Marina Cartaxo e, especialmente, Carmelita Cavalcanti pela amizade, carinho, solidariedade e convívio harmonioso.

E, finalmente, ao Prof. Eduardo Beltrão pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelas inúmeras conversas esclarecedoras, por acreditar em meu potencial, pela tranquilidade, leveza e serenidade durante toda a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

FERREIRA, S. A. *Análise da Expressão de Glicosiltransferases em Tumores Cutâneos Não Melanomas*. 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de pele ou tumor cutâneo não-melanoma (TCNM), é a neoplasia maligna de maior incidência no Brasil. Os cânceres, em geral, apresentam padrão de glicosilação aberrante na estrutura de oligossacarídeos de superfície celular (fenótipo), determinada pela ação conjunta de glicosiltransferases (genótipo). O presente estudo objetiva avaliar o perfil glicofenotípico de glicoconjugados de superfície celular de TCNM e correlacionar com o padrão de expressão de sialiltransferases. Cortes (4µm) de biópsias de Carcinoma Basocelular (CBC), Carcinoma Espinocelular (CEC), Ceratose Actínica (CA) e Ceratoacantoma (KA) foram ensaiados com as lectinas SNA, *Sambucus nigra* agglutinin, (específica para ácidos siálicos ligados na posição α -2,6) e MAA, *Maackia amurensis* agglutinin (específica para ácidos siálicos na posição α -2,3). A inibição da ligação lectina-carboidrato foi realizada com o ácido siálico (300mM). As amostras também foram avaliadas com anticorpos monoclonais anti-ST3Gal I (específico para β -galactosídeo α 2,3 sialiltransferase) e anti-ST6Gal I (específico para β -galactosídeo α 2,6 sialiltransferase). Semelhanças no padrão de sialilação entre CEC, CA e KA foram encontradas na histoquímica com lectinas e, principalmente na imunohistoquímica. O CBC não apresentou marcação na maioria dos casos para ambas as técnicas, indicando que este tipo tumoral apresenta um padrão molecular próprio podendo estar associado ao seu comportamento biológico (baixo potencial invasivo e metastático). Os resultados indicam a importância da sialilação no desenvolvimento e manutenção de tumores cutâneos, sendo a histoquímica com lectinas e a imunohistoquímica ferramentas úteis na determinação deste tipo de glicosilação na superfície de células tumorais.

Palavras-chave: acido siálico, sialiltransferases, tumores cutâneos não-melanomas.

ABSTRACT

FERREIRA, S. A. Analysis of *Glycosyltransferases Expression in Non-melanoma Cutaneous Tumors*. 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Skin cancer or Non-melanoma Cutaneous Tumors (NMCT) is the most incidente malign neoplasia in Brazil. Cancers, in general, present a aberrant glycosilation pattern in oligossacharides of cell surfasse glycoconjugates (phenotype) which it is determined by tha action of glycosiltransferases (genotype). The present study aims to evaluate the glycophenotype of glycoconjugates in the cell surface of NMCT and to correlates to the expression of sialyltransferases. Biopsies slices (4 μ m) of basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC), actinic keratosis (AK) and Keratoacanthoma (KA) were assayed with SNA, *Sambucus nigra* agglutinin, (specific to α 2,6-linked sialyc acid) and MAA, *Maakia amurensis* agglutinin (specific to α 2,3-linked sialic acid). Samples were also evaluated with monoclonal antibodies anti-ST3Gal I (specific to Sialyltransferase β -galactoside α 2,3-linked) and anti-ST6Gal I (specific to Sialyltransferase β -galactoside α 2,6-linked). Sialylation patterns were similar to SCC, AK and KA in both lectin histochemistry and immunohistochemistry but mainly in the later one. BCC was not positive in most of the cases for both methods which indicates that this tumour has a particular molecular pattern that can be associated to its biological behavior (low invasive and metastatic potential). Results indicate the importance of silaylation in the development and maintenance of cutaneous tumors being the lectin histochemistry associated to the immunohistochemistry a useful auxiliary tool for the determination of this type of glycosilation in skin tumors.

Palavras-chave: sialyc acid, sialyltransferases, non-melanoma cutaneous tumors.

LISTA DE FIGURAS (Revisão da Literatura)

- Figura 1. Organização da epiderme e suas quatro camadas. As camadas superficiais são a Camada Córnea e Camada Lúcida, a 23 camada intermediária é a Camada Granulomatosa e a Camada Espinhosa, próxima à Camada Basal. Presença de melanina no interior dos melanócitos da Camada Basal..
- Figura 2. As camadas da pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo) e seus anexos (poros sudoríparos, corpúsculo de Meissner, 24 Glândulas sebácea e sudorípara, pêlos, terminações nervosas vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e folículos pilosos).
- Figura 3. Imagem histológica de ceratose actínica. Presença de paraceratose (seta verde escura), ortoceratose (seta azul), 26 crescimento atípico de queratinócitos na porção inferior da epiderme (seta vermelha), folículo capilar (seta amarela) e elastose solar na derme (seta verde clara).
- Figura 4. Imagem histológica de ceratoacantoma em fase involutiva 27 (retificação da base da lesão).
- Figura 5. Imagem histológica do carcinoma basocelular. Presença de “ilhas” de células basalóides (setas vermelhas), com disposição 28 em paliçada (seta azul) das células na periferia e arranjo desorganizado das células no interior do tumor.
- Figura 6. Imagem histológica do carcinoma espinocelular invasivo. Presença de células escamosas que surgem na epiderme e 30 estendem-se profundamente na derme (seta azul) e presença de pérolas de queratina (setas vermelhas).
- Figura 7. Esquema da carcinogênese dos diferentes Tumores Cutâneos 31 Não melanomas através da exposição contínua a radiações ultravioletas (Tipo A e tipo B)
- Figura 8. Subfamílias de sialiltransferases (ST3, ST6 e ST8), seus principais substratos (galactose, galactosamina, N- 35 acetilgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico) e os padrões de ligação (α 2,3; α 2,6; α 2,6GalNAc e α 2,8).

LISTA DE FIGURAS (Artigos)

Artigo 1

Figure 1. Staining with lectin MAA. Actinic keratosis showed high 58
expression (2+) of α 2,3 sialic acid (Magnification 100x). In
detail, staining in cell membrane and paranuclear
(Magnification 400x).

Figure 2. Staining with lectin SNA. Squamous cell carcinoma 59
showed middle expression (2+) of α -2,6 sialic acid.
(Magnification 100x).

Artigo 2

Figure 1 Representative examples of immunohistochemical staining
profiles with ST3Gal I (A-E) and ST6Gal I (F-I). (A) Actinic
keratosis with diffuse cytoplasmic staining 3+, (B)
Keratoacanthoma with diffuse cytoplasmic and membrane
staining 3+, (C) Squamous cell carcinoma with diffuse
cytoplasmic and membrane staining 3+, (D) Basal cell 74
carcinoma with negative staining, (E) Basal cell carcinoma
with nuclear and perinuclear staining 2+, (F) Squamous
cell carcinoma with diffuse cytoplasmic staining 3+, (G)
Squamous cell carcinoma with diffuse cytoplasmic staining
1+, (H) Keratoacanthoma with diffuse cytoplasmic staining
3+, (I) Actinic keratosis with negative staining

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1.	Expression of α 2,3 Sialic acid staining with MAA and distribution in samples with non-melanoma skin cancer	58
Table 2.	Expression of α 2,6 Sialic acid staining with SNA and distribution in samples with non-melanoma skin cancer	59

Artigo 2

Table 1	Relationship between ST3Gal I and ST Gal I immunoexpression and cutaneous epithelial lesions	74
---------	--	----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CA	Ceratose Actínica
CBC	Carcinoma Basocelular
CEC	Carcinoma Espinocelular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GnT-V	N-acetil-glicosaminiltransferase V
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KA	Ceratoacantoma
MAA	<i>Maakia amurensis agglutinin</i>
RE	Retículo Endoplasmático
SNA	<i>Sambucus nigra agglutinin</i>
STs	Sialiltransferases
ST6Gal-I	β -galactosideo α 2,6 sialiltransferase
ST3Gal-I	β -galactosideo α 2,3 sialiltransferase
TCNM	Tumores Cutâneos Não-Melanomas
UV	Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 Câncer: uma visão geral	21
3.2 Anatomia e histologia da pele	22
3.3 Tumores cutâneos não melanomas (TCNM)	25
3.4 Glicosilação, Glicosiltransferases e sialiltransferases.....	32
3.5 Lectinas: ferramentas úteis no diagnóstico.....	36
4. METODOLOGIA.....	39
4.1 Materiais	39
4.2 Seleção dos casos	39
4.3 Aspectos éticos	39
4.4 Histoquímica com Lectinas.....	39
4.5 Imunohistoquímica	40
4.6 Análise Digital das Imagens	40
5. REFERÊNCIAS	42
6. ARTIGOS CIENTÍFICOS	52
6.1 Artigo1.....	52
Differential Expression of Sialic Acid in Skin Biopsies of Non-Melanoma Skin Tumors.	52
6.2 Artigo 2.....	67

Expression Patterns of α2,3-Sialyltransferases and α2,3-Sialyltransferases in cutaneous epithelial lesions and correlation with features (glyco)phenotypics.	67
7. CONCLUSÕES	85
8. PERSPECTIVAS	86

1. INTRODUÇÃO

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Estima-se que, no ano de 2030, ocorrerão cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, vem afetando de forma significativa o impacto do câncer no mundo (INCA, 2010).

Em se tratando de câncer de pele, é observado que sua incidência vem crescendo mundialmente nas últimas décadas, superando até mesmo o câncer de mama, próstata e pulmão, tornando-se um grave problema de saúde pública, uma vez que interfere na qualidade de vida da população (WHO, 2010).

O câncer de pele, também conhecido como Tumor Cutâneo Não-Melanoma (TCNM), é a neoplasia maligna de maior incidência no Brasil, com 134 mil casos novos esperados para o presente ano de 2012, estas estimativas são válidas também para o ano de 2013. Para o sexo masculino, estima-se uma taxa de incidência de 65/100.000 (62.680 casos) para o ano de 2012. No sexo feminino, o câncer da pele do tipo não melanoma possui uma taxa de incidência estimada de 61/100.000 (71.490 casos). Em Pernambuco, as estimativas apontam para 4.320 novos casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2012).

Apesar da alta taxa de incidência, sua letalidade é considerada baixa (em torno de 5-10%); porém, em alguns casos em que há demora no diagnóstico, esse câncer pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves. É quase certo que exista um considerável sub-registro devido ao subdiagnóstico e também por ser uma neoplasia de excelente prognóstico, com taxas altas de cura completa, se tratado de forma adequada e oportuna (INCA, 2012).

Com relação aos aspectos moleculares, as alterações genéticas e bioquímicas que ocorrem no desenvolvimento das malignidades cutâneas são apenas parcialmente compreendidas, havendo muito interesse no conhecimento e determinação das bases genéticas dos tumores cutâneos não

melanoma que expliquem seus fenótipos, comportamentos biológicos e potenciais metastáticos distintos (MARTINEZ *et al.*, 2006).

É sabido que tumores expressam aberrantemente vários glicanos (FUSTER & ESKO, 2005; WANG *et al.*, 2009; PICCO *et al.*, 2010). A glicosilação aberrante ocorre essencialmente em todos os tipos de cânceres experimentais e humanos e muitos epítomos glicosil constituem antígenos tumor-associados. Estudos recentes indicam que a glicosilação aberrante é o resultado da transformação oncogênica inicial, bem como um evento-chave na indução da invasão e metástase (HAKOMORI, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Além disso, os carboidratos expressos aberrantemente nas células cancerígenas contêm predominantemente um aumento de estruturas sialiladas (ácidos siálicos) catalizados por uma família de enzimas chamadas de sialiltransferases (STs) (TANG *et al.*, 2005; HEDLUND *et al.*, 2008; LÓPEZ-MORALES *et al.*, 2009).

O estudo destas mudanças na estrutura de oligossacarídeos de superfície celular, provocadas por ação conjunta de glicosiltransferases como as sialiltransferases, têm sido frequentemente associadas com câncer humano e são importantes por que: (1) eles podem estar relacionados a uma fase precisa da doença e sua detecção com lectinas ou anticorpos monoclonais podem fornecer informações úteis para diagnóstico ou prognóstico, ou ambos; e (2) em muitos casos, contribuem diretamente para a biologia do câncer. Entretanto, existem poucos trabalhos que se dediquem ao estudo das alterações de expressão destas enzimas mudando, conseqüentemente, o padrão de glicosilação (sialilação) nos processos cancerígenos. No caso dos TCNM pouco se sabe sobre as mudanças no padrão de sialilação durante a transformação neoplásica resultantes das alterações na expressão de sialiltransferases específicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a expressão de sialiltransferases e o perfil histoquímico com lectinas em tumores cutâneos não melanomas pré-malignos e malignos.

2.2 Específicos

- Avaliar o perfil sacarídico para terminais carregando ácidos siálicos através da histoquímica com as lectinas SNA e MAA;
- Avaliar a expressão de β -galactosideo α 2,6 sialiltransferase (ST6Gal.I) e β -galactosideo α -2,3 sialiltransferase (ST3Gal.I) em carcinoma basocelular, ceratoacantoma, carcinoma epidermóide e ceratose actínica através da imunohistoquímica;
- Realizar a análise de imagem dos resultados obtidos na histoquímica com lectinas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer: uma visão geral

Cânceres são doenças genéticas, caracterizadas pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma de células alteradas (INCA, 2012). Estas células apresentam vantagens quanto à proliferação e/ou resistência a mecanismos de indução de morte celular, o que culmina na manutenção da célula geneticamente alterada no tecido de origem. Ao longo do tempo, as células transformadas podem adquirir capacidade de invasão local, indução sustentada de alterações no microambiente tecidual, como por exemplo, formação de novos vasos (angiogênese), e finalmente a capacidade de metástase, responsável pela morte de cerca de 2 a cada 3 pacientes com câncer (CHAMMAS *et al.*, 2003; INCA, 2012).

O que leva a malignidade no câncer é sua habilidade em quebrar a arquitetura tecidual, invadir fronteiras teciduais rompidas e metastatizar para órgãos distantes. Em outras palavras, câncer é uma doença de desenvolvimento, ou seja, resultante da perda dos controles normais, os quais conduzem as células a se manterem dentro dos limites teciduais. Para a formação do câncer, é necessário o crescimento descontrolado das células, porém não é o suficiente. Apenas quando o crescimento celular torna-se autônomo e leva à desorganização da arquitetura do tecido normal se pode reconhecer quando um tecido normal sofre “transformação neoplásica” (INGBER, 2008).

Dependendo do comprometimento orgânico e geral produzidos pela neoplasia, ela é classificada em: benigna, maligna ou potencialmente maligna. Neoplasias benignas normalmente crescem devagar, podendo evoluir por anos sem sintomas ou com manifestações discretas, mas mesmo sendo benigna pode levar a morte caso esteja localizada em órgãos vitais (VASCONCELOS, 2000).

Neoplasias malignas tendem, geralmente, a proliferar em ritmo acelerado traduzido, a princípio, por aumento das figuras de mitose ao exame histológico. Entretanto, este achado nem sempre significa malignidade uma vez

que algumas podem crescer lentamente e bruscamente mudar para um padrão de proliferação rápido. Essas neoplasias apresentam dois aspectos característicos: anormalidades celulares e invasão de tecidos vizinhos. Quando ambas estão presentes o diagnóstico torna-se mais acessível. As células desenvolvem-se de forma muito mais desorganizada do que a encontrada nos tumores benignos (FRANKS & TEICH, 1999).

3.2 Anatomia e histologia da pele

A pele tem duas camadas, a epiderme e a derme. A hipoderme ou tecido subcutâneo é um tecido adjacente, isto é, tecnicamente externo à pele, mas relacionado funcionalmente. A epiderme é a camada mais superficial da pele sendo formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Não possui vasos sanguíneos, os nutrientes e o oxigênio chegam a esta camada por difusão, a partir dos vasos sanguíneos da derme. A epiderme é subdividida em 5 camadas; a camada córnea e a camada Lúcida, mais superficiais, constituídas por células mortas e anucleadas com o citoplasma preenchido por queratina; a camada granulosa, com queratinócitos apresentando, no seu citoplasma, uma grande quantidade de grânulos de querato-hialina (proteína precursora da queratina); a camada espinhosa, constituída de células mais achatadas, queratinizadas, que estabelecem contato estreito umas com as outras; e a camada basal, a mais profunda e em contato com a derme, formada de células que se multiplicam incessantemente. Na camada basal encontram-se ainda os melanócitos e os queratinócitos (Figura 1) (RICOTTI *et al.*, 2009).

