

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

GABRIELA SOUTO VIEIRA DE MELLO

**AVALIAÇÃO DO GLICOCÓDIGO PRESENTE NO CARCINOMA
DUCTAL *in situ* DE MAMA E SUA RELAÇÃO NA
DETERMINAÇÃO DO PROGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO**

Recife

2014

GABRIELA SOUTO VIEIRA DE MELLO

**AVALIAÇÃO DO GLICOCÓDIGO PRESENTE NO
CARCINOMA DUCTAL *in situ* DE MAMA E SUA
RELAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DO PROGNÓSTICO E
DIAGNÓSTICO**

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do título de
Doutor em Inovação Terapêutica.**

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Co-orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo**

**Recife
2014**

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mello, Gabriela Souto Vieira de

Avaliação do glicocódigo presente no carcinoma ductal *in situ* de mama e sua relação na determinação do prognóstico e diagnóstico / Gabriela Souto Vieira de Mello. – Recife: O Autor, 2014.

128 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus B. de Melo Rêgo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia

1. Mamas – Câncer 2. Biomarcadores 3. Lectinas 4. Cancer-Diagnóstico

I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Rêgo, Moacyr Jesus B. de Melo (coorientador) Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-150

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: VIEIRA DE MELLO, GS

Título: Avaliação do glicocódigo presente no carcinoma ductal *in situ* de mama a sua relação na determinação do prognóstico e diagnóstico

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

Aprovada em: 26/02/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Dra. Michelly Cristiny Pereira
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Uitamira Feitoza Souto, pelo apoio incondicional, em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo e por ter colocado tantas pessoas maravilhosas na minha vida.

À Minha mãe, Uitamira pelo suporte moral e financeiro, pelo eterno incentivo e por manter nossa família unida que, junto com meu irmão João, me deram forças para correr atrás de tudo que eu sempre quis.

Ao Meu pai, Ricardo José (*in memorian*), pelo exemplo de vida e força espiritual.

À minha avó Irene (*in memorian*) pelo maravilhoso acolhimento em sua casa.

Aos meus padrinhos Roberto Vieira de Mello e Maristela Ferraz por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã de alma Petra, por sempre estar ao meu lado nas piores horas e pelos maravilhosos momentos de descontração. Por TUDO.

Aos meus amigos Marcela Randau, Mirella Soares, Debora Salvi, Bárbara Araújo e André Fantini por terem enchido minha pós-graduação de momentos felizes e descontraídos, os levarei para sempre no meu coração.

A minha cunhada, Raquel Menezes, por amar a minha família.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Beltrão pela oportunidade e por me ensinar a acreditar mais em mim.

Ao meu amigo e co-orientador Moacyr Barreto pela amizade, pelos ensinamentos, apoio, pela paciência, por simplesmente fazer parte da minha vida.

Ao Prof. Alfredo Ribeiro Silva pela contribuição do material biológico empregado neste estudo.

À Profa. Suely Galdino (*in memorian*), pela dedicação ao programa e aos alunos e por sua incrível determinação, paciência e benevolência.

A todos os membros do BmC que tornaram o andamento desse trabalho mais agradável, em especial a Antônio Felix.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano por estar sempre disposto a ajudar e pela eterna simpatia.

À CAPES pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do projeto.

RESUMO

VIEIRA-DE-MELLO, GS. Avaliação do Glicocódigo Presente no Carcinoma Ductal *in situ* de Mama e sua Relação na Determinação do Prognóstico e Diagnóstico. 2014. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer de mama apresentou na última década um aumento na ocorrência e consequente mortalidade, sendo o segundo tipo de câncer mais comum e o primeiro entre as mulheres. A sua forma *in situ* é caracterizada pelo crescimento confinado das células tumorais, e o que leva à invasão ainda permanece em discussão. Esta neoplasia está intimamente associada com a expressão modificada de diversas enzimas e resíduos de carboidrato de superfície associados a um mau prognóstico, que alteram a capacidade de crescimento, adesão e reconhecimento das células tumorais. Este trabalho teve como objetivo comparar a presença dos terminais sacarídicos N-acetilglicosaminas, ácido siálico e N-acetilgalactosaminas na superfície celular entre os tipos histológicos de lesões encontradas com carcinoma ductal *in situ* (CDIS), e correlacionar a expressão destes, e das enzimas GnT-III, ppGalNAc-T6 e -T8 com o histórico clínico e histopatológico dos pacientes na predição de um prognóstico/diagnóstico mais acurado e na investigação destas moléculas como potências biomarcadores. Foram utilizadas biópsias diagnosticadas como CDIS e CDIS com componente invasivo (CDI). As biópsias em bloco de parafina e em microarranjos de tecidos (*tissue microarrays* - TMA) foram avaliadas utilizando histoquímica com lectinas (WGA, L-PHA, MAL-II, SNA, PNA conjugadas à peroxidase) e imunohistoquímica contra GnT-III, ppGalNAc-T6 e -T8. Entre as cinco lectinas analisadas nas 218 lesões de CDIS puras a MAL-II foi mais expressa em lesões cribriformes quando comparadas com as comedônicas ($p=0,0191$) e com as sólidas ($p=0,0440$), enquanto a PNA mostrou maior reatividade em lesões comedônicas ($p=0,0052$) e micropapilares ($p=0,0010$) comparadas às sólidas. As demais lectinas não demonstraram diferenças estatisticamente relevantes em suas expressões. 109 pacientes, 47 com CDIS puro e 62 com CDIS mais CDI foram analisados em lâminas de TMA, os resultados mostraram que em lesões puras de CDIS o $\alpha 2,3$ ácido siálico (reconhecido pela MAL-II) se correlaciona inversamente com a expressão dos receptores de estrógeno (RE, $p=0,015$) e progesterona (PR, $p=0,024$) e é altamente expresso em tumores >5 cm ($p=0,01$), em adição a expressão da GnT-III associou-se a presença de lesões comedônicas ($p=0,007$) e a ppGalNAc-T8 com pacientes na pré-menopausa ($p=0,037$). Nas lesões mistas, o $\alpha 2,3$ ácido siálico foi inversamente correlacionado com o HER-2 ($p=0,038$) e a expressão da GnT-III foi maior em tumores com alto grau nuclear ($p=0,039$). Os resultados mostram que, entre todos os marcadores avaliados, o $\alpha 2,3$ ácido siálico se destacou como um potencial fator prognóstico para as lesões mais agressivas no CDIS, indicando a lectina MAL-II como uma importante ferramenta diagnóstica bem como a glicosiltransferase ppGalNAc-T8.