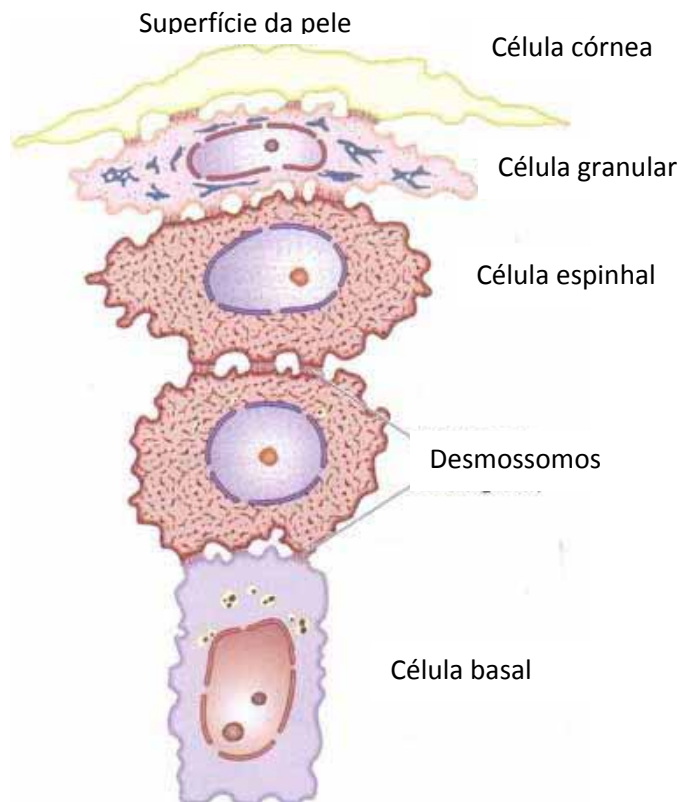


Figura 1. Organização da epiderme e suas quatro camadas. As camadas superficiais são a Camada Córnea e Camada Lúcida, a camada intermediária é a Camada Granulomatosa e a Camada Espinhosa, próxima à Camada Basal. Presença de melanina no interior dos melanócitos da Camada Basal. Fonte: http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_13.htm acesso em 21 de Maio de 2011.

A derme encontra-se debaixo da epiderme e é a mais espessa das duas camadas da pele, correspondendo a 90% da espessura da pele. Suas funções são: regulação da temperatura do corpo e o fornecimento de sangue saturado de nutrientes. A maior parte do suprimento corporal de água está armazenada nesta camada. A maioria das estruturas e células especializadas da pele é encontrada nesta camada (Figura 2) (ROBBINS & COTRAN, 2010).

O tecido subcutâneo, também conhecido como hipoderme, consiste de uma rede de células gordurosas e colágeno. Esta camada funciona como um isolante, conservando o calor do corpo e como um absorvedor de choque, protegendo os órgãos internos. É no subcutâneo que está estocada a gordura que funciona como uma reserva de energia para o corpo. Os vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e folículos pilosos cruzam através desta

região e, além disso, serve para unir a pele aos órgãos adjacentes (Figura 2) (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Como outros órgãos complexos, a pele é composta de células especializadas e estruturas interdependentes que são funcionalmente cooperativas. As células epiteliais escamosas, também conhecidas como queratinócitos e localizadas na epiderme, além de produzirem a queratina, são os principais sítios para a biossíntese de moléculas solúveis (citocinas) que regulam as células epidérmicas adjacentes, assim com as células da derme (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Os melanócitos, localizados na epiderme, são responsáveis pela produção de melanina cuja função é proteção contra os raios ultravioleta. As células dendríticas ou de *Langerhans* interagem com o sistema imune sistêmico, sendo, portanto, células de defesa. Há também as células de Merkel, tidas como mecâno-receptores, e algumas evidências sugerem sua participação no sistema neuroendócrino difuso (SMETAMA *et al.*, 2003).

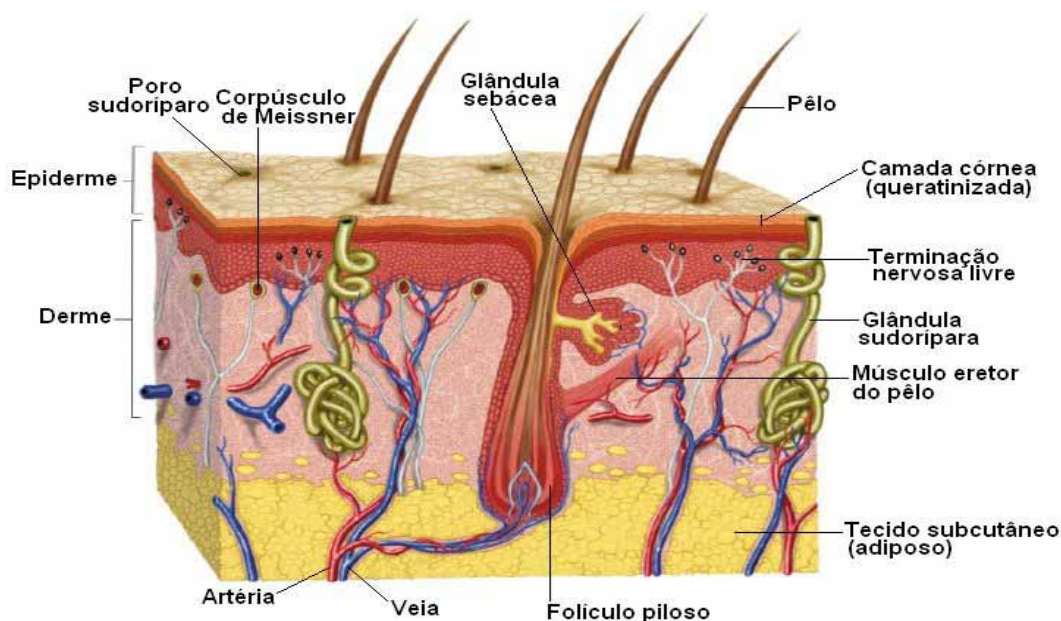


Figura 2. As camadas da pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo) e seus anexos (poros sudoríparos, corpúsculo de Meissner, Glândulas sebácea e sudorípara, pêlos, terminações nervosas, vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e folículos pilosos).
Fonte: <http://naturavendas.wordpress.com/2008/10/04/a-pele/> acesso em 21 de Maio de 2011.

3.3 Tumores cutâneos não melanomas (TCNM)

O câncer de pele é o tipo de tumor mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores registrados no Brasil (INCA, 2012). Eles podem ser classificados em dois grandes grupos: melanoma e não melanoma. O último grupo inclui, principalmente, a ceratose actínica (CA), o ceratoacantoma (KA), o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (KRUNIC *et al.*, 1998).

Os tumores cutâneos não melanomas, são comuns e, apesar se serem raramente fatais, são considerados tumores de crescimento rápido que se negligenciados podem ser localmente e funcionalmente destrutivos, promovendo deformidades e desconforto psicológico significativo em indivíduos afetados (RICOTTI *et al.*, 2009). Estes tumores são também conhecidos como tumores queratinocíticos, pois derivam do epitélio escamoso estratificado queratinizado da epiderme, frequentemente lembrando as estruturas das quais se originam (ROBBINS & COTRAN, 2010).

O termo “ceratose actínica” significa crescimento ceratótico (espesso, escamoso) causado por um dano induzido por radiação eletromagnética, incluindo luz solar. Por esta razão é também chamada de ceratose solar, sendo considerada por alguns dermatologistas como um exemplo de tumor cutâneo pré-maligno com proliferação de queratinócitos atípicos (OGDEN & TELFER, 2009). Histologicamente, trata-se de uma atipia situada nas camadas mais inferiores da epiderme e pode estar associada à hiperplasia de células basais ou à atrofia que resulta em adelgaçamento da epiderme. As células nessa camada frequentemente mantêm seus núcleos (paraceratose) (ROBBINS & COTRAN, 2010). A camada espinhosa da pele é irregular, com zonas atróficas alternando com zonas hiperplásicas, com presença de várias depressões digitiformes. A superfície coberta por hiperkeratose, orto e paraceratose é irregular, por vezes papilomatosa. As células da camada espinhosa, quer do corpo mucoso quer da camada basal, perdem gradualmente as suas características normais, ou seja, aumentam seu volume, tem citoplasma mais claro, núcleos irregulares e maior número de mitoses (ESTEVEZ *et al.*, 1980) (Figura 3).

Clinicamente, a ceratose actínica apresenta-se como uma pequena mancha acastanhada de limites irregulares, mal marcada, plana ou ligeiramente saliente, de superfície lisa ou um pouco rugosa e ceratósica (ROBBINS & COTRAN, 2010).

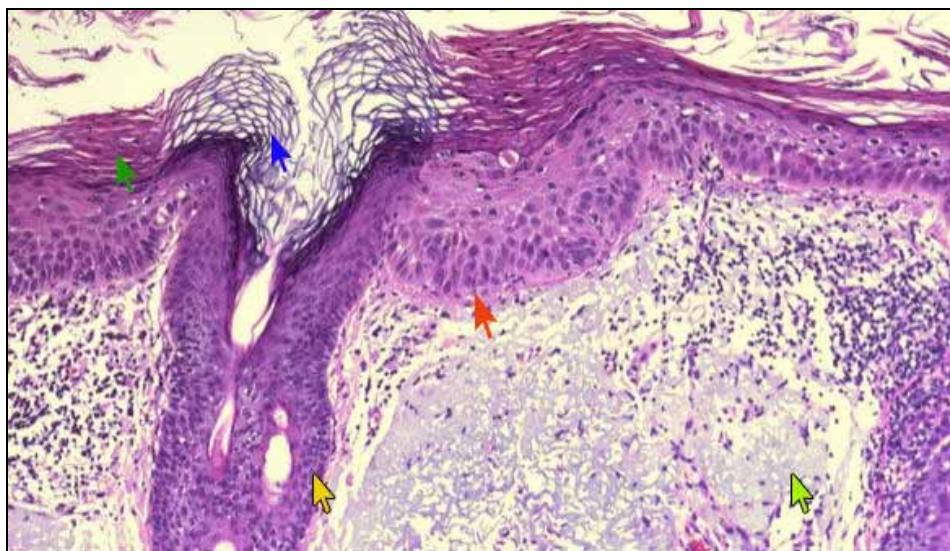


Figura 3. Imagem histológica de ceratose actínica. Presença de paraceratose (seta verde escura), ortoceratose (seta azul), crescimento atípico de queratinócitos na porção inferior da epiderme (seta vermelha), folículo capilar (seta amarela) e elastose solar na derme (seta verde clara). Magnificação de 20x. Fonte: Ricotti *et al.*, 2009.

O ceratoacantoma foi primeiramente descrito como “úlceras crateriformes da face” em 1889. Este tipo de tumor, derivado da bainha epitelial externa dos folículos pilosos, acomete as áreas expostas à luz de indivíduos de pele clara, apresentando crescimento rápido, com histopatologia frequentemente sugestiva de carcinoma de células escamosas, embora sua regressão seja espontânea (Campos *et al.*, 2002). Histologicamente, o tumor é formado por lóbulos de células escamosas com citoplasma vítreo que sofrem queratinização sem uma camada granular intermediária (BILLINGS *et al.*, 2003; ROBBINS & COTRAN, 2010) (Figura 4). Alguns autores (CAMPOS *et al.*, 2002; MANDRELL & SANTA CRUZ, 2009) sugerem que o KA seja um variante do Carcinoma espinocelular devido a algumas características, tais como invasão linfática e perineural e raras metástases, que o KA apresenta em alguns casos.

Macroscopicamente é um tumor em forma de cálice, simétrico com uma depressão central preenchida com debris de queratina. São usualmente

solitários, centrado por zona arredondada em forma de cúpula com nódulos rosa de 0,5 a 2,0 cm de diâmetro (atingindo grandes dimensões), de limites nítidos e regulares (RICOTTI *et al.*, 2009).

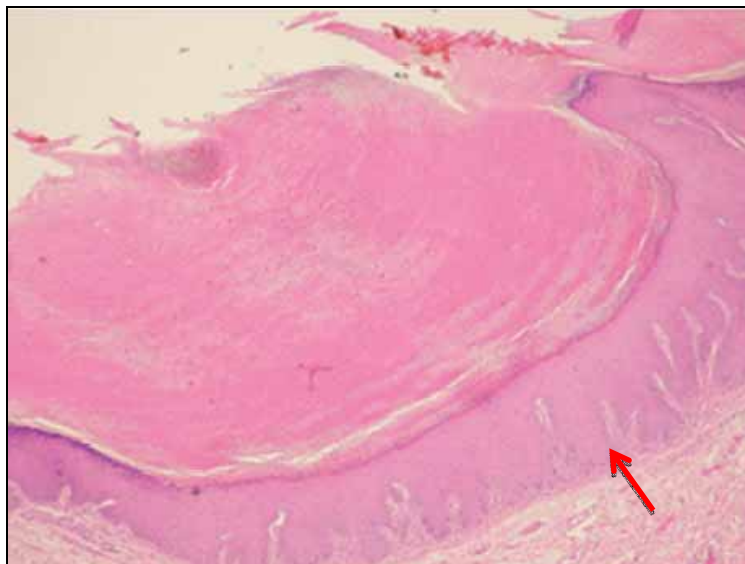


Figura 4. Imagem histológica de ceratoacantoma em fase involutiva (retificação da base da lesão). Magnificação de 10x. Fonte: Ricotti *et al.*, 2009.

Cerca de 95% dos TCNM são representados pelo carcinoma espinocelular (CEC) e carcinoma basocelular (CBC), sendo este último a mais frequente malignidade da pele, pois representa cerca de 75% do TCNM no mundo ocidental. Nos Estados Unidos (EUA), CBC é o tipo de câncer mais diagnosticado, com uma estimativa de cerca de um milhão de casos por ano (MARTINEZ *et al.*, 2006). Tanto o CBC quanto o CEC são tumores derivados de queratinócitos que mostram acentuadas diferenças de comportamento biológico.

Os CBCs são tipicamente de crescimento lento, tumores localmente invasivos que raramente metastizam (YUSPA & DLUGOSZ, 1991; QUINN *et al.*, 2008). Histologicamente, as células tumorais se assemelham às células basais normais da epiderme. Podem ser encontrados com crescimento multifocal derivado da epiderme se estendendo na superfície cutânea ou lesões nodulares que crescem em direção à porção inferior da derme profunda como cordões ou ilhas de células com basofilia variável com núcleos hipercromáticos,

embebidas em uma matriz mucinosa e frequentemente circundadas por muitos fibroblastos e linfócitos. As células na periferia das ilhas tendem a ser rearranjadas radialmente com seus longos eixos em alinhamento paralelo (em paliçada). Nos cortes teciduais, há uma retração do estroma criando fendas características deste tipo de tumor (EPSTEIN, 2008) (Figura 5).

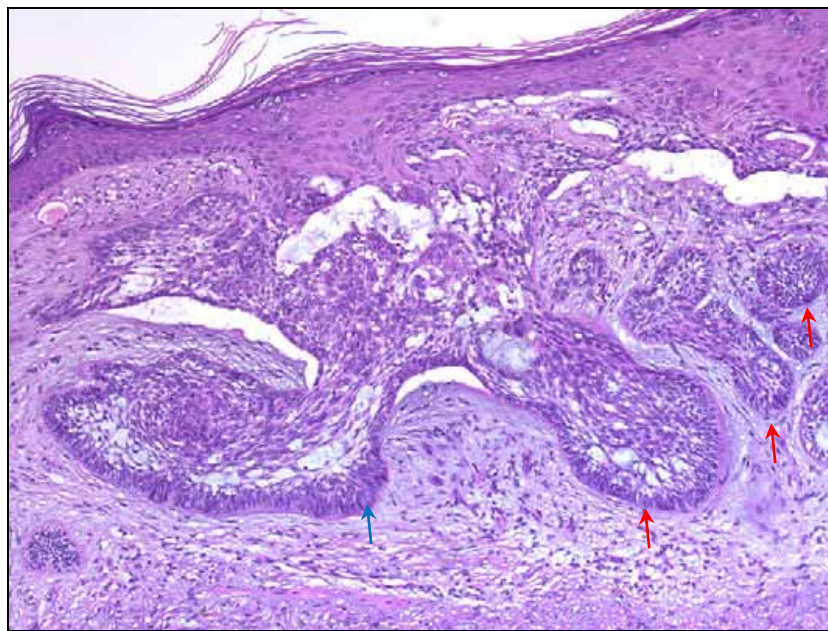


Figura 5. Imagem histológica do carcinoma basocelular. Presença de “ilhas” de células basalóides (setas vermelhas), com disposição em paliçada (seta azul) das células na periferia e arranjo desorganizado das células no interior do tumor. Magnificação 200x. Fonte: Ricotti *et al.*, 2009.

O aspecto histológico tem um papel fundamental no prognóstico da doença, especialmente em relação ao potencial de agressividade local, recidiva e chance de metástase. No caso do CBC há a presença de polimorfismo e a classificação mais aceita didaticamente é a de Sexton *et al.*, (1992) que o divide em (1) nodular, com uma estrutura bem definida com contornos precisos e massa neoplasmática compacta e limitada por células arranjadas em paliçada. Retrações de mucina são observadas ao redor da lesão, e o estroma tende a ser escasso em volta do tumor. Este corresponde a 39% dos casos e é considerado um CBC com baixo potencial de agressividade local; (2) superficial, foco tumoral que se estende da epiderme para a derme, limitado por células bem definidas em paliçada. Retração na área periférica são

encontradas e este corresponde a 17% dos casos, tendo um alto potencial de agressividade local; (3) micronodular, definido como pequenos nódulos tumorais, frequentemente arredondados, com células não tão bem definidas em paliçada na periferia. Um tecido rico em colágeno, com pouca substância mucínica, é observada ao redor deste tipo de CBC que representa cerca de 14% dos casos e é considerado de alto potencial de agressividade local; (4) infiltrativo, tumor de tamanho e forma variados, com poucas células em paliçada e dismorfismo nuclear. Não há evidência de retração do tecido adjacente. Este tipo corresponde a 8% dos casos e apresenta o maior potencial de agressividade local; (5) morfeiforme, ilhas tumorais pequenas, com contorno angular. Não há retração e o colágeno periférico é esclerótico. Representa 2% dos casos de CBC e o potencial invasivo e o grau de agressividade local são considerados muito altos (SANTOS *et al.*, 2010).

A apresentação clínica mais comum é o CBC nódulo-ulcerativo, que inicialmente apresenta-se como pápula rósea crescendo progressivamente a nódulo, com posterior ulceração central, recoberta de crosta, ocorrendo sangramentos quando traumatizada. As bordas geralmente são cilíndricas e translúcidas (SAMPAIO, 2000).

Os carcinomas espinocelulares (CECs) tendem a ter crescimento mais rápido, são tumores localmente invasivos com diferentes potenciais metastáticos (YUSPA & DLUGOSZ, 1991; QUINN *et al.*, 2008). O mecanismo envolvido na patogênese do CEC é complexo e multifatorial, e requer tanto predisposição genética quanto exposição ambiental. O HPV desempenha um papel importante no desenvolvimento deste tumor tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunodeprimidos (RICOTTI *et al.*, 2009). Os CECs consistem, histologicamente, em ninhos de células epiteliais escamosas atípicas misturadas com células escamosas normais, que surgem a partir da epiderme e se estendem até a derme (RICOTTI *et al.*, 2009). Apresentam acentuado componente estromal com invasão perineural, formação de pérolas de queratina e pontes intercelulares. O tumor é formado por massas ou trabéculas de dimensões muito diversas, de limite mal demarcado e em contato com a superfície malpighiana, invadindo a derme (GURUDUTT & GEDEN, 2011) (Figura 6).

Os CECs apresentam diferentes graus de diferenciação, variando de tumores compostos de células poligonais arranjadas em lóbulos ordenados com grandes áreas de queratinização à neoplasias associadas à necrose geográfica consistindo em células altamente anaplásicas que exibem apenas queratinização celular individual abortiva (disqueratose) (ROBBINS & COTRAN, 2010). Alguns autores têm proposto características histológicas para determinar o prognóstico do CEC, mas atualmente não existem critérios definitivos. Muitos sugerem que o prognóstico deve se basear nas variantes histológicas do tumor, na profundidade da invasão ou se existe envolvimento perineural, mas isto ainda não está bem definido (CASSARINO *et al.*, 2006; RICOTTI *et al.*, 2009).



Figura 6. Imagem histológica do carcinoma espinocelular invasivo. Presença de células escamosas que surgem na epiderme e estendem-se profundamente na derme (seta preta) e presença de pérolas de queratina (setas vermelhas). Magnificação 100x. Fonte: Ricotti *et al.*, 2009.

Macroscopicamente, os CECs apresentam-se como pápulas vermelhas escamosas. Posteriormente evoluem para placas ou nódulos firmes, lisos ou hiperkeratóticos, com ulceração presente. Alguns pacientes podem descrever essas lesões como feridas pruriginosas ou dolorosas, que sangram quando traumatizadas (GARCIA-ZUAZAGA & OLBRICHT, 2008).

A maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva ao sol (Figura 7). A Sociedade Americana de Câncer estimou, em 2007, mais de um milhão de casos de carcinomas basocelulares (CBC) e espinocelulares (CEC), e cerca de 60 mil casos de melanoma, estariam associados à radiação ultravioleta (UV) (INCA, 2012). De fato, a exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), especialmente do tipo B (UVB), tem sido associada a um risco aumentado de desenvolver câncer de pele, incluindo CBC e CEC (RATNER *et al*, 2001) porque pode causar mutações genéticas no ácido desoxirribonucléico (DNA) dos queratinócitos, e falha no reparo dessas alterações gênicas pode conduzir a um crescimento celular desordenado e à formação do tumor (ANANTHASWAMY, 1990). Além disso, a radiação ultravioleta tem um efeito importante sobre o sistema imunológico da pele, induzindo a um local estado de imunossupressão que impede a rejeição do tumor recém-formado (MARTINEZ *et al.*, 2006).

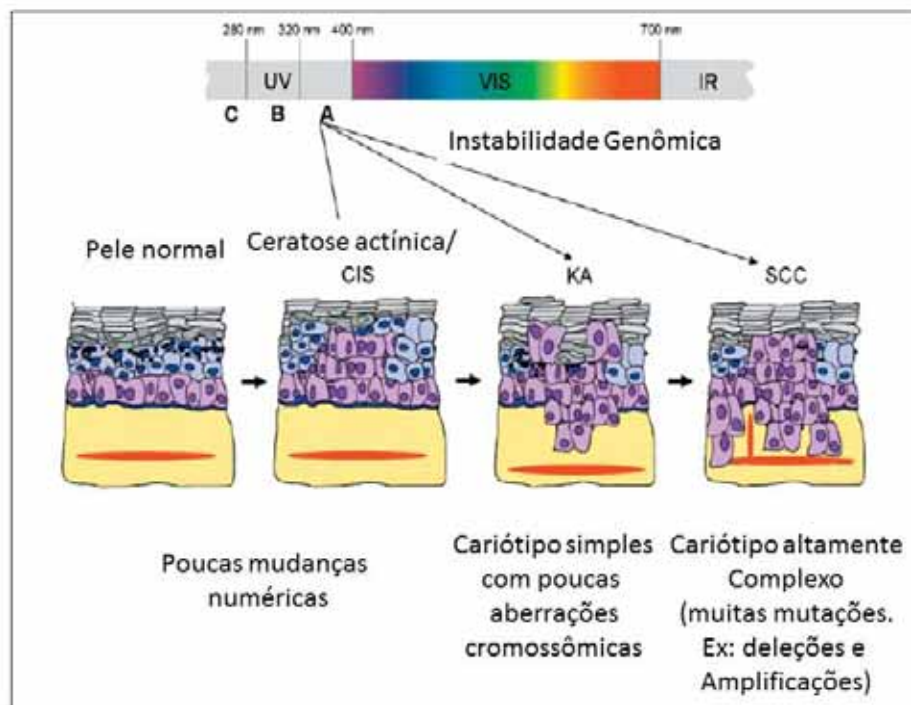


Figura 7. Esquema da carcinogênese dos diferentes Tumores Cutâneos Não melanomas através da exposição contínua a radiações ultravioletas (Tipo A e tipo B).

Fonte: Adaptado de Boukamp, 2005.

A probabilidade de desenvolvimento de câncer de pele em um indivíduo depende da predisposição constitucional (características fenotípicas e genotípicas) e subsequentemente a exposição a fatores de riscos ambientais. O maior fator de risco constitucional para câncer de pele de todos os tipos é a cor da pele. Estes tumores ocorrem predominantemente em pessoas de pele clara com crescente redução de risco com o aumento da coloração natural da pele (MARKS *et al.*, 2006).

Tumores expressam aberrantemente vários glicanos (FUSKER & ESKO, 2005). A glicosilação aberrante ocorre essencialmente em todos os tipos de cânceres experimentais e humanos e muitos epítomos glicosil constituem antígenos tumor-associados. Estudos indicam que a glicosilação aberrante é o resultado da transformação oncogênica inicial, bem como um evento-chave na indução da invasão e metástase (HAKOMORI, 2002).

A glicosilação promovendo ou inibindo a invasão de células tumorais e metástase é de importância crucial na pesquisa do câncer atual. Todavia, esta área de estudo recebe pouca atenção da maioria dos biólogos celulares envolvidos na pesquisa do câncer, principalmente porque conceitos estruturais e funcionais de glicosilação em câncer são mais difíceis de entender que o papel funcional de certas proteínas e seus genes na definição de fenótipo de células cancerosas.

3.4 Glicosilação, Glicosiltransferases e sialiltransferases

Os glicanos, cadeias da unidade estrutural monossacarídica, são encontrados na natureza, livres ou associados na forma de glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolípidos). A diversidade estrutural dos glicanos é muito superior à verificada em proteínas e ácidos nucleicos, o que justifica que as funções biológicas desempenhadas por estes compostos são também muito diversas (RAMAN *et al.*, 2005).

Muitos glicanos bioativos presentes na superfície celular estão envolvidos numa grande variedade de processos importantes para a biologia da célula: crescimento e proliferação celular, metástases tumorais,

anticoagulação, comunicação célula-célula, início de infecção por bactérias e vírus, e reconhecimento imune (RAMAN *et al.*, 2005; WEIJERS *et al.*, 2008). O papel biológico destes glicanos é tipicamente atribuído às suas interações com proteínas e com o modo como modelam a atividade destas na interface célula-célula e célula-meio extracelular. Consequentemente os glicanos biologicamente ativos têm vindo a ser reconhecidos como uma classe de biomoléculas relevantes para a indústria biomédica (KOELLER & WONG, 2000)

A glicosilação é uma modificação ubíqua que ocorre nos organismos superiores após a tradução de proteínas, e que permite a uma proteína (ou lipídeo) adquirir diferentes funções, e gera diversidade estrutural que justifica o fato da diversidade biológica não se correlacionar com o baixo número de genes do genoma humano.

Existem duas famílias de enzimas: as glicosiltransferases e as glicosidases, que *in vivo* são responsáveis pela formação da maior parte dos glicoconjugados presentes na superfície celular (WEIJERS *et al.*, 2008). As glicosidases, também designadas glicosil-hidrolases, caracterizadas por um grupo vasto de enzimas responsáveis pela quebra de ligações glicosídicas. Por sua vez, as glicosiltransferases catalisam a transferência de açúcares presentes num doador glicosilado (na maioria das vezes um açúcar de nucleotídeo), para moléculasceptoras, formando ligações glicosídicas (PITEIRA, 2009).

Para alguns autores (TANIGUCHI *et al.*, 2002), a variedade dos glicanos pode ser gerada principalmente pela ação coordenada de glicosiltransferases. Desta forma a variabilidade estrutural dos glicanos seria ditada pela regulação tecido-específica dos genes de glicosiltransferases bem como pela disponibilidade de açúcares de nucleotídeos e pela competição entre enzimas pelos aceptores intermediários durante a elongação do glicano (LAIDLER *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que a superexpressão de glicosiltransferases específicas pelas células tumorais promove a formação de glicanos tumorais que facilitam a invasão (FUSTER & ESKO, 2005) devido à diminuição da

adesividade célula-célula, conferindo às células cancerosas a possibilidade de desenvolvimento de metástase (KANITAKIS *et al.*, 1998).

A maioria das mudanças no padrão de glicosilação que ocorre durante a oncogênese está associada ao aumento de sialilação na extremidade dos glicoconjugados, formando sialilconjugados (CAZET *et al.*, 2010). A biossíntese e metabolismo dos sialilconjugados são controlados por um número elevado de enzimas, que inclui sialidases, sialiltransferases, esterases e liases, assumindo as sialiltransferases um papel fundamental no final da biossíntese de todas as estruturas sialiladas. (WEIJERS *et al.*, 2008)

As sialiltransferases (STs) humanas são uma família de pelo menos 20 proteínas glicosiltransferases normalmente, ligadas à membrana do Complexo de Golgi (HARDUIN-LEPERS *et al.*, 2001; PITEIRA, 2009). As ST humanas catalisam a transferência do ácido siálico do açúcar do nucleótido doador, CMP-Neu5Ac, para a unidade aceitadora na posição terminal de um glicoconjugado seja ele uma glicoproteína ou um glicolípido (PERACLAULA *et al.*, 2005).

Os glicoconjugados presentes nos mamíferos possuem um número limitado de ligações sialil. O ácido siálico (Neu5Ac) pode estar ligado a um resíduo galactose (Gal) por uma ligação $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$; a um resíduo N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou N-acetilglucosamina (GlcNAc) por uma ligação $\alpha 2,6$; ou ainda a outro ácido siálico por uma ligação $\alpha 2,8$ (HARDUIN-LEPERS *et al.*, 2001). Assim, as ST designam-se por ST3, ST6 e ST8, indicando os números 3, 6 e 8 a transferência do grupo Neu5Ac para a 3^a, 6^a ou 8^a posição hidroxil da molécula aceitadora, respectivamente (PITEIRA, 2009).

As sialiltransferases da subfamília ST3 transferem o grupo NeuAc para unidades terminais de galactose (Gal), designando-se por ST3Gal. Existem 6 membros nesta sub-família. A adição de Neu5Ac por parte das ST3Gal depende da unidade sub-terminal, o que lhe confere alguma especificidade (WANG, 2005).

Os membros da sub-família ST6 catalisam uma ligação $\alpha 2,6$, que adiciona Neu5Ac aos resíduos Gal presentes na posição terminal de N-acetilglucosamina (Gal-1-4GlcNAc), ou para resíduos GalNAc sub-terminais de

glicoproteínas e gangliosídeos. Por último, a sub-família das ST8 é diferente das restantes sub-famílias mencionadas, uma vez que transfere NeuAc para outros resíduos de NeuAc, presentes em gangliosídeos e em ácido polissialico, que é um homopolímero de diferentes dimensões em glicoproteínas (Figura 8) (HARDUIN-LEPERS *et al.*, 2001; WEIJERS *et al.*, 2008).

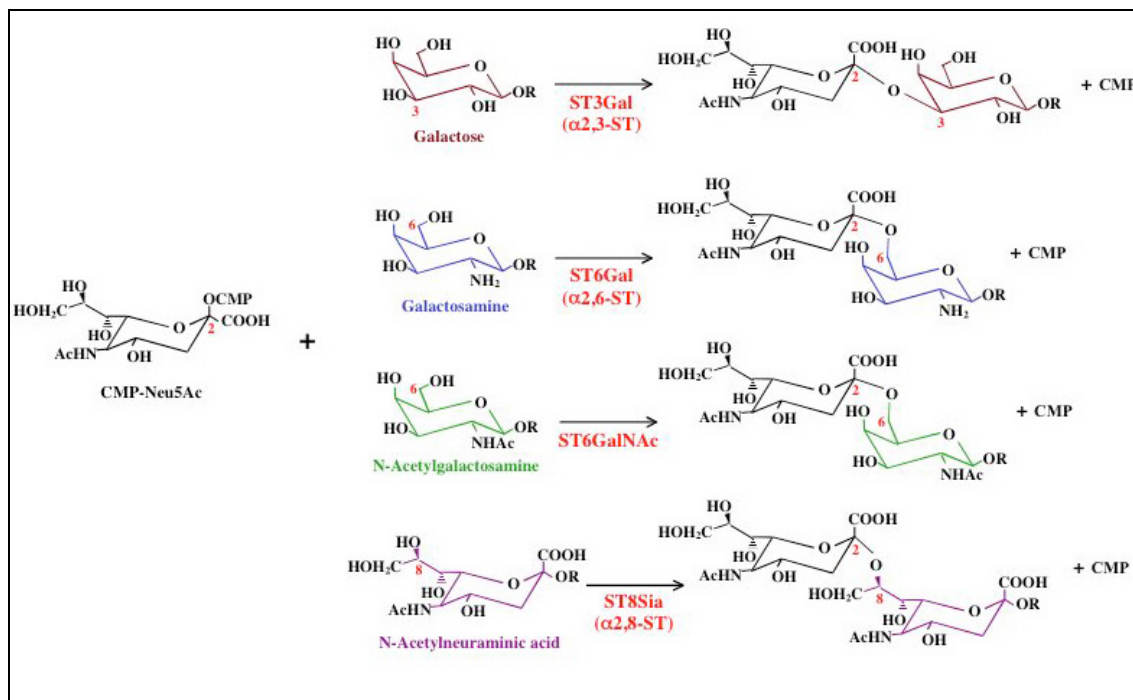


Figura 8. Subfamílias de sialiltransferases (ST3, ST6 e ST8), seus principais substratos (galactose, galactosamina, N- acetylgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico) e os padrões de ligação ($\alpha 2,3$; $\alpha 2,6$; $\alpha 2,6\text{GalNAc}$ e $\alpha 2,8$). Neu5AC: ácido siálico. CMP: citosina 5'-monofosfato. Fonte: WANG, 2005.

Estudos revelam que a inibição de sialiltransferases (DRINNAN, 2003) ou gene alvos das sialiltransferases como ST6 Gal I (HENNET, 1998), ST8Sia-I (OKADA, 2002), ST3Sia-V (YAMASHITA, 2003), e polisialo-sintases (ANGATA, 2004; ECKHARDT, 2000) indicam que a sialilação de glicoproteínas ou glicoesfingolipídeos é muito importante no desenvolvimento tumoral, desenvolvimento neural, reparo de nervo, processos imunológicos e regulação de sensibilidade hormonal (SENDA, 2007). Alguns autores propõem a investigação do nível de expressão dos genes de sialiltransferases como um marcador prognóstico para o acompanhamento de pacientes com câncer de mama (CAZET *et al.*, 2010).