Palavras-chave: Câncer de mama, glicocódigo, fatores prognósticos.

ABSTRACT

VIEIRA-DE-MELLO, GS. Evaluation of the Ductal Carcinome *in situ* of the Breast Glycocode and its Relation with Prognostic and Diagnostic. 2014. Thesis. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Breast cancer presented in the last decade an increased occurrence and consequent mortality, being the second most common cancer and the first among women. The *in situ* form is characterized by the confined growth of tumor cells, and what leads to invasion is still under discussion. This neoplasia is closely associated with altered expression of several enzymes and surface carbohydrates residues associated with a poor prognosis, which alter the capacity for growth, adhesion and recognition of tumoral cells. This work aimed to compare the presence of the terminal saccharide *N*-acetylglucosamines, sialic acids and *N*-acetylgalactosamines on the cell surface among the histologic types of lesions found in ductal carcinoma *in situ* (DCIS), and to correlate the expression of these and the enzymes GnT-III, ppGalNAc-T6 and -T8 with clinic-histopathology parameters in order to investigate these molecules as potential biomarkers and to have a more accurate prognosis/diagnosis and in the. Biopsies diagnosed as pure DCIS and DCIS with invasive (IDC) component were used. Paraffin-embedded biopsies and tissue microarrays (TMA) were evaluated with lectins histochemistry (WGA, PHA-L, MAL-II, SNA, PNA conjugated to peroxidase) and immunohistochemistry against GNT-III, ppGalNAc-6 and -8. Among the five lectins analyzed in 218 of pure DCIS lesions, MAL-II was positive in cribriform lesions when compared with comedo ($p = 0.0191$) and solid ones ($p = 0.0440$), while PNA showed a high reactivity in comedo lesions ($p=0.0052$) and micropapillary ($p=0.0010$) in comparison with solid subtype. The other lectins did not show statistically significant differences in their stainings. From the total of 109 patients, 47 with pure DCIS and 62 with DCIS with IDC were analyzed in TMA slides and results revealed that in pure DCIS the $\alpha 2,3$ -linked sialic acid (recognized by MAL-II) inversely correlates with the expression of estrogen ($p=0.015$) and progesterone ($p=0.024$) receptors and is highly expressed in tumors bigger than 5 cm ($p= 0.01$). In the same population, the GnT-III was associated with comedo lesions ($p=0.007$) and ppGalNAc-T8 with premenopausal patients ($p=0.037$). In DCIS with IDC $\alpha 2,3$ -linked sialic acid was inversely correlated with HER-2 ($p=0.038$) and GnT-III expression was higher in high grade tumors ($p=0,039$). Results indicated that $\alpha 2,3$ -linked sialic acid is a potential prognostic factor to highly aggressive DCIS lesions, indicating MAL-II as an diagnostic tool as well the glycosyltransferase ppGalNAc-T8.

Keyword: Breast cancer, glycocode, prognostic factors.

LISTA DE FIGURAS

DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Fotomicrografias dos diferentes tipos histológicos das lesões encontrados no carcinoma ductal *in situ*28

Figura 2. Representação gráfica dos tipos de ligações glicosídicas presentes nos *N*- e *O*-glicanos.....31

Figura 3. Importância da glicosilação durante a carcinogênese.....34

Figura 4. Atuação da enzima GnT-III durante a *N*-glicosilação.....38

DO ARTIGO 1

Figure 1. MAL-II and PNA histochemistry per DCIS lesions status.....48

Figure 2. MAL-II histochemistry.....48

Figure 3. PNA histochemistry.....49

DO ARTIGO 2

Figure 1. Lectin histochemistry of DCIS lesions (100X). (A) MAL-II staining pattern. (B) SNA staining pattern. (C) Negative control.....76

DO ARTIGO 3

Figure 1. Imunohistochemistry painel (100X). (A) GnT-III staining in pure DCIS (black arrow indicate positive cells). (B) GnT-III staining in DCIS plus IDC samples. (C) ppGalNAc-T8 staining in pure DCIS samples (D) ppGalNAc-T8 staining in DCIS plus IDC samples. (E) Negative control.....103

Figure 2. Histochemistry painel 9100X). (A) PHA-L staining in pure DCIS. (B) PHA-L staining in DCIS-IDC samples. (C) WGA staining in pure DCIS. (D) WGA staining in DCIS-IDC samples. (E) Negative control.....104

LISTA DE TABELAS

DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Fatores prognósticos do câncer de mama de acordo com o consenso do Colégio Americano de Patologistas25

Tabela 2. Importância dos *N*- e *O*-glicanos na progressão tumoral.....34

Tabela 3. Especificidades das lectinas.....40

Tabela 4. Especificações dos anticorpos.....44

DO ARTIGO 1

Table 1. Lectin histochemistry per DCIS lesions status.....48

DO ARTIGO 2

Table 1. Relationship between MAL-II and SNA staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesions74

Table 2. Relationship between MAL-II and SNA staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS plus IDC lesions.....75

DO ARTIGO 3

Table 1. Histological markers, lectins and immunohistochemistry reagents.....96

Table 2. Relationship between ppGalNAc-T6 and –T8 expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.....100

Table 3. Relationship between GnT-III expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.....101

Table 4. Relationship between lectin staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.....102

Table 5. Relationship between ppGalNAc-T6 and –T8 expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesion with invasion.....103

Table 6. Relationship between GnT-III expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesion with invasion.....104

Table 7. Relationship between lectin staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers DCIS lesions with invasion.....105

.

LISTA DE ABREVIações

BRCA	Câncer de mama (do inglês: <i>Breast Cancer</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CDI	Carcinoma Ductal invasivo
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromógena (do inglês: <i>chromogen in situ hybridization</i>)
DAB	Diaminobenzidina
GAG	Glicosaminoglicano
GSL	Glicoesfingolipídio
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GnT	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferase
GnT-III	β 1,4- <i>N</i> -acetilglucosaminiltransferase III
HER-2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2 (do inglês: <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L-PHA	Leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
MAL-II	Lectina de <i>Maackia Amurensis</i>
PBS	Tampão fosfato- salino (do inglês: <i>Phosphate buffer solution</i>)
ppGalNAc-	UDP-GalNAc:polipeptídeo α - <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferases
PNA	Lectina de Amendoim
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
TBS	Solução Tris Salina (do inglês: <i>Tris buffered saline</i>)
TMA	Microarranjos Teciduais (do inglês: <i>Tissue Microarray</i>)
UDP	Uridina difosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	O Câncer de Mama	16
3.1.1	Aspectos Gerais	16
3.1.2	Fatores Prognósticos	19
3.1.3	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	26
3.2	Glicosilação Celular	28
3.2.1	Alterações da Glicosilação e o Câncer	31
3.2.2	UDP-GalNAc: polipeptídeo <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase	35
3.2.3	β 1,4- <i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase III	37
3.3	Lectinas	39
4	METODOLOGIA	41
4.1	Amostras	41
4.2	Microarranjos Teciduais (TMA – “ <i>Tissue Microarray</i> ”)	41
4.3	Histoquímica com lectinas	42
4.4	Imunohistoquímica	43
4.5	Hibridização <i>in situ</i> Cromógena	44
4.6	Análise de Imagens	45
4.7	Aspectos éticos	45
4.8	Análises Estatísticas	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Artigo 1: Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma <i>in situ</i>	46
5.2	Artigo 2: <i>Maackia amurensis</i> Lectin II Predicts Prognostic in Ductal Carcinoma of the Breast	51

5.3 Artigo 3: Glycobiologyc Aspects Of The Breast Cancer: An Imunohistochemistry and Lectin Histochemistry Approach Of Ductal Carcinoma <i>In situ</i>	77
6 CONCLUSÕES	106
7 PERSPECTIVAS	108
8 REFERÊNCIAS	109
9 ANEXOS	119
9.1 Normas da revista Acta Histochemica et Cytochemica.....	119
9.1.1 Editorial Scope.....	119
9.1.2. Categories.....	119
9.1.3 Manuscript Organization.....	120
9.2 Normas da revista Folia Histochemica et Cytobiologica.....	124
9.2.1 Focus and Scope.....	124
9.2.2 Organization of manuscript	125

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) caracteriza-se pela proliferação celular anormal confinada nos ductos mamários. Com o desenvolvimento do programa de rastreamento mamográfico houve um aumento significativo da ocorrência deste tipo de carcinoma, e, devido a sua baixa incidência, comparada com o carcinoma ductal invasivo (CDI) e sua recente importância médica, atualmente existe uma limitada quantidade de informação sobre o CDIS, tornando difícil a exata previsão do seu comportamento biológico e progressão (LYNGE et al., 2014).