As sialiltransferases são relevantes no câncer por várias razões: a) os ácidos siálicos, monossacarídeos com carga eletronegativa em pH fisiológico, podem evitar interações célula-célula através de efeitos de repulsão de carga não específicos; b) as estruturas sialiladas podem ser especificamente reconhecidas por moléculas de adesão como selectinas; c) os ácidos siálicos podem mascarar açúcares de estruturas adjacentes, evitando assim o reconhecimento por outras moléculas como lectinas, por exemplo as selectinas; d) os elementos regulatórios dos genes de sialiltransferase podem ser um alvo das vias de sinalização celular específicas. Um exemplo foi fornecido na regulação-up de ST6Gal I pela superexpressão do oncogene *ras* (GESSNER *et al.*, 1993; DALL'OLIO *et al.*, 2001) .

3.5 Lectinas: ferramentas úteis no diagnóstico

No final do século XIX, começaram a surgir evidências sobre a presença na natureza de proteínas que possuíam a habilidade de aglutinar eritrócitos. Estas proteínas foram referidas como hemaglutininas, ou fitoaglutininas, pois elas foram originalmente encontradas em extratos de plantas. É consenso acreditar que a primeira descrição de uma hemaglutinina foi feita por Peter Hermann Stillmark na sua tese de doutorado apresentada em 1888 (ZANETTI, 2007).

Em 1952, Watkins e Morgan demonstraram que a atividade aglutinante, observada nas até então chamadas hemaglutininas, estava baseada na atividade específica de ligação de uma dada lectina a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1998). O termo lectina, do latim *legere*, foi proposto em 1954 por Boyd e Sharpleigh, enfatizando a propriedade de algumas proteínas aglutinarem seletivamente distintos tipos celulares, uma vez que o termo significa escolher, selecionar (VAN DAMME *et al.*, 1998; VAN DAMME, 2011).

Tão logo o reconhecimento das lectinas como moléculas ligantes a carboidratos, as mesmas puderam ser distinguidas das outras proteínas com base em critérios funcionais bem definidos. Devido a sua habilidade em ligar-se a carboidratos de forma altamente específica e geralmente reversível e sem

alterar a estrutura dos ligantes reconhecidos, as lectinas têm se destacado como importantes ferramentas em pesquisas englobando diversas áreas da ciência, em especial na Bioquímica, na Biologia Celular e Molecular, na Imunologia, na Farmacologia, na Medicina e Análises Clínicas (LIMA, 2010).

Estudos têm empregado lectinas como potenciais anticarcinogênicos (DE MEIJA *et al.*, 2003), conjugadas a agentes quimioterápicos úteis no tratamento de tumores induzidos em animais (HASEENABEEVI *et al.*, 1991) ou como sonda alternativa em imagens celulares e biomarcadores (WENG *et al.*, 2006).

O interesse nas lectinas intensificou-se quando se descobriu que elas constituíam ferramentas extremamente valiosas para investigação de glicanos de superfície celular, para determinação do papel na diferenciação e crescimento celular, nas interações de células com seu nicho e também numa variedade de processos patológicos (SHARON, 2007).

Os maiores avanços em histoquímica advieram da descoberta das lectinas promovendo um enorme impacto na biologia e histopatologia celular. Por muitos anos, as lectinas foram usadas para isolar e purificar glicoproteínas e determinar a posição de glicoconjugados nas células. As funções celulares dos carboidratos unidos às proteínas foram relatadas e observou-se que eram afetadas pela glicosilação e subsequentemente modificações e rearranjos ou adição de açúcares em processos patológicos (YAMAMOTOA *et al.*, 2005). As lectinas, com suas propriedades exclusivas, se ligam a carboidratos específicos presentes nos glicoconjugados na superfície celular permitindo uma visualização das modificações na distribuição e arquitetura destes açúcares frente a diferentes processos patológicos (SHARON, 2007).

Os primeiros estudos de cânceres empregando histoquímica com lectinas foram realizados por Klein e colaboradores (1981). Os estudos histoquímicos e/ou imunohistoquímicos, em que reações químicas são realizadas em secções histológicas, são particularmente úteis para demonstrar a arquitetura estromal de um tumor, por ressaltar estruturas da matriz extracelular e frequentemente a dimensão da extensão tumoral. As lectinas funcionam como ligantes de vários glicoconjugados que se encontram em

proporções variadas em diferentes membranas celulares e fluídos fisiológicos, refletindo a diversidade de seus papéis biológicos (SHARON & LIS, 2004).

Dessa forma, devido à série de mudanças bioquímicas, como variações do perfil de carboidratos expressos, que ocorrem num ambiente celular em processos neoplásicos, as lectinas tornam-se interessantes ferramentas diagnósticas na diferenciação histoquímica para glicoconjugados de superfície e intracelulares de células transformadas (HERLING *et al.*, 2000; BELTRÃO *et al.*, 2001, 2003; THOM *et al.*, 2007; REGO & BELTRÃO, 2009; SOBRAL *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2010; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011).

A *Sambucus nigra* L. é a fonte da SNA (*Sambucus nigra* agglutinin). A árvore contém muitos componentes nas flores, frutos e casca que podem ser explorados por suas propriedades anti-inflamatória, antiviral, anti-proliferativa e inseticida, entre outros (VANDENBUSSCHE *et al.*, 2004; ROSCHEK *et al.*, 2009). Algumas destas propriedades parecem estar relacionadas com lectinas conhecidas como *Sambucus nigra* agglutinins, das quais existem seis subtipos conhecidos. A isoforma SNA I têm especificidade de ligação pela sequência sacarídica NeuAc (α 2, 6) Gal/GalNAc, isto é, reconhece resíduos de ácido siálico na posição α 2,6 (SHIBUYA *et al.*, 1987; LÓPES-MORALES *et al.*, 2010).

A MAA é uma lectina isolada da semente da planta *Maackia amurensis* com fraco potencial hemaglutinante e forte potencial leucoaglutinante para o linfoma de células de rato BW5147 (WANG & CUMMINGS, 1987). Sua especificidade de ligação a carboidratos foi determinada, em 1987, por Wang e Cummings. Estes autores observaram que esta lectina reconhece a sequência trissacarídica NeuAc (α 2,3) Gal β 1,4GlcNAc/Glc, isto é, resíduos de ácidos siálicos na posição α 2,3. A conexão entre a marcação de MAA e o comportamento de invasão e metástase das células cancerígenas foi analisada em alguns tumores e o resultado mostrou uma estreita associação entre a marcação com esta lectina e a progressão tumoral (TANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2009; JUN *et al.*, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Lectinas *Sambucus nigra* (SNA) (Vectot Lab, USA) e *Maackia amurensis* (MAA) (VectorLab, USA) conjugadas à Biotina. Os anticorpos monoclonais anti-ST3Gal I e anti-ST6 Gal I foram adquiridos da SIGMA. O kit biotina-estreptavidina-peroxidase e a diaminobenzidina foram obtidos da DAKO (USA). Todos os demais reagentes foram obtidos em grau analítico.

4.2 Seleção dos casos

Foram selecionadas 75 biopsias de tumores cutâneos não melanomas do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), previamente diagnósticos, no período entre 2006 e 2010. Amostras de pele normal (n=11) foram obtidas no Hospital Santa Clara, Recife, PE. O diagnóstico dos tumores cutâneos foi baseado em critérios histopatológicos e clínicos (KRUNIC *et al.*, 1998).

4.3 Aspectos éticos

O presente projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE Nº 195/09).

4.4 Histoquímica com Lectinas

Cortes histológicos de 4µm de espessura, montados em lâminas albuminizadas, foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foram tratados com uma solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37°C por 2 minutos e incubados com as lectinas SNA ou MAA conjugadas a biotina (na concentração de 20µg/mL e 40µg/mL, respectivamente) por 2 horas à 4°C. A revelação da ligação lectina-carboidrato foi visualizada com o kit estreptavidina-biotina peroxidase e revelada com uma solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Todas as lavagens entre as etapas descritas, foram

realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2, suplementado com NaCl 150mM (PBS). Para o controle negativo da histoquímica, foi realizado um ensaio de inibição das lectinas com ácido siálico (100 a 300 mM) bem como substituição das lectinas por tampão PBS.

4.5 Imunohistoquímica

Cortes histológicos (4µm), montados em lâminas albuminizadas, foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato a 0,01M, pH 6.0 em câmara de vapor de água (STIMER) por 30 minutos. Após o resfriamento, os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol (1:1) por 30 minutos a 25°C seguido de incubação com solução de PBS/BSA a 1% por 45 minutos a TA°. Na etapa seguinte, os tecidos foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-ST3 Gal I (1:200, SIGMA) e o anticorpo monoclonal anti-ST6 Gal I (1:200, SIGMA) por *overnight* à 4°C. A localização do anticorpo foi feita com o kit biotina-estreptavidina-peroxidase e sua revelação com DAB-H₂O₂. Todas as lavagens realizadas entre as etapas descritas foram realizadas com tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2 suplementado com NaCl 150mM (PBS). Para o controle negativo da imunohistoquímica, lâminas foram incubadas sem a adição do anticorpo primário, sendo este substituído pelo tampão PBS.

4.6 Análise Digital das Imagens

Foi utilizado um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico Eclipse 50i (Nikon,USA). Foram analisadas áreas aleatórias (µm²) levando em consideração o número de células marcadas por área. A análise quantitativa das células marcadas foi aferida utilizando sistema automático, avaliando-se três áreas em cada caso. A intensidade da marcação foi determinada de acordo com Dornelas (2009) como: (1+) para marcação de até 1/3 das células tumorais; (2+) para marcação de até 2/3 de células tumorais; e (3+) marcação acima de 2/3 células tumorais, com observação de três campos

microscópicos, com aumento de 100x. Às lâminas que não apresentaram marcação foi atribuído (0).

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada através do *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. REFERÊNCIAS

- ANANTHASWAMY, H.N.; PIERCEALL, W. E. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation Carcinogenesis. **Photochem Photobiol**, 52 (6): 1119-1136, 1990.
- ANGATA, K.; LONG, J. M.; BUKALO, O.; LEE, W.; DITYATEV, A.; WYNshaw-BORIS, A.; SCHACHNER, M.; FUKUDA, M.; MARTH, J. D. Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. **J. Biol. Chem.**, 279(31): 32603–32613, 2004.
- BELTRÃO, E. I. C.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR, L. B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectina histochemistry study. **Anais Faculdade Medicina Universidade de Pernambuco**, Recife, Brazil 46: 32-35, 2001.
- BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR, L. B. *Parkia pendula* lectina histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal Histochemistry**, 47: 139-142, 2003.
- BILLINGS, S. D.; SOUTHALL, M. D.; LI, T.; COOK, P. W.; BALDRIDGE, L.; MOORES, W.B.; SPANDAU, D, F.; FOLEY, J. G.; TRAVERS, J. B. Amphiregulin Overexpression Results in Rapidly Growing Keratinocytic Tumors. **American Journal of Pathology**, 163 (6): 2451-2458, 2003.
- BOUKAMP, P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? **Carcinogenesis**, 26(10): 1657–1667, 2005.
- CASSARINO, D.S.; DERIENZO, D. P.; BARR, R. J. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification—part two. **J Cutan Pathol**, 33(4):261–79, 2006.

CHAMMAS, R.; SILVA, D. C. P.; WAINSTEIN, A. J. A.; ABDALLAH, K. A. Imunologia Clínica das neoplasias. USP. 2003 Disponível em <http://www.direxlim.fm.usp.br/download/imuneo.pdf>. Acesso em 20 de Março de 2011.

CAMPOS, D. M. A. B.; GASPAR, N. K.; GASPAR, A. P.; FONSECA, E. C.; PIRES, A. R. C. Ceratoacantoma – Aspectos Imuno- histoquímicos Diferenciais do Carcinoma de Células Escamosas. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. 77 (4): 417-424, 2002.

CAZET, A.; JULIEN, S.; BOBOWSKI, M.; KRZEWSKI-RECCHI MA, HARDUIN-LEPERS, A.; GROUX-DEGROOTE, S.; DELANNOY, P. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. **Carbohydrate Reserach**, 345(10): 1377-1383, 2010.

DALL'OLIO, F.; CHIRICOLO, M. Sialyltransferases in cancer. **Glycoconjugate Journal** 18: 841-850, 2001.

DE MEIJA, E. G.; BRADFORD, T.; HASTER, C. The anticarcinogenic potencial of soybean lectina and lunasin. **Nutri Rev**. 61(7): 239-246, 2003.

DORNELAS, M. T.; RODRIGUES, M. F.; MACHADO, D. C.; FERREIRA, A. P.; GOLLNER, A. M. Expressão de Marcadores de Proliferação Celular e Apoptose no Carcinoma Espinocelular de Pele e Ceratose Actínica. **Anais Bras Dermatol.**, 84(5): 469-475, 2009.

DRINNAN, N. B.; HALLIDAY, J.; RAMSDALE, T. Inhibitors of sialyltransferases:potential roles in tumor growth and metastasis. **Mini. Rev. Med. Chem.**, 3(6): 501–517, 2003.

ECKHARDT, M.; BUKALO, O.; CHAZAL, G.; WANG, L.; GORIDIS, C.; SCHACHNER, M.; GERARDY-SCHAHN, R.; CREMER, H.; DITYATEV, A. Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialV/PST-1 allow discrimination of the

roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. **J. Neurosci.**, 20: 5234–5244, 2000.

EPSTEIN, E. H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nature Review Cancer**, 8: 743-454, 2008.

ESTEVEES, J. A.; BAPTISTA, A. P.; RODRIGO, F. G. Dermatologia. Lisboa: Fundação Caloute Gulbenkian, 1980. 1485p.

FRANKS, L. M. & TEICH, N. M. **Introduction to the cellular and molecular biology of cancer**. Oxford University Press Inc., 3° edition, 1999.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The Sweet and Sour of Cancer: Glycans as Novel Therapeutic Targets. **Nature**. 5: 526-542, 2005.

GARCIA-ZUAZAGA, J.; OLBRICHT, S. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Advances in Dermatology* 24: 33–57, 2008.

GESSNER, P.; RIEDL, S.; QUENTMAIER, A. & KEMMNER, W. Enhanced activity of CMP-neuAc: Galb1–4GlcNAc: a 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients. **Cancer Lett.**, 75, 143–149, 1993.

GURUDUTT, V. V.; GENDEN, E. M. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of Skin Cancer*, Article review, 1-10, 2011.

HAKOMORI, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proc Natl Acad Sci**, 99: 10231-10233, 2002.

HARDUIN-LEPERS, A.; VALLEJO-RUIZ, V.; KRZEWINSKI-RECCHI, M. A.; SAMYN-PETIT, B.; JULIEN, S.; DELANNOY, P. The human sialyltransferase family. **Biochimie** 83 (8): 727–737, 2001.

HASEENABEEVI, V. M.; REMANI, P.; ANIL, S.; VIAJAYAKUMAR, T. Plant lectins-histochemical and cytochemical applications in oncology. **Indian Journal of Dental Research**. 2(3-4): 45-53, 1991.

HEDLUND, M. N.G. E.; VARKI, A.; VARKI, N. M. Alpha 2-6-Linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation *in vivo*. **Cancer Research**, 68: 388-394, 2008.

HENNET, T.; CHUI, D.; PAULSON, J. C.; MARTH, J. D. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**,95: 4504–4509, 1998.

HERLING, M.; KNOLLE, J.; BAHN, H.; GABIUS, H. J.; HINZE, R. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. **In vivo**, 14 (4): 499-506, 2000.

INGBER, D. E. Can Cancer reversed by engineering the tumor microenvironment? **Seminars in Cancer Biology**, 8(5):356-364, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2010: **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acesso em 12 de Dezembro de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2012: **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. Acesso em 12 de Janeiro de 2012.

JUN, L.; WANG, Y.; YANYING, X.; ZHONGFA, X.; JIAN, Y.; WANG FENGLING, XIANJUN, Q.; KOKUDO, N.; WEI, T.; WEIXIA, Z. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. **Med Oncol**, 2010.

KANITAKIS, J.; BOURCHANY, D.; FAURE, M.; CLAUDY, A. Expression of the Intermediate Filament peripherin in the Skin Tumors. **Eur J Dermatol.**, 8 (5): 339-342, 1998.

KOELLER, K.M. & WONG, C.H. Complex carbohydrate synthesis tools for glycobologists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies. **Glycobiology** 10: 1157-1169, 2000.

KRUNIC, A. L.; GARROD, D. R.; MADANI, S.; BUCHANAN, M. D.; CLARK, R. E. Immunohistochemical staining for desmogleins I and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. **British Journal of Cancer** 77:1275-1279, 1998.

LAIDLER, P.; LITYNSKA, A.; HOJA-LUKOWICZ, D.; LABEDZ, M.; PRZYBYŁO, M.; CIOŁCZYK-WIERZBICKA, D.; POCHEC, E.; KREMSER, E. Characterization of Glycosylation and Adherent Properties of Melanoma Cell Lines. **Cancer Immunol Immunother.** 55: 112–118, 2006.

LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. C. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 1-6, 2010.

LÓPEZ-MORALES, D.; VELÁZQUEZ-MÁRQUEZ, N.; VALENZUELA, O.; SANTOS-LÓPEZ, G.; LEYVA, J. R.;1 AND RUIZ, V. V. Incremento de la transcripción de sialiltransferasas en muestras de cérvix con neoplasia intraepitelial cervical. **Invest Clin.**, 50(1): 45 – 53, 2009.

MANDRELL, J.C.; SANTA CRUZ, D. Keratoacanthoma: hyperplasia, benign neoplasm, or a type of squamous cell carcinoma? **Semin Diagn Pathol.**, 26(3): 150-163, 2009.

MARKS, R. M. B. B. S.; M.P.H.; F.R.A.C.P; F.A.C.D. An Overview of Skin Cancers. **CANCER** Supplement 75(2): 607-612, 2006.

MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; NETO, C. F. Genética Molecular Aplicada ao Câncer Cutâneo Não Melanoma. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 81(5): 405-419, 2006.

MELO-JÚNIOR, M. R.; LIMA-NETO, R. G.; LACERDA, A. M.; BELTRÃO, E. I. Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the *sporotrichosis* and *chromoblastomycosis*. **Mycopathologia.**, 171(6): 403-409, 2011.

MELO, C. M.; LIMA, A. L.; BELTRÃO, E. I.; CAVALCANTI, C. C.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MONTENEGRO, S. M.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta Trop.**, 118(2): 152-158, 2011.

OGDEN, S.; TELFER, N. Skin cancer. **Medicine** 37: 305-308, 2009.

OKADA, M.; ITOH, M.; HARAGUCHI, M.; OKAJIMA, T.; INOUE, M.; OISHI, H.; MATSUDA, Y.; IWAMOTO, T.; KAWANO, T.; FUKUMOTO, S. b-Series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. **J. Biol. Chem.** 277: 1633–1636, 2002.

PERACAULA, R.; TABARES, G.; LÓPEZ-FERRER, A.; BROSSMER, R.; DE BOLÓS, C.; DE LLORENS, R. Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. **Glycoconjugate Journal** 22, 135–144, 2005.

PICCO G, JULIEN S, BROCKHAUSEN I, *et al.* Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology* 20: 1241–1250, 2010.

PITEIRA, A. R. **Identificação e Caracterização da Atividade de Sialiltransferase na Superfície Celular de Células Dendríticas**. Dissertação de Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2009.

RAMAN, R.; RAGURAM, S.; VENKATARAMAN, G.; PAULSON, J.C.; SASISEKHARAN, R. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. **Nature Methods** 2: 817-824, 2005.

RATNER, D.; PEACOCKE, M.; ZHANG, H.; PING, X.L.; TSOU, H. C. UV specific p53 and PTCH Mutations in Sporadic Basal Cell Carcinoma of Sun-Exposed Skin. **J Am Acad Dermatol**. 44: 293-7, 2001.

RÊGO, J. B. M.; BELTRÃO, E. I. C. Avaliação do glicocódigo do carcinoma ductal invasivo mamário e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos.. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Impresso)*, v. 31: 626-626, 2009.

RICOTTI, C.; BOUZARI, N.; AGADI, A.; COCKERELL, C. J. Malignat skin Neoplasms. **Med Clin N Am**, 93: 1241–1264, 2009.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Bases Patológicas das Doenças**. 8º edição, Elsevier Editora. Rio de Janeiro. 1458p. 2010.

ROSCHEK, J. R. B.; FINK, R. C.; MCMICHAEL, M. D.; LI, D.; ALBERTE, R. S. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro, **Phytochemistry** 70(10): 1255-1261, 2009.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. *Dermatologia* 2º ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 1155p.

SANTOS, I.; MELLO, R. J. V.; SANTOS, I. B.; SANTOS, R. A. Quantitative study of Langerhans cells in basal cell carcinoma with higher or lower potential

of local aggressiveness. **Annals Brazilian of Dermatology**, 85(2): 165-71, 2010.

SENDA, M.; ITO, A.; TSUCHIDA, A.; HAGIWARA, T.; KANEDA, T.; NAKAMURA, Y.; KASAMA, K.; KISO, M.; YOSHIKAWA, K.; Yoko KATAGIRI, Y.; ONO, Y.; OGISO, M.; URANO, T.; FURUKAWA, K.; OSHIMA, S.; FURUKAWA, K. Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: downregulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. **Biochemistry Journal**, 402: 459–470, 2007.

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

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, 282 (5): 2753-2764, 2007.

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I.J.; BROEKAERT, W.F.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PEETERS, B.; PEUMANS, W.J. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(a2-6)Gal/GalNAc sequence. **Journal of Biological Chemistry**, 262: 1596-1601, 1987.

SOBRAL, A. P. V.; RÊGO, J. B. M.; CAVALCANTI, C. L. B.; CARVALHO JUNIOR, L. B. ; BELTRÃO, E. I. C. Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *Journal of Oral Science* 52: 49-54, 2010.

TANG, W.; MAFUNE, K. NAKATA, M.; KONISHI, T.; KOJIMA, N.; MIZUOCHI, T.; MAKUUCHI, M. Association of histochemical expression of Maakia amurensis leucoagglutinin-positive glycoconjugates with behavior of human gastric cancer. **Histopathology**, 42: 239-245, 2003.

TANG, W.; GUO, Q.; USUDA, M.; KOKUDO, N.; SEYAMA, Y.; MINAGAWA, M., SUGAWARA, Y.; NAKATA, M.; KOJIMA, N.; MAKUUCHI, M. Histochemical expression of sialoglycoconjugates in carcinoma of the papilla of Vater. **Hepatogastroenterology**, 52: 67- 71, 2005.

TANIGUCHI, N.; HONKE, K.; FUKUDA, M. Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes. **Springer**, 2002.

THOM, I.; SCHULT-KRONEFELD, O.; BURKHOLDER, I.; GOEM, M.; ANDRITZKY, B.; BLONSKI, K.; KUGLER, C.; EDLER, L.; BOKEMEYER, C.; SHUMACHER, U.; LAACK, E. (2007) Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **Lung Cancer**, 56: 391-397, 2007.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. (1998) Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plant Sciences**. 17(6): 575-692, 1998.

VAN DAMME, E.J. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. **Methods Molecular Biology**. 753: 289-297, 2011.

VAN DEN BUSSCHE, F.; DESMYTER, S.; CIANI, M.; PROOST, P.; PEUMANS, W. J.; AND VAN DAMME, E. J. M. Analysis of the in planta antiviral activity of elderberry ribosome-inactivating proteins. **European Journal of Biochemistry**, 271: 1508-1515, 2004.

WANG, W.C. & CUMMINGS, R. D. The Immobilized Leukoagglutinin from the Seeds of *Maackia amurensis* Binds with High Affinity to Complex-type Asn-linked Oligosaccharides Containing Terminal Sialic Acid-linked α -2,3 to Penultimate Galactose Residues. **Anal. Biochem.**, 161: 80-84, 1987.

WANG, P. H. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. **Journal of Cancer Molecules** 1(2): 73-81, 2005.

WANG, F. L.; CUI, S. X.; SUN, L. P.; QU, X. J.; XIE, Y. Y.; ZHOU, L.; MU, Y. L.; TANG, W.; WANG, Y. S. High expression of alpha 2,3 –linked siálico acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. **Cancer Detect Prev.**, 32: 437-443, 2009.

WEIJERS, C.A.; FRANSSEN, M.C.; VISSER, G.M. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. **Biotechnology Advances**, 26: 436-456, 2008.

WENG, J.; SONG, X.; LI, L.; QIAN, H.; CHEN, K.; XU, X.; CAO, C.; REN, J. Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. **Talanta**, 70(2): 397-402, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Cancer Control Programme. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acessado em Agosto de 2010.

YAMAMOTOA, K.; ITOC, S.; YASUKAWAC, F.; KONAMIA, Y.; MATSUMOTOA, N. Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. **Analytical Biochemistry**, 336: 28-38, 2005.

YAMASHITA, T., HASHIRAMOTO, A., HALUZIK, M., MIZUKAMI, H., BECK, S., NORTON, A., KONO, M., TSUJI, S., DANIOTTI, J. L., WERTH, N. Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 100(6): 3445–3449, 2003.

YUSPA, S. H.; AND DLUGOSZ, A. A. A carcinogênese cutânea: natural e experimental. In: (L. ed.). Goldsmith, **Fisiologia Bioquímica e Biologia Molecular da Pele**, Oxford University Press, New York, pp 1365-1402, 1991.

ZANETTI, G. D. **Lectina dos Rizomas de *Arundo Donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas**. Tese de doutorado em Botânica, apresentado à Universidade federal do Rio Grande do Sul. 262p., 2007.

6. ARTIGOS CIENTÍFICOS

6.1 Artigo1

Differential Expression of Sialic Acid in Skin Biopsies of Non-Melanoma Skin Tumors.

Steffany de Almeida Ferreira¹, Juliana Lúcia Vasconcelos¹, Carmelita Lima Bezerra¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2}.

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Diagnostic Pathology.

Fator de impacto:1,39

Abstract

Background: Skin cancer is the most common cancer worldwide. The diagnosis of skin neoplasias becomes inaccurate, in some cases, due to variety of factors that affect the accuracy of the test, such as huge spectrum of tumors and their variants with low differentiation. Altered sialylation has been observed during oncogenic transformation. Sialylated oligosaccharides of cell surface glycoproteins and glycolipids have been implicated in tumor progression and metastases. This study investigates the changes in expression and distribution of α 2,3-linked sialic acid and α 2,6-linked sialic acid in non-melanoma skin cancer. **Methods:** Lectin histochemistry was used to examine the expression and distribution of sialic acid in different types of non-melanoma skin tumors. We used *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), which recognizes α 2,3-linked sialic acid and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) specific for α 2,6-linked sialic acid. **Results:** The histochemical analysis showed that α 2,3-linked sialic acid and α 2,6-linked sialic acid were differentially expression according to the tumor type analyzed. The distribution of sialic acid was higher in Squamous carcinoma cell, Actinic keratosis and Keratoacanthoma than Basal carcinoma cell for both types of linked sialic acid. **Conclusions:** Results showed that the change in sialylation occurs according to the sort of developing cancer and may play an important role in tumor behavior. Such results support the importance of lectin as glycoprobes for the detection of changes in saccharide phenotype of skin tumors being useful for the development of diagnostic techniques for non-melanoma skin tumors using lectins in histochemistry as an auxiliary tool.

Keywords: non-melanoma skin tumor, lectins, histochemistry

Background

Skin cancer is the most common cancer worldwide and can be categorized into 2 major groups: melanoma and non-melanoma skin cancers [1]. The latter group consists primarily of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas. These tumors are rarely fatal, but are considered to be fast growing tumors that if neglected may be locally and functionally destructive [2]. The diagnosis of skin neoplasias becomes inaccurate, in some cases, due to variety of factors that affect the accuracy of the test, such as huge spectrum of tumors and their variants with lower differentiation [3].

Currently, it can be difficult to distinguish well differentiated squamous cell carcinoma of the skin and keratoacanthoma in the proliferative stage because of the histological resemblance of these tumors [4]. Herein, many investigators are struggling to adequately validate more objective methods to differentiate these two lesions, as well as to understand their pathogenesis [5]. The genetic alterations in the non-melanoma skin cancer development are only partly understood. Much interest lies in determining the genetic basis of non-melanoma skin cancers, to explain their distinctive phenotypes, including those alterations in cell surface glycans, biological behaviors and metastatic potential [6].

It is well known that tumorigenesis and metastasis are frequently associated with altered structure and expression of oligosaccharides on cell surface glycoproteins and glycolipids [7]. Sialylated glycoconjugates expression has been shown to change during development, differentiation, and disease and oncogenic transformation [8]. A general increase in sialylation of cell surface glycoconjugates of carcinoma cells has been detected [9]. These changes in sialylation are related to invasion and metastasis [10, 11].

Sialic acids are widely distributed in nature as terminal sugars of oligosaccharides attached to proteins or lipids. Sialic acids are linked to galactose via α 2,3 or α 2,6-linkage or linked via α 2,6-linkage to galactosamine or N-acetylgalactosamine. More over sialic acids may be linked to the C8 position of another sialic acid residue [8, 12]. On vertebrate cell surfaces sialic acids

mediate many biological roles [13]. Altered expression of certain sialic acid types or their linkages can have prognostic significance in human cancers [14].

In the present study we used lectin histochemistry in order to evaluate the level of expression and the distribution of α 2,3 and α 2,6 sialic acid in non-melanoma skin cancer in order to determine the changes in sialylation at benign and malignant tumors.

Materials and methods

Reagents

Biotinylated *Sambucus nigra* agglutinin (SNA specific for NeuAc- α 2,6Gal-GalNAc) and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, specific for NeuA- α 2,3Gal) were purchased from Vector Laboratory (Burlingame, CA, USA) and used at concentrations of 20 μ g/mL and 40 μ g/mL, respectively. Signal amplification was developed with biotin-streptavidin system kit and 3,3'-diaminebenzidine (DAKO, USA).

Tissues

A retrospective study was carried out using fixed and paraffin embedded tissue biopsies from the Tissue Bank of the Anatomy and Pathology Service at University Hospital of the Federal University of Pernambuco (UFPE). Biopsies were diagnosed as basal cell carcinoma (BCC = 29), squamous cell carcinoma (SCC = 22), actinic keratosis (AK = 15) and Keratoacanthoma (KA = 9). Samples of normal skin were obtained from the Santa Clara Hospital at Recife, Northeast Brazil. Strict clinical and histological criteria were used to differentiate between BCC, SCC, AK and KA.

Lectin Histochemistry

Paraffin sections (5 μ m) were cut and placed on albumin treated glass slides. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols (3 x 100% and 1 x 70% - 10 dips each). Slices were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for two minutes. Sections were washed (twice, five minutes

each time) with PBS. Afterwards tissue slices were incubated in 0.3% methanol- H_2O_2 solution for 15 min. Sections were incubated with biotin-conjugated lectins SNA (20 $\mu\text{g/mL}$) and MAA (40 $\mu\text{g/mL}$) for 2 h at 4°C, followed by washings (2 x 5 min) with PBS. After this, sections were incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin for 45 min at 25°C. Reaction was visualized using 0.01% 3,3-diaminobenzidine (DAB) solution. Negative controls were performed in samples processed without lectin incubation. Lectin stainings were analyzed in an Eclipse 50i optic microscope (Nikon, USA). Staining intensity of carbohydrate-lectin interaction was semiquantitatively classified into four groups on the basis of the intensity of positive cells in according protocol of Dornelas [15]: (0) negative staining; (1+) low staining for up to 1/3 of cells stained; (2+) moderate staining for up to 2/3 of cells stained and (3+) intense staining for more than 2/3 of cells stained. Three different areas (1 cm^2) per tissue were analyzed (magnification 100x).

Statistical analysis

GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Data were compared using Chi-square test ($p < 0,05$).

Results

In the present study we analyzed a total of 75 biopsies of non-melanoma skin and 11 biopsies of normal skin.

Sialic Acid Expression

In order to determine the change in expression of α 2,3 and α 2,6 linkage sialic acid related to neoplastic transformation of non-melanoma skin cancer, we performed lectin histochemistry assays with MAA and SNA.

α 2,3 Sialic Acid Expression

The higher expression of α 2,3 sialic acid was detected in the basal layer in many biopsies analyzed including in normal skin. Only three (10.34%) biopsies of BCC showed an expression of α 2,3 sialic acid.

In SCC samples were observed a variable expression of α 2,3 sialic acid. They showed moderate and intense expression in the basal layer. Seven (31,82 %) samples was negative for MAA (Table 1). Sialic acid expression in α 2,3 linkage was detected in eight (88,88 %) samples of AK analyzed with a variable intensity of expression in the tumor cells and basal cells (table 1). The most of samples of KA showed medium and high expression of α 2,3 sialic acid both tumor cells and basal cells. Only one (11,12 %) sample was negative (Table 1).

Table 1. Expression intensity of α 2,3 sialic acid using MAA in samples of non-melanoma skin tumors

NMST	Expression Intensity of α 2,3 sialic acid (%)				Mean	SD
	1+	2+	3+	0		
BCC	3 (10.34)	0	0	26 (89.66)	0.1034	0.3099
SCC	3 (13.63)	7 (31.82)	5 (22.73)	7 (31.82)	1.4550	1.1840
AK	4 (26.67)	3 (20)	1 (6.67)	7 (46.66)	0.8667	0.9904
KA	3 (33.33)	3 (33.33)	2 (22.22)	1 (11.12)	1.6670	1.0000

NMSTs: non-melanoma skin tumors, BCC: basal cell carcinoma, SCC: squamous cell carcinoma, AK: Actinic Keratosis, KA: Keratoacanthoma, SD: Standard deviation.

All samples showed a membrane and perinuclear staining pattern for MAA being this pattern more frequently observed in SCC and AK ($p < 0,0001$) (Figure 1).