Em homeostase, as células expressam proteínas de superfície que sofrem modificações pós-traducionais. Dentre estas se destaca a glicosilação, caracterizada pela adição covalente de uma ou mais cadeias oligossacarídicas à sequência de aminoácidos mediada pela ação de glicosiltransferases. Esses carboidratos participam de vários processos fisiológicos como adesão, transdução de sinais e reconhecimento biológico, unindo-se a diferentes moléculas, como as lectinas, e mediando interações célula-célula e célula-matriz extracelular (HAKOMORI & CUMMINGS, 2012).

Dentro das alterações moleculares mais notórias das células cancerosas, destaca-se o aumento da exposição de resíduos de carboidratos produzidos pelas *N*- e *O*-glicosilações incompletas que durante o processamento da cadeia sacarídica formam glicoconjugados truncados. Muitos estudos têm descrito a presença destas biomoléculas em mais de 90% dos carcinomas, onde sua expressão está associada a um prognóstico reservado relacionado com uma progressão mais agressiva e o desenvolvimento de metástase (CHRISTIANSEN et al., 2013). Entre as enzimas envolvidas na glicosilação que se apresentam comumente alteradas nas células tumorais encontram-se a β 1,4-*N*-acetilglucosaminiltransferase III (GnT-III) e a UDP-GalNAc:polipeptídeo α -*N*-acetilgalactosaminiltransferases (ppGalNAc-T) (MIWA et al., 2012; NAKADA, 2012).

Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos que apresentam uma distribuição ubíqua na natureza e possuem a capacidade de agir como moléculas de reconhecimento dentro e na superfície celular. Devido às interações lectina-carboidrato serem reversíveis e altamente específicas, elas têm sido amplamente empregadas em diferentes áreas científicas como ferramentas para análise do perfil glicídico de glicoconjugados, em sua maioria glicoproteínas (LAM & NG, 2011).

Atualmente o estudo das glicoproteínas nas células transformadas da mama, auxilia o entendimento de características moleculares de glicoconjugados na possível progressão para a malignidade, representando uma fonte promissora de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos. Em adição, biomarcadores exclusivos para o câncer de mama são pouco descritos, fazendo-se necessário um maior aprofundamento do seu processo de glicosilação (ZHAO et al., 2013).

Este trabalho teve como objetivo comparar a presença dos terminais sacarídicos *N*-acetilglicosaminas, ácido siálico e *N*-acetilgalactosaminas na superfície celular entre os tipos histológicos de lesões encontradas com carcinoma ductal *in situ* (CDIS), e correlacionar a expressão destes, e das enzimas GnT-III, ppGalNAc-T6 e -T8 com o histórico clínico e histopatológico dos pacientes na predição de um prognóstico/diagnóstico mais acurado e na investigação destas moléculas como potenciais biomarcadores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de *N*- e *O*- glicosilação pelas enzimas ppGalNAc-T6 e -T8 e GnT-III em carcinomas ductais *in situ* puros ou com componente invasivo da mama, bem como analisar o perfil carboidrático destas lesões. A partir destes dados, diferenciar os tipos de lesões e correlacionar com dados de valor prognóstico e diagnóstico da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão das enzimas GnT-III, ppGalNAc-T6 e -T8 nas lesões puras e mistas de CDIS;
- Avaliar os terminais sacarídicos carregando *N*-acetilglicosaminas, ácido siálico e *N*-acetilgalactosaminas na superfície celular nas lesões puras e mistas de CDIS;
- Correlacionar os dados histoquímicos e imunohistoquímicos com os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes;
- Avaliar as glicosiltransferases e as lectinas WGA, PNA, SNA, L-PHA, MAL-II como potenciais biomarcadores no diagnóstico do câncer de mama.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Câncer de Mama

3.1.1 Aspectos Gerais

O câncer é caracterizado como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Essa doença é uma das principais causas de morte, afetando uma em cada três pessoas no planeta e tem como causas principais fatores externos, como a exposição a elementos carcinogênicos, e fatores internos, como mutações, estando ambas inter-relacionadas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2013).

Apesar da capacidade em se desenvolver em qualquer tecido do corpo, os tipos de câncer mais frequentes são de pulmão, mama, colorretal, de estômago e de próstata. Entre as principais neoplasias destaca-se o câncer de mama, o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e, apesar de acometer ambos os sexos, é o mais comum entre as mulheres, representando a principal tipo de neoplasia do gênero (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2013).

Devido a sua alta e crescente incidência, o câncer de mama feminino tem se tornado foco de muitas pesquisas em todo o mundo e graças ao crescimento dos programas de rastreamento, ao aumento do conhecimento da biologia tumoral e ao desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas, tem ocorrido uma queda em sua taxa de mortalidade (VOLINIA et al., 2012).