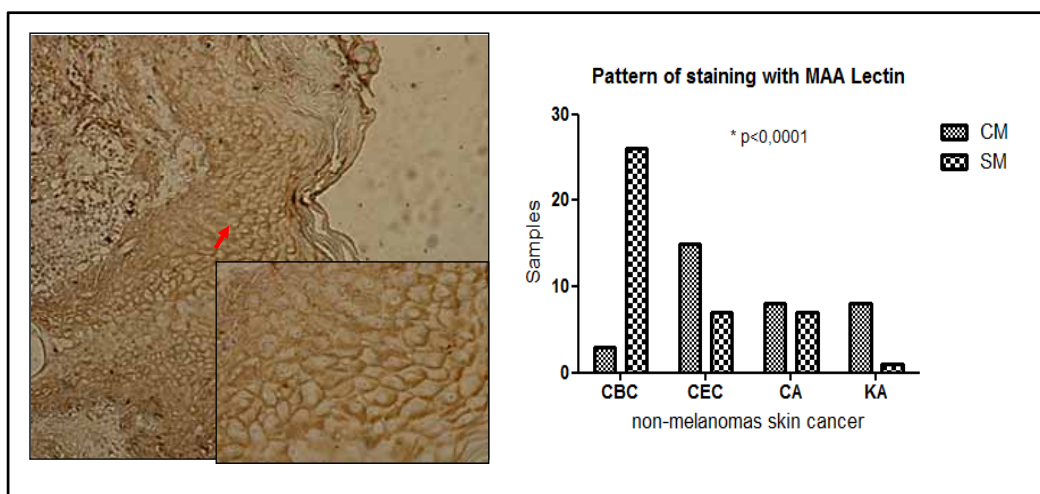


Figure 1: Staining with lectin MAA. Actinic keratosis showed high expression (2+) of $\alpha 2,3$ sialic acid (Magnification 100x). In detail (indicated with arrow red), staining in cell membrane and perinuclear (Magnification 400x).

$\alpha 2,6$ Sialic Acid Expression

The $\alpha 2,6$ Sialic acid was detected in basal layer in normal samples. Only five (17.24%) biopsies of BCC showed any expression of $\alpha 2,6$ sialic acid.

In SCC samples were observed a variable expression of $\alpha 2,6$ sialic acid. They showed low and moderate expression in the basal layer. Five (22.72%) samples were negative for SNA (Table 2). $\alpha 2,6$ linked sialic acid expression was detected in twelve (80%) samples of AK with a variable expression in tumor and basal cells (Table 2). Most samples of KA showed moderate and intense expression of $\alpha 2,6$ -linked sialic acids in both tumor and basal cells while four (44.45%) samples of KA were negative (Table 2).

Table 2. Expression of α 2,6 Sialic acid staining with SNA and distribution in samples with non-melanoma skin cancer

NMST	Expression Intensity of α 2,6 sialic acid (%)				Mean	SD
	1+	2+	3+	0		
BCC	5 (17,24)	0	0	24 (82,76)	0,1724	0,3844
SCC	7 (31,82)	8 (36,36)	2 (9,09)	5 (22,73)	1,318	0,9455
AK	9 (60)	2 (13,33)	1 (6,67)	3 (20)	1,067	0,7988
KA	2 (22,22)	3 (33,33)	0	4 (44,45)	0,8889	0,9280

NMTS: non-melanoma skin tumors, BCC: basal cell carcinoma, SCC: squamous cell carcinoma, AK: Actinic Keratosis, KA: Keratoacanthoma, SD: Standard deviation.

For SNA all samples showed a scattered cytoplasmic staining pattern (Figure 2) with a significant level of expression of α 2,6 sialic acid among evaluated tumor types analyzed ($p < 0,0001$).

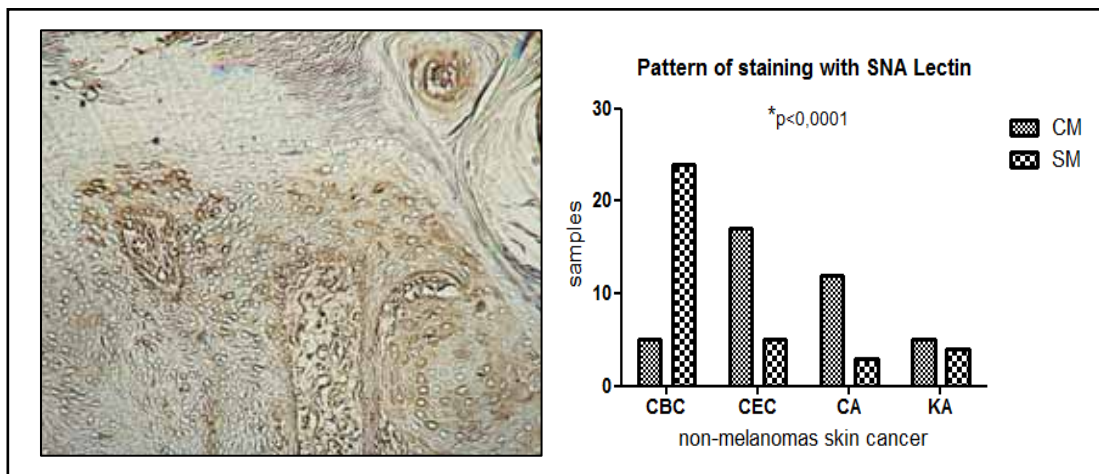


Figure 2. Staining with lectin SNA. Squamous cell carcinoma showed middle expression (2+) of α 2,6 sialic acid. (Magnification 100x).

Discussion

The increase in level and/or expression of carbohydrates in tumors cells has been widely observed via lectin histochemistry [16, 17]. Glycoconjugates on the cell surface play important roles in the regulation of cell proliferation, cell adhesion, metastasis, tissue differentiation and apoptosis [8, 18].

Studies showed that cutaneous carcinogenesis is associated with an altered pattern of glycosylation. Previous studies employing lectins in benign and malignant tumors of the skin, demonstrated the absence and/or inaccessibility of carbohydrate residues in normal tissue and/or the presence of these carbohydrates antigens, such as the T antigen of Thomsen-Friedenreich [3,19].

Sialic acids is found in cellular secretions and on the outer surface of cells, mostly as terminal components of glycoproteins and glycolipids (gangliosides) [19]. It has been recognized that this sugar may somehow modulate the adhesion of cancer cells via extracellular matrix components. The way this modulation occurs is still controversial [7, 19].

In particular, sialylation of sugar chains has been suggested to occur during development, cancer evolution, and progression, and sialic acid is often responsible for tumor-associated antigenicity [20]. The change in sialic acid expression in premalignant lesions has been scarcely studied. Roy and Chakraborty [21] reported a slight elevation in its expression in benign lesions, moderate elevation in severe dysplasia and preinvasive carcinoma and higher elevation in invasive carcinoma of the cervix. The present study describes the change of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acid expression in non-melanoma skin tumors classified as pre-malignant and malignant.

The lectin histochemistry showed a differential expression of sialic acid in cell surface detected in both types of these linked sugars among malign tumors and pre-malign and among malign tumors (BCC and SCC). This ability of lectins to bind selectively to carbohydrate moiety in glycoproteins makes these proteins as differentiating probes to study cancers and metastatic cell lines [22].

In squamous cell carcinomas the poorly differentiated tumour cells are characterized by α 2,6-linked sialic acid expression and the differentiated squamous cell carcinoma cells are positive for α 2,3-linked sialic acid. Similar results were obtained by Wang and coworkers in squamous cell carcinoma of uterine cervix and cell lines derived from aggressive types of this tumour [9, 23]. Previous studies have shown that carcinogenesis, invasion and metastasis are related to aberrant expression of terminal sialic acids, and in particular α 2,3-linked sialic acids [24]. Expression of α 2, 3-linked sialic acid residues in N-cadherin was altered in metastatic melanomas cell lines [25]. Wang [11] measured the levels of α 2,3-linked sialic acid residues using MAA in human gastric cancer and the results demonstrated that high levels of α 2,3-linked sialic acid residues were closely associated with invasive depth in tumor tissue and lymph node metastasis. In contrast, in the present work we observed a higher expression of α 2,6-linked sialic acid in SCC. The role of 2,6 sialylation in tumor progression has also been often associated to effects on tumor cell migration and invasion, however it is emerging that ST6Gal-I may be a major regulator of tumor cell survival [26].

Moreover, the level expression of sialic acid for SCC and AK was similar being positive for one lectin or both. This profile can be involved in the correlation between these two types of tumors. Most studies indicate that AK represents an early stage in a biologic continuum that ranges from carcinoma *in situ* to invasive SCC [15, 27]. But there are opposing results whether keratoacanthoma (KA) is a variant of squamous cell carcinoma (SCC) or a unique lesion [28]. However, this work showed that significant difference between the glycophenotype these tumors. KA presented low expression of α 2,6-linked sialic acid (recognized for SNA) and high expression of α 2,3-linked sialic acid (recognized for MAA). These features is important to the regulation of the immune response once selectins require ligands possessing α 2,3-linked sialic acids for proper recognition [29]. This could explain the spontaneous regression of KA due to an immune response developed. Moreover, the difference in the sialic acid expression level of this type of tumor with squamous cell carcinoma indicates that different mechanisms are involved in its

pathogenesis despite the similarities found in some studies [27]. Batinac *et al.* [30] demonstrated a significant increase of T cells in keratoacanthoma in comparison to squamous cell carcinomas, suggesting a possible role of this cellular type in keratoacanthoma regression. It is well established that murine T-lymphocyte activation is accompanied by major changes in cell-surface sialylation, potentially influencing interactions with sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (siglecs) [31].

Some studies reported that the glycol-profile of the basal cell carcinoma is very similar to cells of the basal layer of epidermis and they express α 2,6-linked sialic acid and no α 2,3-linked sialic acid [23]. Similar results were obtained in our studies. Although most cases has shown negative results, for both MAA and SNA, indicating this tumor type can present a low sialylation pattern or sialic acids may be “masked” by others sugar no-recognized by used lectins. In fact, BCC exhibit a relatively simple genotype, with only few aberrations and a high degree of independence of the immune system [27] that may be resulting of low sialylation. This glycophenotype enables a better understanding of the molecular events involved in the development/expression of BCC.

Our results showed the high expression of α 2,6- linked sialic acid in basal layer in all tumors studies include in normal skin. This sugar plays an important role in cell growth and differentiation and SNA reaction products is primarily observed in the basal and suprabasal layers of the stratified epithelia [32].

The increased sialylation, detected by alteration in expression of sialic acids, may play an important role in cellular interactions, changing the structure of the epithelium and losing definition of the different layers. The change in sialic acid expression has been correlated to a change in the expression of sialyltransferases genes [8, 19]. The results obtained in the presence study may be as a result of increased and/or decreased expression of certain sialyltransferases genes. In fact, during neoplastic transformation, the expression of genes sialiltransferases can be changed and as a consequence,

cancer cells express a higher phenotype of sialylated glycans on their cell surface glycoconjugates [33]. Our results in light the final pathway of the gene information, the glycophenotype, resulting from altered expression of these enzymes (genotype) in these tumors.

Conclusion

Neoplastic transformation in non-melanoma skin tumors was accompanied by differential expression of α 2,6- and α 2,3-linked sialic acids observed via lectin histochemistry. Our results showed that the change in sialylation occurs among skin cancer types indicating that can be involved in the behavior of tumor. The results confirm the importance of lectin as potential probes for the detection of changes in carbohydrate phenotype of tumors skin being useful for the development of diagnostic techniques for non-melanoma skin tumors using lectin histochemistry as an auxiliary tool.

Acknowledgment

Authors thank Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) Agencies for financial support.

References

1. Ogden S, Telfer N: **Skin cancer**. *Medicine* 2009, **37**: 305-308.
2. Ricotti C, Bouzari N, Agadi A, Cockerell CJ: **Malignat skin Neoplasms**. *Med Clin N Am* 2009, **93**: 1241–1264.
3. Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Patu VJRM, Machado MCFP, Beltrão EIC, Carvalho Jr. LB: **Análise digital de imagens de neoplasias da pele avaliadas pela histoquímica com lectinas: marcador potencial para alterações bioquímicas e diagnóstico diferencial de tumores**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006, **42**: 455-460.

4. Sampaio SAP, Rivitti E: **Dermatologia** 2º ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. 1155p.
5. Ribeiro D, Narikawab S, Marques MAEA: **Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin.** *Pathology – Research and Practice* 2008, **204**: 97–104.
6. Martinez MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz IRG, Neto CF: **Genética Molecular Aplicada ao Câncer Cutâneo Não Melanoma.** *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2006, **81**: 405-419.
7. Dall'olio F, Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S: **Phenotypic changes induced by expression of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase (ST6Gal.I) in the human colon cancer cell line SW948.** *Glycobiology* 2006, **16**: 146-154.
8. 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* 2010, **5**:74-78.
9. Wang PH, Lee WL, Lee YR, Juang, CM, Chen YJ: **Enhanced expression of alpha 2,6-sialyltransferase ST6Gal I in cervical squamous cell carcinoma.** *Gynecol Oncol* 2003, **89**: 395–401.
10. Inagaki Y, Tang W, Guo Q, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H: **Sialoglycoconjugate expression in primary colorectal cancer and metastatic lymph node tissues.** *Hepatogastroenterology* 2007, **54**:53–57.
11. Wang FL, Cui SX, Sun LP, Qu XJ, Xie YY, Zhou L, Mu YL, Tang W, Wang YS: **High expression of alpha 2,3 –linked siálico acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer.** *Cancer Detect Prev* 2009, **32**: 437-443.
12. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P: **The human sialyltransferase family.** *Biochimie* 2001, **83**: 727–737.
13. Huang S, Day TW, Choi, MR, Safa, AR: **Human b-galactoside a-2,3-sialyltransferase (ST3Gal III) attenuated Taxol-induced apoptosis in ovarian cancer cells by downregulating caspase-8 activity.** *Mol Cell Biochem* 2009, **331**: 81–88.

14. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME: **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008.
15. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Ferreira AP, Gollner AM: **Expressão de Marcadores de Proliferação Celular e Apoptose no Carcinoma Espinocelular de Pele e Ceratose Actínica**. *Anais Bras Dermatol* 2009, **84**: 469-475.
16. Melo-Júnior MR, Lima-Neto RG, Lacerda AM, Beltrão EI: **Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis**. *Mycopathologia* 2011, **171**: 403-409.
17. Melo CM, Lima AL, Beltrão EI, Cavalcanti CC, Melo-Júnior MR, Montenegro SM, Coelho LC, Correia MT, Carneiro-Leão AM: **Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni**. *Acta Trop* 2011, **118**: 152-158.
18. Wang PH: **Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases**. *Journal of Cancer Molecules* 2005, **1**: 73-81.
19. Schauer R: **Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions**. *Current Opinion in Structural Biology* 2009, **19**: 1-8.
20. Hakomori S: **Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle**. *Proc Natl Acad Sci* 2002, **99**: 10231-10233.
21. Roy A, Chakraborty S: **Detection cancer cervix by estimation of sialic acid**. *J Indian Med Assoc* 2005, **103**: 589-590.
22. Arab MR, Salari S, Karimi M, Mofidpour H: **Lectin Histochemical Study of Cell Surface Glycoconjugate in Gastric Carcinoma Using Helix Pomatia Agglutinin**. *Acta Medica Iranica* 2010, **48**: 209-213.
23. Smetana KJ, Plzac J, Dvoronkov B, Holčkovi Z: **Functional Consequences of the Glycophenotype of Squamous Epithelia - Practical Employment**. *Folia Biologica (Praha)* 2003, **49**: 118-127.
24. Chen S, Fukuda M: **Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis**. *Methods Enzymol* 2006, **416**: 371-80.

25. Ciolczyk-Wierzbicka D, Gil D, Hoja-Lukowicz D, Litynska A, Laidler P: **Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cell lines.** *Acta Biochim Pol* 2002, **49**: 991–9.
26. Swindall AF, Bellis SL: **Sialylation of the Fas Death Receptor by ST6Gal-I Provides Protection against Fas-mediated Apoptosis in Colon Carcinoma Cells.** *The Journal Of Biological Chemistry* 2011, **286**: 22982–22990.
27. Patel RV, Frankel A, Goldenberg G: **An Update on Nonmelanoma Skin Cancer.** *J Clinical Aesthetic Dermatology* 2011, **4**: 20-27.
28. Batinac T, Zamolo G, Coklo M, Hadzisejdic I: **Possible key role of granzyme B in keratoacanthoma regression.** *Med Hypotheses* 2006, **66**: 1129-1132.
29. Spieth K, Gille J, Kaufmann R: **Intralesional methotrexate as effective treatment in solitary giant keratoacanthoma of the lower lip.** *Dermatology* 2000, **200**: 317-319.
30. Batinac T, Zamolo G, Hadzisejdic I, Zauhar G: **A comparative study of granzyme B expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma.** *J Dermatol Sci.* 2006, **44**:109-12.
31. Redelinghuys P, Antonopoulos A, Liu Y, Campanero-Rhodes MA, McKenzie E, Haslam SM, Dell A, Feizi T, Crocker PR: **Early Murine T-lymphocyte Activation Is Accompanied by a Switch from N-Glycolyl- to N-Acetyl-neuraminic Acid and Generation of Ligands for Siglec-E.** *J Biol Chem.* 2011 **286**: 34522–34532.
32. Kaneko Y, Yamamoto H, Colley KJ, Moskal JR: **Expression of Gal β 1,4GlcNAc α 2,6Galyltransferase and α 2,6linked Sialoglycoconjugates in Normal Human and Rat Tissues.** *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1995, **43**: 945-9549.
33. Jun L, Wang Y, Yanying X, Zhongfa X, Jian Y, Fengling W, Xianjun Q, Kokudo N, Wei T, Weixia Z: **Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues.** *Med Oncol* 2010, **8**: 23-26.

6.2 Artigo 2

Expression Patterns of α 2,3-Sialyltransferases and α 2,3-Sialyltransferases in cutaneous epithelial lesions and correlation with features (glyco)phenotypics.

Steffany de Almeida Ferreira¹, Juliana Lúcia Vasconcelos¹, Carmelita Lima Bezerra¹, Renato César Wanderley Cunha Silva¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2}.

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Modern Pathology

Fator de impacto: 4.176

ABSTRACT

Skin tumors have become one of the most common cancers in many countries. Studies indicate that skin carcinogenesis is associated with altered glycosylation patterns. The aberrant sialylation, a type of glycosylation, can mediate pathophysiological key events during various stages of tumor progression, including invasion and metastasis. Sialyltransferases play a role in a variety of biological processes, including cell–cell communication, cell–matrix interaction, adhesion, and protein targeting. In this study, we evaluate expression of ST3Gal I and ST6Gal I in cutaneous epithelial lesions that include actinic keratosis (n=15), keratoacanthoma (n=9), squamous cell carcinoma (n=22) and basal cell carcinoma (n=28) regarding the expression of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids, in order to evaluate the role of sialyltransferases expression in the grading and development of premalignant and malignant tumors. The expression of ST3Gal I was observed in actinic keratosis (53%), keratoacanthoma (78%), squamous cell carcinoma (73%) and basal cell carcinoma (32%) with statistically significant differences observed between basal cell carcinoma and keratoacanthoma and squamous cell carcinoma ($p < 0.05$); for ST6Gal I, cytoplasmic expression was found in actinic keratosis (40%), heterogeneous cytoplasmic expression was observed in keratoacanthoma (67%), squamous cell carcinoma (41%) and basal cell carcinoma (7%) with statistically significant differences between groups ($p < 0,05$). Results showed that the expression of ST3Gal I and ST6Gal I, related to the expression of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids, respectively, appears to be involved in the development and maintenance of skin tumors with greater potential for invasion and metastasis as in the case of Squamous carcinoma cell. These glycophenotypic patterns resulting from the specific action of these enzymes may be useful in the differential diagnosis between malignant and premalignant as well as in the understanding the biology of cancer in different tumors studied.

Keywords: ST3Gal I; ST6Gal I; actinic keratosis; keratoacanthoma; squamous cell carcinoma; basal cell carcinoma

Introduction

Skin tumors have become one of the most common cancers in many countries, with rapid increasing incidence during the last half century (1). The cutaneous epithelial lesion, too called non-melanoma skin cancer (NMSC), are the most common cancers in the Caucasian population and include actinic keratosis (AK), keratoacanthoma (KA), squamous cell carcinoma (SCC) and basal cell carcinoma (BCC). NMSC presents a low metastatic potential; however, the tumor can cause substantial local damage if not treated early (2) and is mainly caused by chronic exposure of ultraviolet light B (UVB) radiation (3).

Molecular, genetic and biochemical changes occur in the development of skin malignancies but they are only partially understood leading to the interest in understanding and determining the genetic basis of NMSC to explain their phenotypes, biological behaviors and different metastatic potential (4). The phenotypic alterations in cell surface glycans provide malignant features to cells (5). It is well known that glycans on a cell surface or in extracellular space play important roles in cellular differentiation, adhesion and proliferation (6) and that tumors aberrantly express glycans (7). Glycosylation is determined by the expression and relative activities of glycosyltransferases in particular tissues (8-11). Most of the changes in glycosylation pattern that occurs during oncogenesis is associated with increased sialylation of glycoconjugates in the end-forming sialylconjugates (12). The biosynthesis and metabolism of sialylconjugates are controlled by a large number of enzymes, including sialidase, esterases, lyases and sialyltransferases where the later assumes a fundamental role at the end of the biosynthesis of all sialylated structures (13).

Abnormally elevated levels of sialylated tumor associated carbohydrate antigens are frequently described at the surface of cancer cells and/or secreted in biological fluids. It is now well established that this over-expression may

result from deregulation in sialyltransferases activity involved in their biosynthesis but the precise molecular mechanisms remain unknown (14). The sialylation is one of the critical mechanisms for the regulation of various biological processes. In fact, inhibition of sialyltransferases (15) or gene targeting of sialyltransferases such as ST6Gal-I (16), revealed that sialylation of glycoproteins or glycosphingolipids is very important in tumour development, neuronal development, nerve repair, immunological processes and regulation of hormone sensitivity (17). Sialic acids are one of the most important monosaccharides being expressed as terminal sugars with a shared nine-carbon backbone in several classes of cell surface and secreted glycan molecules (18). In addition to providing negative charge and hydrophicity to vertebrate cell surfaces, to masking subterminal galactose residues from recognition by certain receptors, and to acting as receptors for pathogens and toxins, sialic acids play an important role during development, including early embryonic development in mice (19).

The study of changes in the structure of oligosaccharide in surface cell, promoted by sialyltransferases, has been frequently associated to human cancer and are important because: (1) they may be related to a precise stage of the disease and its detection with lectins or monoclonal antibodies may provide useful information for diagnosis or prognosis, or both, and (2) in many cases, they directly contribute to cancer biology. However, there are few studies that are dedicated to the study of expression of these enzymes associated with altered patterns of sialylation (glycophenotype) in epithelial lesions.

To better understand the role of sialyltransferases in cutaneous epithelial tumors, this study was undertaken to determine whether ST3Gal I and ST6Gal I is expressed in premalignant (actinic keratosis, AK, and keratoacanthoma, KA) and malignant skin lesions (squamous cell carcinomas, SCC, and basal cell carcinomas, BCC) and their correlation with tumor behaviour.

Materials and methods

Samples

Paraffin-embedded tumor biopsies (actinic keratosis – AK n=15, keratoacanthoma – KA n=9, squamous cell carcinoma - SCC n= 22 and basal cell carcinoma – BCC n=28) were obtained in the Tissue Bank of the Clinic Hospital at the Federal University of the State of Pernambuco – UFPE, Northeast Brazil. Normal skin was obtained from Hospital Santa Clara Recife, Northeast Brazil. The diagnosis of skin cancer was based on histopathology with hematoxylin and eosin (H&E). The histologic sections of all cases were re-reviewed and the diagnoses confirmed by an independent dermatopathologist.

Immunohistochemistry

Tissue slices (4µm) were deparaffinized with two xylene exchanges for 60 min at 60°C and 20 min at 25°C followed by rehydration with decreasing concentration of ethanol (100%, 95%, 85% and 70%). Samples were treated with a 10% ammonium hydroxide solution for 10 min prior to antigen retrieval that was performed with a citrate buffer (pH 6.0) in STEYMER for 30 min. Endogenous peroxidase was blocked with 1:1 hydrogen peroxide in methanol for 30 min at 25°C. Slices were incubated with rabbit polyclonal antibody anti-ST3Gal I (1:200, Sigma-Aldrich, USA) and mouse monoclonal antibody anti-ST6Gal I (1:200, Sigma-Aldrich, USA) overnight at 4°C. After washing with 100mM sodium phosphate buffer pH 7.2, supplemented with 150mM NaCl (PBS) sections were incubated with secondary antibody (ADVANCE TM HRP LINK – DAKO, USA) for 45 min, followed by the tertiary antibody (ADVANCE TM HRP ENZYME – DAKO, USA) for 45 min both at 25°C. 3,3'-Diaminobenzidine (DAKO, USA) was used as the final chromogen, and hematoxylin was used for counter-staining. All washes between the steps were performed with PBS. Reaction control was developed without the primary antibodies (anti-ST3Gal I e anti-ST6Gal I).

Image analysis and quantification

Tissue images were acquired using a video camera system coupled to an Eclipse 50i microscope (Nikon, USA). Random areas were analyzed (μm^2) taking into account the number of stained cells per area. Quantitative analysis of stained cells was measured using the automatic system (three areas in each case). Staining intensity was according Dornelas (20) as: (0) negative staining; (1+) low staining for up to 1/3 of cells stained; (2+) moderate staining for up to 2/3 of cells stained and (3+) intense staining for more than 2/3 of cells stained. Three different areas (1cm^2) per tissue were analyzed (magnification 100x).

Statistical Analysis

The statistical association of expression of ST3Gal I and ST6Gal I were analyzed using the Chi-square test or Fisher's Exact test (GraphPad Software, USA) to determine whether there were differences of significance in expression of the different sialyltransferases amongst the categories studied. A two-tailed P value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

ST3 Gal I

The immunoreactivity was observed in in a basilar pattern, defined by staining of the basal cell layer of AK, KA, SCC, BCC and normal skin. AK presented a diffuse cytoplasmic staining, while KA presented diffuse cytoplasmic and membrane staining. In SCC was observed diffuse cytoplasmic and membrane staining and in most cases of BCC was negative staining with rare nuclear and perinuclear staining (Figure 1).

In cases of AK, positive immunoreactivity to ST3Gal I was observed in 8/15 (53%) (4 cases: 1+, 3 cases: 2+ and 1 case: 3+), while in 7/15 cases (47%) ST3Gal I the expression was negative. For KA 7/9 cases (78%) showed immunopositivity to ST3Gal I (2 cases: 1+, 4 cases: 2+ and 1 case: 3+), while in

2/9 cases (22%) the expression was negative. For SCC positive immunoreactivity to ST3Gal I was observed in 16/22 cases (73%) (7 cases: 1+, 4 cases: 2+ and 5 cases: 3+) being negative for the other 6/22 cases (27%). In BCC cases immunopositivity to ST3Gal I was observed in 9/28 (32%) (3 cases: 1+, 5 cases: 2+ and 1 case: 3+) while in 19/28 cases (68%) ST3Gal I expression was negative.

Significant differences in expression of ST3Gal I were noted between KA and BCC ($p=0.0239$) and between SCC and BCC ($p=0.0096$). Significant differences in the expression of ST3Gal I between all cutaneous epithelial lesions was also observed ($p=0.0130$) (Table 1).

ST6Gal I

Immunopositivity was patchy and predominantly diffuse in cytoplasm in most of the samples of squamous cell carcinoma, keratoacanthoma and actinic keratosis and absent or nuclear and/or perinuclear in basal cell carcinoma (Figure 1).

In cases of AK, immunopositivity to ST6Gal I was observed in 6/15 (40%) (2 cases: 1+, 3 cases: 2+ and 1 case: 3+), while in 9/15 cases (60%) ST6Gal I expression was negative. For KA 6/9 cases (67%) showed positive immunoreactivity to ST6Gal I (2 cases: 1+, 2 cases: 2+ and 2 cases: 3+), while in 3/9 cases (33%) the expression was negative. SCC samples were positive to anti-ST6Gal I in 9/22 cases (41%) (2 cases: 1+, 2 cases: 2+ and 5 cases: 3+), while in 13/22 cases (59%) ST6Gal I expression was negative. BCC samples were characterized by positivity to anti-ST6Gal I in 2/28 (7%) (2 cases: 1+) while in 26/28 cases (93%) ST6Gal I expression was negative (Table 1).

Significant differences in expression of ST6Gal I were observed between Ak and BCC ($p=0.143$), KA and BCC ($p=0.0008$) and between SCC and BCC ($p=0.0096$). Differences between the groups was also significant ($p=0.0025$) (Table 1). Statistic significant differences between the expression of ST3Gal I and ST6Gal for all cutaneous epithelial lesions was observed ($p=0.0028$).

Table 1. ST3Gal I and ST6 Gal I immunoexpression in cutaneous epithelial lesions

	ST3Gal I (%)					ST6Gal I (%)				
	(1+)	(2+)	(3+)	0	P**	(1+)	(2+)	(3+)	0	P**
Actinic keratosis	26	20	7	47		13*	20*	7*	60	
Keratoacanthoma	22*	45*	11*	22		22*	22*	22*	33	
Squamous cell carcinoma	32*	18*	23*	27	0,0130	9*	9*	23*	59	0,0025
Basal cell carcinoma	11*	18*	3*	68		7*	0	0	93	

* Fisher's exact test (keratoacanthoma vs basal cell carcinoma; squamous cell carcinoma vs basal cell carcinoma and actinic keratosis vs basal cell carcinoma).

** Chi-square test.

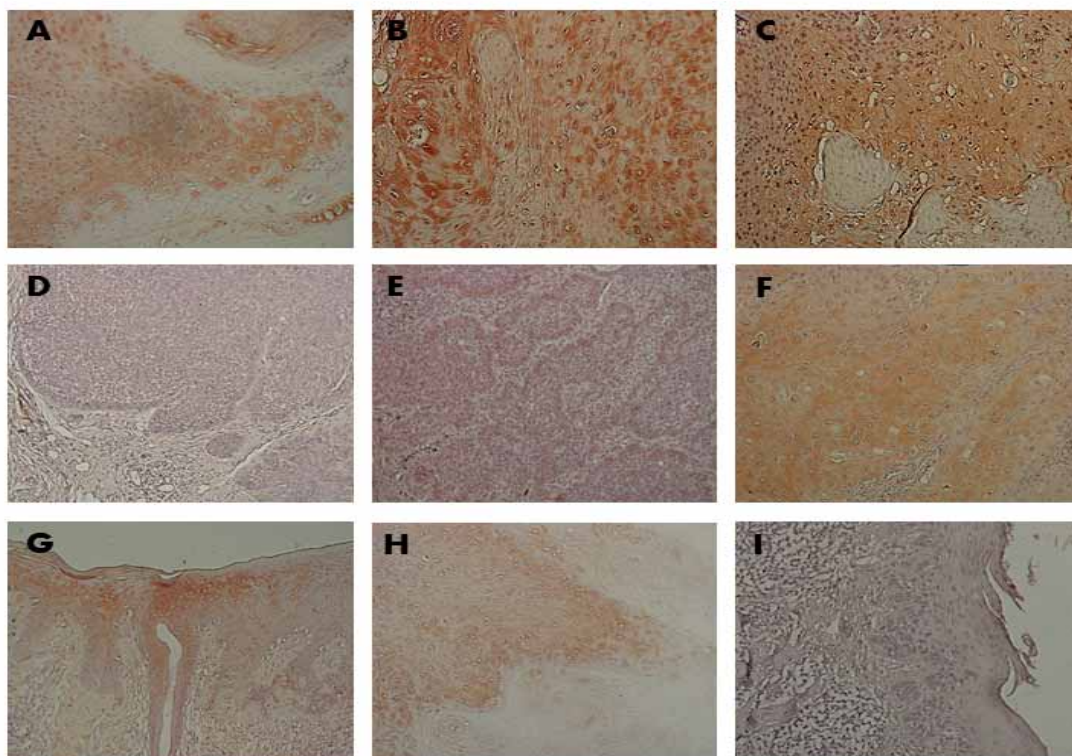


Figure 1. Immunohistochemistry for ST3Gal I (A-E) and ST6Gal I (F-I). (A) Actinic keratosis with diffuse cytoplasmic staining, grade: 3+; (B) Keratoacanthoma with diffuse cytoplasmic and membrane staining, grade: 3+; (C) Squamous cell carcinoma with diffuse cytoplasmic and membrane staining, grade: 3+, (D) Basal cell carcinoma with negative staining, grade: 0; (E) Basal cell carcinoma with nuclear and perinuclear staining, grade: 2+; (F) Squamous cell carcinoma with diffuse cytoplasmic staining, grade: 3+; (G) Squamous cell carcinoma with diffuse cytoplasmic staining, grade: 1+; (H) Keratoacanthoma with diffuse cytoplasmic staining, grade: 3+; (I) Actinic keratosis with negative staining, grade: 0. Staining patterns: 1 + weak; 2+ moderate; 3+ intense positivity.

Discussion

Aberrant glycosylation occurs in essentially all types of experimental and human cancers, and many glycosyl epitopes constitute tumor-associated antigens. Recent studies indicate that aberrant glycosylation is the result of initial oncogenic transformation, as well as a key event in the induction of invasion and metastasis (21).

The oligosaccharides in glycoconjugates are synthesized by specific glycosyltransferases to different types of carbohydrates to be inserted. The final structure of the saccharide chain is coordinated by the expression of these enzymes in normal and malignant cells (21). It was found, for example, that N-acetyl-glucosaminyltransferase V (GNT-V) plays a functional role in the malignant potential of endometrial cancer cells for the synthesis of β 1-6 branching of oligosaccharides. The increased expression of GNT-V is correlated with impaired clinical status in patients with different types of cancers and can be used as a prognostic indicator (22). The β -galactoside α 2,6 sialyltransferase (ST6Gal.I) is often over-expressed in many tumors and appears to be involved in processes such as phenotypic changes resulting in a more orderly tissue organization (23).