Em 2008, ocorreram cerca de 1.38 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo, onde 60% destes se concentraram em países desenvolvidos, entretanto a sobrevida a partir de cinco anos nesses países foi de 61%, enquanto nos países em desenvolvimento essa taxa caiu para 57% em consequência não só de uma melhor saúde pública, mas também em

função dos programas de rastreamento mais eficientes, uma vez que mais de 90% dos casos são curáveis quando diagnosticados precocemente (WHO, 2013). No Brasil é esperado para 2014 57.120 novos casos, sendo 10.490 só na região Nordeste (INCA, 2013). Em razão disso, o câncer de mama é hoje considerado uma doença de extrema importância para saúde pública.

Apesar ser considerado um câncer de bom prognóstico, quando diagnosticado precocemente, o câncer mama ainda representa um grande desafio para os médicos e pesquisadores, devido a alta heterogeneidade dos tipos celulares, uma etiologia variada, sendo influenciada tanto por fatores genéticos como ambientais, e uma diversidade de vias do ciclo celular desreguladas (STEPHENS et al., 2012). Desta forma sua compreensão é dificultada quanto aos fatores envolvidos na progressão tumoral o que tem como consequência o não estabelecimento de padrões no tratamento; e embora se tenha evoluído muito na habilidade de detectar a doença em seu estágio inicial, a capacidade de interferir nesse processo ainda é muito limitada (VOLINIA et al., 2012).

Um modelo para a progressão do câncer de mama preconiza estágios clínico-histopatológicos bem estabelecidos, onde as células epiteliais se modificam evoluindo para uma hiperplasia *in situ*, com a subsequente evolução para um carcinoma *in situ* e posterior carcinoma invasivo, que pode resultar, ou não, em uma doença metastática (GEIGER et al., 2012). Buerger e colaboradores (1999) propuseram a partir da observação de alterações genéticas em carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasivo da mama, que ocorreriam diferentes vias evolutivas para o carcinoma desta glândula, baseados no fato de que diferentes tipos de carcinoma ductal *in situ* albergam diferentes alterações genéticas e que estas alterações genéticas são semelhantes às observadas em suas contrapartidas invasivas (ELLIS, 2010).

Entretanto esse padrão de evolução não é absoluto e diversos estudos têm demonstrado que os CDIS, apesar de serem potenciais precursores dos carcinomas invasivos, fazem parte de um grupo bastante heterogêneo que nem sempre se tornarão invasivos (BIJKER et al., 2013). Em adição a ausência de um padrão evolutivo, a incidência deste tipo de neoplasia também é

influenciada por diversos fatores, como a ingestão de bebida alcoólica, alimentação e obesidade, gênero, idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética, doença benigna prévia, exposição da mama à radiação, entre outros (LOPES-GARCIA et al., 2010).

Nas mulheres, a história reprodutiva (menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade) e a idade têm uma clara influência no desenvolvimento destes carcinomas, uma vez que uma estimulação estrogênica prolongada é um fator predominante nas pacientes (BERKEY et al., 2012). O estrógeno é um forte agente mitogênico das células da mama, induzindo, dentre outros, a expressão de genes envolvidos com o ciclo celular, que em células geneticamente suscetíveis, pode alterar as vias de crescimento e diferenciação celular, desenvolvendo o tumor (BERKEY et al., 2012).

Como consequência, o carcinoma mamário apresenta uma maior incidência a partir do 30 anos de idade, sendo que a cada década de vida o risco aumenta consideravelmente e após a menopausa (sem a reposição hormonal), sua incidência diminui (TRICHOPOULOS et al., 2008). Em contrapartida ao estímulo estrogênico prolongado, a idade precoce de gravidez e o número total de partos são fortes fatores de proteção devido à indução de uma maior diferenciação celular da glândula mamária (VERKOOIJEN et al., 2012).

A predisposição genética ocorre em aproximadamente 10% de todos os cânceres de mama e envolve um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância limitada, onde mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*BReast CAncer 1* e *2*) estão presentes em grande parte dos tumores malignos de mama de caráter familiar (GOODWIN et al., 2012). Outras alterações genéticas menos frequentes também podem ocorrer e a maioria dos carcinomas esporádicos de mama tem origem em mutações variadas, que levam a alterações em vias genéticas diversas resultando na heterogeneidade clínica e molecular destas neoplasias (REEVES et al., 2012).

Os carcinomas mamários possuem três vias principais de disseminação, a via local, hematogênica e linfática nos quais 30 a 50% dos casos apresentam metástases nos linfonodos axilares no momento do diagnóstico. De uma forma geral a presença das metástases regionais indica a presença de metástases

distais, sendo que quanto maior o número de linfonodos envolvidos, maior a probabilidade de metástases distais. Os locais de metástases sistêmicas ocorrem com maior frequência nos pulmões, ossos, fígado, glândulas suprarrenais, ovários e sistema nervoso central (SCULLY et al., 2012).

3.1.2 Fatores Prognósticos

A heterogeneidade da história natural do câncer de mama é razoavelmente conhecida, entretanto a progressão da doença e a sobrevida variam entre pacientes, e seus determinantes incluem diversos fatores como a velocidade de crescimento tumoral, o potencial metastático e outros mecanismos, ainda não completamente compreendidos, como a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente (VERKOOIJEN et al., 2012).

Um fator prognóstico é definido como um parâmetro mensurável no momento do diagnóstico que serve como preditor da sobrevida ou do tempo livre de doença, no caso do câncer de mama, esses fatores abrangem um amplo universo de condições de risco, incluindo desde variáveis como a idade da paciente no momento do diagnóstico, até complexas alterações genéticas (MOOK, 2011).

A combinação destes fatores também auxilia a aplicação de modalidades terapêuticas mais efetivas e individualizadas para cada paciente. Uma maior efetividade da utilização dos fatores prognósticos depende diretamente de uma avaliação conjunta de diversos fatores, que levam ao estabelecimento mais preciso da evolução e da provável recidiva dos tumores de mama (MOOK et al., 2011).

De uma forma geral, os fatores prognósticos do câncer de mama são capazes de estratificar os pacientes em dois grupos, aqueles em que é esperado um maior benefício da terapia adjuvante, o qual inclui todos os pacientes com metástase linfonodal; e um segundo grupo de pacientes nódulo-negativo em que o risco e o custo de uma terapia adjuvante superam o benefício esperado (MOOK, 2011).

O Colégio Americano de Patologistas agrupa os fatores prognósticos em três categorias apresentadas na Tabela 1. A categoria 1 inclui os fatores prognósticos clássicos como tamanho do tumor, estado linfonodal, graduação e tipo histológico. Entre estes, o tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos axilares, além de se correlacionarem diretamente, são os mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama (GOLDHIRSCH et al., 2011). Entre os biomarcadores clássicos estabelecidos como fatores prognósticos desta categoria destacam-se os receptores de estrogênio e progesterona.

Nas últimas décadas, o tamanho do tumor no momento do diagnóstico tem sido um fator determinante na realização de cirurgias, por consequente o número de cirurgias radicais (mastectomias) vem sendo reduzidas gradativamente em favor das cirurgias conservadoras (segmentectomias). Isto se deve ao fato de que os tumores de menor tamanho estão invariavelmente relacionados a um melhor prognóstico tanto para a sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença. Em adição, quanto maior o tamanho tumoral, maiores são as chances da existência de comprometimento metastático dos linfonodos loco-regionais (SPERDUTO et al., 2012).

Hansen e colaboradores (2001) analisaram 13.464 mulheres com câncer de mama linfonodo-negativo, e concluíram que pacientes com tumores <1 cm têm sobrevida total de pelo menos 5 anos em 99% dos casos comparados com 89% dos tumores entre um e três centímetros. Eles apresentaram o tamanho do tumor, para estes pacientes, como o fator prognóstico mais poderoso, passando a ser rotineiramente utilizado durante a escolha do tratamento adjuvante. Em geral, para pacientes com o tumor >1-2 cm se é considerada a terapia adjuvante, uma vez que podem ter um risco de recorrência de $\geq 20\%$ (EDGE et al., 2010).

Em pacientes em que ocorre o envolvimento linfonodal, o tamanho do tumor se soma a presença ou ausência deste envolvimento na determinação de um prognóstico e de um tratamento mais eficaz (FOULKES et al., 2010). A grande maioria dos pacientes que apresentam metástase linfonodal são candidatos para terapia adjuvante. Entretanto, determinar quais pacientes linfonodos-negativos deve receber terapia adjuvante ainda permanece um

desafio, particularmente devido à maioria ser curado apenas com a retirada do tumor (FOULKES et al., 2010).

Mirza e colaboradores em 2002 sugeriram fatores preditivos através de uma metanálise de fatores prognósticos para pacientes com linfonodo axilar negativo, e observaram que o tamanho do tumor, grau histológico, expressão de catepsina D, fração de fase S, embolização vascular e contagem mitótica foram as principais variáveis na previsão da sobrevida livre de doença e sobrevida geral.

O comprometimento dos linfonodos axilares indica uma maior agressividade tumoral avaliado pelo número absoluto de linfonodos comprometidos pela doença, no qual a sobrevida das pacientes está diretamente relacionada ao número de linfonodos comprometidos (SCOMERSI et al., 2010).

Variações das características histológicas de CDIS apresentam diferentes comportamentos biológicos e agressividade tumoral, e por isso os subtipos histológicos também são de grande importância na determinação do prognóstico no câncer de mama. Em adição, lesões que apresentam subtipos histológicos específicos, muitas vezes possuem prognósticos mais favoráveis que os cânceres de mama inespecíficos. Esses subtipos podem variar de muito favoráveis, como carcinoma tubular, mucinoso, papilar e carcinoma medular com linfonodos axilares negativos, a pouco favorável, como o carcinoma ductal infiltrante, que apresentam normalmente um maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que aquele verificado nos pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (VODUC et al., 2010).