Studies indicate that skin carcinogenesis is associated with altered glycosylation patterns. Given this, lectins were used in malignant and benign tumors of the skin, demonstrating the absence and/or inaccessibility of carbohydrate residues in normal tissue and/or the presence of these carbohydrates, such as the T antigen of Thomsen-Friedenreich (24). In normal squamous cell epithelia, the glycophenotype is characterized by α 2,6-linked sialic acid expression in cells of the basal layer and α 2,3-linked sialic acid in basal as well as suprabasal layers of the epithelium (25).

Sialic acids (Sia) are a family of 9-carbon α -keto acids found predominantly at distal positions of oligosaccharide chains of glycoproteins and glycolipids. They are glycosidically linked to either the 3- or 6-hydroxyl group of galactose (Gal) residues or to the 6-hydroxyl group of N-acetylglucosamine (GlcNAc) or N-acetylgalactosamine (GalNAc) residues, and can form oligo- to

polysialic acid chains through either their hydroxyl groups (26). Terminal sugars play an important role in the function of glycoconjugates and it has been recognized that this sugar may somehow modulate the adhesion of cancer cells to extracellular matrix components (27). The way this modulation occurs is still controversial (23, 28).

Changes in the expression of Sia have been correlated with changes in gene expression of sialyltransferases (29). Sialyltransferases participates of many biological processes, including cell–cell communication, cell–matrix interaction, adhesion, and protein targeting (30). In squamous carcinoma of the colon, the expression levels of ST6Gal I and ST3Gal III were significantly higher in patients with lymph node metastasis compared with those without metastasis (29).

In an attempt to investigate this correlation, in this study immunohistochemical against ST3Gal I and ST6Gal I in samples previously subjected to lectin histochemistry were carried out to evaluate the expression of α 2,3- and α 2,6-linked Sia. It was observed that in most of the lesions analyzed, ST6Gal I and ST3Gal I presented a diffuse pattern in cytoplasm and membrane.

Although sialyltransferases are expected to be located in the *trans* Golgi and TGN, there are reports about post-Golgi localizations, one report showed a plasma membrane association of ST6Gal I by using protein-specific antibodies (31). Sialyltransferases in the region of the luminal membrane might have a function in the re-sialylation of recycling cell surface glycoproteins (31). In fact it is thought that these ecto-sialyltransferases (EctoST) are modulators of the cell activity allowing a rapid change in cell surface features which leads to the regulation of many biological processes. It was already observed that EctoST are involved in the regulation of adhesion of neutrophils (32).

In present study, all the cutaneous epithelial lesions studied exhibited an increased expression of ST3Gal I when compared with ST6Gal I ($p = 0.0028$). This pattern was previously observed by our group (data not showed) using lectin histochemistry, with greater expression of α 2,3-linked Sia residues. In bladder cancer, the ST3Gal I plays a major role in the sialylation of the T

antigen and its overexpression appears to be part of initial oncogenic transformation (33). Altered expression of α -2,3-sialyltransferase mRNA has also been shown in ovarian cancer (30).

All enzymes of the ST3Gal family transfer sialic acid residues in α 2,3-linkage to terminal Gal residues found in glycoproteins or glycolipids (29). Burchell *et al.* (34) previously shown that, in breast cancer cell lines the truncated O-glycans carried by cancer-associated MUC 1 it is correlated to an increase in sialyltransferase activity responsible for the addition of sialic acid in α 2,3 linkage to core 1 (Gal β 1-3GalNAc). Other studies demonstrated that over-expression of ST3Gal-I is functionally involved in oncogenesis, suggesting that ST3Gal-I over-expression is not just a collateral effect of carcinogenesis but may provide some advantages to tumor development in breast cancer. The results also suggested that ST3Gal-I exerts its effect early in tumor development (11). In the case of cutaneous epithelial lesions, overexpression of ST3Gal I seems to be involved the development and maintenance of tumors premalignant and malignant.

Although overexpression of ST6Gal I is reported more frequently in many human malignancies and is associated with characteristic of invasive cancer, the effect of the presence of sialic acids in glycoproteins such as integrin receptors is strongly dependent on cell type, the type of specific binding and the level of sialylation (23). Using immunohistochemistry Cao *et al.* (35) showed that expression levels of ST6Gal I was lower in poor-differentiated hepatocellular carcinoma. The same was observed in the studies by Poon *et al.* (36). These same studies conclude that the role of this enzyme differ from tumor to tumor. Thus, the expression of ST6Gal I may have different effects on different types of cancers. Our results showed significant differences in expression of ST6Gal I ($p=0.0025$) between cutaneous epithelial lesions. In fact, the level of ST6Gal I expression differs dramatically from tissue to tissue (37). Several clinical and experimental studies suggest a positive correlation between high ST6Gal I levels and the invasive behavior of cancer cells (38), but other studies have reported opposite conclusions (22, 38). Our results showed

a higher expression of ST6 in AK, KA and SCC, tumors with high invasive potential, demonstrating that this correlation exists in skin cancer.

In squamous epithelia α 2,6-linked Sia is a more potent disguising agent than α 2,3-linked Sia concerning the binding of Gal-3 and also indicate the differentiation-dependent control of α 2,6-sialylation of the basal layer cell surface (25). Our results for SCC negative for lectin histochemistry with SNA were also negative for immunohistochemistry with anti-STG6Gal. This indicates that the pattern of distribution and/or localization of Sia in this type of tumor may be directly related to the expression of specific sialyltransferases. In fact, compared to normal cells, tumor cells often exhibit different amounts of Sia on their cell surface that are related to their pattern of expression of sialyltransferases (39). In addition no significant difference in the pattern of expression of ST3Gal I and ST6Gal I in cases of SCC, KA and AK. Some authors consider that both KA and AK tumors are premalignant lesions that precede the SCC. AKs are considered premalignant as they may develop into invasive SCC (3, 40). It is suggested that 10% of these sun-induced lesions will develop into skin SCCs (41). Whether ST3Gal I and ST6Gal I plays a causal role in the progression of AK to SCC remains to be addressed.

Although many immunohistochemical studies have claimed to be helpful in the distinction between KA and SCC, the results until have been conflicting and lead to the opinion that KA is a variant of SCC (42). Our results showed that immunohistochemical staining for ST3Gal I and ST6 Gal I it is no able to distinguish clearly between KA and SCC. However, the histochemistry with lectins showed that there are significant differences between the glyco phenotype these tumors. KA presented low expression of α 2,6 sialic acid (recognized for SNA) and high expression of α 2,3 sialic acid (recognized for MAA). This indicates that, despite showing similar expression of sialyltransferases, these tumors have a different pattern of sialylation that is related to tumor behavior. KA tends to regress spontaneously indicating a biologically benign course in distinction from the SCC.

In contrast to AK, KA and SCC, BCC showed low or no ST3Gal I and ST6Gal I expression. This work showed a significant difference in expression pattern of sialyltransferases between BCC and SCC, and between AK and KA. The differential expression of ST3Gal I and ST6Gal I between SCC and BCC is intriguing. The fact that both ST3Gal I as ST6Gal I are consistently expressed in most of cases of cutaneous SCC, which are capable of metastasis, and not expressed in BCC, which have no potential of metastasis, suggest the potential role these sialyltransferase in facilitating metastasis. Recent studies support this possibility. Both ST6Gal I and α 2-6 sialoconjugados play important roles in oncogenic transformation and metastasis (36). The overexpression of ST6 Gal I is well documented in several types of cancers resulting in a phenotype consistent with aggressive metastasis (43). The observation that ST3Gal I and ST6Gal I poorly expressed in the solid BCC is consistent with the staining pattern of lectin histochemistry (unpublished data).

ST3Gal I and ST6Gal I expression is important since the aberrant sialylation can mediate pathophysiological key events during various stages of tumor progression, including invasion and metastasis (28,33). The sialic acids are often responsible for tumor-associated antigenicity (44). Our results showed that the high expression of ST3Gal I and ST6Gal I appears to be involved in the development and maintenance of skin tumors with greater potential for invasion and metastasis as in the case of SCC. This glycophenotypic pattern resulting from the specific action of these enzymes may be useful in the differential diagnosis between malignant and premalignant as well as in understanding the biology of cancer in different tumors studied. Moreover, the observation of aberrant sialylated structures expressed in carcinomas can be used as targets for cancer immunotherapy.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgment

Authors thank Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) Agencies for financial support.

References

1. Lee JH, Pyon JK, Kim DW3, *et al.* Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010;29:116-123.
2. Walter A, Barysch MJ, Silvia Behnke S, *et al.* Cancer-Testis Antigens and Immunosurveillance in Human Cutaneous Squamous Cell and Basal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2010;16:3562-3570.
3. Chang PL, Harkins L, Hsieh YH, *et al.* Osteopontin Expression in Normal Skin and Non-melanoma Skin Tumors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2008;56:57–66.
4. Martinez MAR, Francisco G, Cabral LS, *et al.* Genética Molecular Aplicada ao Câncer Cutâneo Não Melanoma. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2006;81:405-419.
5. Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* 2011;113:236-254.
6. Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. *BMB reports* 2011:772-781.
7. Fuster Mm, Esko Jd. The Sweet and Sour of Cancer: Glycans as Novel Therapeutic Targets. *Nature* 2005;5: 526-542.
8. Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: Glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* 2006;7:599–604.

9. Brockhausen I. Biosynthesis of complex mucin-type O-glycans. Comprehensive Natural Products Chemistry II, Vol 5. Carbohydrates, nucleosides and nucleic acids. G. Wang Ed. Elsevier, London, UK: 2009.
10. Paulson JC, Blixt O, Collins BE. Sweet spots in functional glycomics. Nat Chem Biol. 2006;2:238–248.
11. Picco G, Julien S, Brockhausen I, *et al.* Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. Glycobiology 2010;20:1241–1250.
12. Cazet A, Julien S, Bobowski M, *et al.* Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. Carbohydrate Reserach 2010;345:1377-1383.
13. Weijers CA, Franssen MC, Visser GM. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. Biotechnology Advances 2008;26:436-456.
14. Harduin-Lepers A, Krzewinski-Recchi MA, Colomb F, *et al.* Sialyltransferases functions in cancers. Front Biosci (Elite Ed) 2012;4:499-515.
15. Drinnan NB, Halliday J, Ramsdale T. Inhibitors of sialyltransferases: potential roles in tumor growth and metastasis. Mini Rev Med Chem 2003;3: 501–517.
16. Hennet T, Chui D, Paulson JC, *et al.* Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:4504–4509.
17. Senda M, Ito A, Tsuchida A, *et al.* Identification and expression of a sialyltransferase responsible for the synthesis of disialylgalactosylgloboside in normal and malignant kidney cells: downregulation of ST6GalNAc VI in renal cancers. Biochemistry Journal 2007;402:459–470.
18. Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.* Essentials of Glycobiology, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008.
19. Li YL, Wu GZ, Zeng L, *et al.* Cell surface sialylation and fucosylation are regulated by the cell recognition molecule L1 via PLC gamma and cooperate to

modulate embryonic stem cell survival and proliferation. *FEBS Letters* 2009;583:703–710.

20. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, *et al.* Expressão de Marcadores de Proliferação Celular e Apoptose no Carcinoma Espinocelular de Pele e Ceratose Actínica. *Anais Bras Dermatol* 2009;84: 469-475.

21. Laidler P, Litynska A, Hoja-Lukowicz D, *et al.* Characterization of Glycosylation and Adherent Properties of Melanoma Cell Lines. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:112–118.

22. Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, *et al.* Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis. *British Journal of Cancer* 2007;97: 1538 – 1544.

23. Dall'olio F, Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S. Phenotypic changes induced by expression of β -galactoside α 2,6 sialyltransferase (ST6Gal.I) in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology* 2006;16:146-154.

24. Melo-Júnior MR, Araújo-Filho JLS, Beltrão EIC, *et al.* Análise digital de imagens de neoplasias da pele avaliadas pela histoquímica com lectinas: marcador potencial para alterações bioquímicas e diagnóstico diferencial de tumores. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006;42:455-460.

25. Smetana KJ, Plzac J, Dvoronkov B, Holčkovi Z. Functional Consequences of the Glycophenotype of Squamous Epithelia - Practical Employment. *Folia Biologica (Praha)* 2003;49:118-127.

26. Lehmann F, Kelm S, Dietz F, *et al.* The evolution of galactose α 2,3-sialyltransferase: *Ciona intestinalis* ST3GAL I/II and *Takifugu rubripes* ST3GAL II sialylate Gal β 1,3GalNAc structures on glycoproteins but not glycolipids. *Glycoconj J* 2008;25:323–334.

27. Tsukamoto H, Takakura Y, Yamamoto T. Purification, Cloning, and Expression of an β -Galactoside α 2,3-Sialyltransferase from a Luminous Marine

Bacterium, *Photobacterium phosphoreum*. The Journal of Biological Chemistry 2007;282:29794–29802.

28. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Current Opinion in Structural Biology 2009;19:1–8.

29. Wang PH. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. Journal of Cancer Molecules 2005, 1: 73-81.

30. Huang S, Day TW, Choi MR, Safa AR. Human β -galactoside α -2,3-sialyltransferase (ST3Gal III) attenuated Taxol-induced apoptosis in ovarian cancer cells by downregulating caspase-8 activity. Mol Cell Biochem 2009;331:81–88.

31. Burger PC, Lötscher M, Streiff M, *et al.* Immunocytochemical localization of α 2,3(N)-sialyltransferase (ST3Gal III) in cell lines and rat kidney tissue sections: evidence for Golgi and post-Golgi localization. Glycobiology 1998;8:245–257.

32. Piteira A. R. Identificação e Caracterização da Atividade de Sialiltransferase na Superfície Celular de Células Dendríticas. Dissertação de Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina 2009. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

33. Videira PA, Correia M, Malagolini N, *et al.* ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. BMC Cancer 2009;9:357-362.

34. Burchell J, Poulson R, Hanby A, *et al.* An α 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. Glycobiology 1999;9:1307-1311.

35. Cao Y, Merling A, Crocker PR, *et al.* Differential Expression of β -Galactoside α 2,6 Sialyltransferase and Sialoglycans in Normal and Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma. Laboratory Investigation 2002;82:1515-1524.

36. Poon TC, Chiu CH, Lai PB, *et al.* Correlation and prognostic significance of beta-galactoside α -2,6-sialyltransferase and serum monosialylated α -

fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 11:6701-6706, 2005.

37. Paulson JC, Weinstein J, Schauer A. Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* 1989;264:10931-10934.

38. Dall'olio F, Chiricolo, M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal* 2001;18: 841-850.

39. Peracaula R, Tabares G, López-Ferrer A, *et al.* Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. *Glycoconjugate Journal* 2005;22:135–144.

40. Ismail F, Ikram M, Purdie K, *et al.* Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (SCC) and the DNA Damage Response: pATM Expression Patterns in Pre-Malignant and Malignant Keratinocyte Skin Lesions. *PLoS ONE* 2011;6:e21271-e21280.

41. Boukamp P: Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005;26:1657–1667.

42. Krunic AL, Garrod DR, Madani S, *et al.* Immunohistochemical staining for desmogleins 1 and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *British Journal of Cancer* 1998;77:1275-1279.

43. Christie DR, Shaikh FM, Bellis, SL, *et al.* ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function. *Journal of Ovarian Research* 2008;1:3-11.

44. López-Morales D, Reyes-Leyva L, Santos-López G, Zenteno E, Vallejo-Ruiz V. Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Pathology* 2010;5:74-78.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A histoquímica com lectinas mostrou alterações na sialilação de glicoconjugados de tumores cutâneos não melanomas pré-malignos e malignos;
- ✓ Houve correlação entre a expressão de ácidos siálicos e a expressão de ST3Gal I e ST6Gal I;
- ✓ O carcinoma basocelular apresentou um menor conteúdo e/ou acessibilidade de resíduos de ácidos siálicos reconhecidos pela MAA e SNA;
- ✓ O padrão de marcação para ácidos siálicos nas posições α 2,3 e α 2,6 foi semelhante entre CEC, CA e KA;
- ✓ Os tumores com maior potencial metastático e invasivo, como CEC, apresentam maior padrão de sialilação.
- ✓ As lectinas utilizadas foram ferramentas úteis na detecção de ácidos siálicos de superfície demonstrando variação significativa existente no padrão de distribuição deste açúcar nos diferentes tipos de TCNM estudados;
- ✓ A imunohistoquímica foi útil na avaliação da expressão das sialiltransferases demonstrando variação significativa existente no padrão de expressão de ST3Gal I e ST6Gal I nos diferentes tipos de TCNM estudados;

8. PERSPECTIVAS

Através da imunohistoquímica, foi possível avaliar a expressão das sialiltransferases (ST6 Gal I e ST3 Gal I) e verificar uma possível correlação entre a expressão destas enzimas (glicogenótipo) e o padrão de marcação verificado na histoquímica com lectinas (glicofenótipo). Os tumores investigados apresentaram diferentes padrões de sialilação indicando que este tipo de glicosilação influencia no comportamento biológico de cada tumor cutâneo não melanoma. Estudos sobre o perfil de distribuição de outros açúcares se faz necessário para construção de um painel de carboidratos para entender o papel dos diferentes elementos da cadeia sacarídica na superfície celular de tumores cutâneos pré-malignos e malignos.