Alguns subtipos histológicos menos frequentes, como o carcinoma medular (0,5% dos casos), estão associados a um melhor prognóstico do câncer de mama invasivo, particularmente para pacientes com linfonodos negativos (WONG et al., 2002). No outro extremo está o câncer de mama inflamatório, uma forma rara e agressiva de câncer invasivo, que representa 2,5% de todos os casos e é caracterizado por uma rápida progressão, metástases locais e distantes, idade de início mais jovem, e menor sobrevida global, 5% além dos cinco anos (BUITRAGO et al., 2011).

O grau histológico é um determinante importante do prognóstico, que além de permitir a estratificação de risco do tumor dentro de um determinado estágio, também reflete o potencial de malignidade do tumor, indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatizar (RAKHA et al., 2012).

Vários sistemas de classificação do grau histológico foram desenvolvidos, entretanto a classificação Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis conhecida como o Sistema de Classificação de Nottingham (BLOOM & RICHARDSON, 1957; ELSTON & ELLIS, 1991) é o sistema de classificação de grau histológico mais amplamente utilizado e recomendado por várias organizações internacionais como a Organização Mundial de saúde e o Royal Colégio de Patologistas (BUIRAGO et al., 2011).

Nesta classificação são pontuados individualmente o índice mitótico, a diferenciação celular e o pleomorfismo de um a três, e a pontuação de cada categoria é totalizada. Tumores com pontuação de três a cinco são bem diferenciados (grau 1 ou baixo grau), os de seis a sete são moderadamente diferenciados (grau 2 ou grau moderado), e oito e nove são fracamente diferenciados (grau 3 ou alto grau) com uma clara correlação entre estes graus histopatológicos e sobrevida, onde tumores de grau 1 tendem a ser menos agressivos que os de grau 3, tendo este último um risco relativo de recorrência de 4.4 comparado com os pacientes de grau 1 (RAKHA et al., 2010).

Apesar de ser considerado um fator prognóstico de relevância e ser primeiramente utilizado nas decisões em pacientes linfonodos negativos com tamanho de tumor limítrofe, a utilização do grau histológico no câncer da mama feminino ainda apresenta muitas controvérsias, uma vez que oferece dificuldades na sua reprodutibilidade devido a natureza subjetiva de sua determinação (RAKHA et al., 2012). Em adição, alguns estudos sugerem que tumores graduados incorretamente podem ocorrer quando a graduação é realizada com amostras limitadas obtidas de biópsia através de punção (MOOK, 2011).

Nos anos 70, os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) nos tumores mamários começam a ter importância clínica, e a partir da utilização da imunohistoquímica, a análise destes dois receptores se tornou prática comum na determinação do prognóstico dos casos de carcinomas de mama.

Entretanto, a maior contribuição da análise do *status* de ambos os receptores é a predição da resposta terapêutica, a terapia hormonal adjuvante. Como um fator prognóstico, a positividade do RE e/ou RP apresenta uma menor taxa de mortalidade comparada com as mulheres RE e/ou RP negativas, sendo considerados positivos, os tumores que apresentarem mais de 1% de células marcadas (CHLEBOWSKI et al., 2013).

Apesar de bem estabelecidos na prática clínica, o efeito prognóstico exato destes receptores apresenta dificuldades de avaliação devido à necessidade da terapia adjuvante com Tamoxifeno® e a perda de sua significância prognóstica em longo prazo, onde é descrito um melhor prognóstico para tumores RE-positivos durante os três primeiros anos de tratamento (GIULIANELLI et al., 2012). Em adição, é possível que a presença desses receptores tenha apenas valor preditivo para tumores de crescimento lento e com maior tempo de recorrência (HAMMOND et al., 2010).

Durante a definição do prognóstico, os status do RE e RP são avaliados em conjunto, entretanto vários estudos apontam a expressão do receptor de estrógeno como o biomarcador mais importante no câncer de mama, pois ele fornece uma maior correlação com a sensibilidade ao tratamento endócrino (CHLEBOWSKI et al., 2013).

Dois terços das pacientes com carcinoma de mama expressam receptor de estrógeno e estas têm chance sete a oito vezes maior de se beneficiar da terapêutica endócrina do que as pacientes que não expressam este receptor uma vez que as células tumorais RE-positivas fazem uso do estradiol como estímulo para o crescimento (BUIRAGO et al, 2011). Em adição, a ausência do RE está correlacionada com baixa diferenciação tumoral, alta taxa de proliferação celular e outras características desfavoráveis ao prognóstico, tornando a sobrevida dos pacientes RE positivo geralmente maior que os RE negativo (LOPES-GARCIA et al., 2010).

Em contrapartida o RP tem apresentado um papel secundário no desenvolvimento e na predição do prognóstico do câncer de mama tendo sua expressão fortemente dependente da presença de RE. Tumores que expressam unicamente o RP são raros e representam apenas 1% de todos os casos de câncer de mama, por isso é comum à reavaliação desse tipo de

tumor para eliminar a possibilidade de falso negativo (LINDSTRÖM et al., 2012).

Entretanto a resposta ao tratamento anti-estrógeno em pacientes com doença metastática é mais positiva nos pacientes com tumores que expressam ambos os receptores do que naqueles que apenas mostram positividade do RE, mas falta a expressão do RP (BUIRAGO et al., 2011).

Entre os fatores prognóstico das categorias 2 e 3 definidas pelo Conselho do Colégio Americano de Patologistas, destaca-se a amplificação do gene *HER-2/neu* responsável pela expressão de uma proteína transmembrana (HER-2) que participa da sinalização celular através da atividade da tirosinoquinas. Este oncogene é amplificado ou sua proteína superexpressa em aproximadamente 20% dos tumores de mama, e é um importante fator prognóstico para recaída e para reduzida sobrevida geral dos pacientes (KNAUER et al., 2010). A presença do HER-2 indica uma resistência relativa à terapia endócrina quando associada com o RE, visto que ambos utilizam as mesmas vias de atuação (DAWOOD et al., 2010).

Em 2007 foram estabelecidas as categorias de risco. Os pacientes incluídos no grupo de baixo risco apresentam linfonodos axilares negativos, tumor invasivo $\leq 2,0$ cm, grau histológico e/ou nuclear = 1, RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo, ausência de invasão vascular extensa e idade de 35 anos ou mais; as no grupo de risco intermediário, correspondente aos casos de pacientes com linfonodos axilares negativos e pelo menos um fator prognóstico desfavorável como um a três linfonodos acometidos, tumor maior do que 2,0 cm, grau histológico e/ou nuclear = 2 ou 3, RE/RP negativos, HER-2 positivo, presença de embolização vascular extensa e idade inferior a 35 anos e pacientes no grupo de alto risco correspondendo aos casos com 4 ou mais linfonodos positivos ou 1 a 3 linfonodos positivos e RE/RP negativos ou HER-2 positivo (GOLDHIRSCH et al., 2007).

Muitos fatores prognósticos e preditivos bem estabelecidos são utilizados no direcionamento do tratamento de mulheres com câncer de mama, entretanto ainda existem algumas dificuldades em identificar, de forma precisa, os pacientes que são mais adequados para a terapia adjuvante,

particularmente entre mulheres em estágios iniciais da doença (DAWOOD et al., 2010).

Essa dificuldade se deve principalmente a heterogeneidade da doença, ao número de fatores envolvidos e a variação inter-operador ou inter-laboratório da metodologia utilizada no diagnóstico, dificultando assim o controle de todas as variáveis que podem interferir no resultado. Portanto numerosos fatores estão atualmente sob investigação na tentativa de melhorar a predição do prognóstico e a resposta ao tratamento dos diversos pacientes (MOOK, 2011).

Tabela 1. Fatores prognósticos do câncer de mama de acordo com o consenso do Colégio Americano de Patologistas (FITZGIBBONS et al., 2000)

Categoria 1	Estadiamento TNM
	Tipo Histológico
	Grau Histológico
	Contagem de Mitose
	Estado de receptores hormonais
Categoria 2	HER-2
	MIB-1
	Invasão vascular linfática
	p53
	DNA fração S
Categoria 3	Ploidia de DNA
	Angiogênese tumoral
	Fator de crescimento transformador α
	Receptor para fator de crescimento epidérmico
	BCL-2
	pS2
	Catepsina D

3.1.3 Carcinoma Ductal *in situ*

O Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS) é um câncer de mama não invasivo caracterizado pela proliferação das células epiteliais malignas dos ductos mamários delimitadas pela lâmina basal. Apesar da sua limitação histológica, essa patologia engloba um amplo espectro de doenças variando de lesões de baixo-grau (bem diferenciadas), que não representam risco de vida, a lesões de alto-grau (mal diferenciadas), que podem abrigar focos de câncer de mama invasivo (VOLINIA et al., 2012).

Esta categorização baseia-se em uma gama de características morfológicas como pleomorfismos nuclear e celular, presença de necrose, taxa mitótica, polaridade celular para o lúmen e padrões de arquitetura os quais são sólido, cribriforme, papilar, micropapilar e comedônico (Figura 1) (VIRNIG et al., 2010).

As lesões comedônicas caracterizam-se pela presença de necrose central e calcificação, preenchendo os espaços ductais. Nas lesões sólidas, o lúmen é ocupado por uma proliferação celular de tamanho médio, menores que as do tipo comedônicas. Os tipos micropapilar e papilar caracterizam-se por projeções papilares homogêneas, e mistas, respectivamente, na superfície interna dos espaços ducto-lobulares, já o tipo cribriforme apresenta espaços glandulares nítidos e marcados (PROVENZANO et al., 2013).

Por se apresentar como uma pequena massa clinicamente não palpável ou assintomática o CDIS foi raramente diagnosticado antes do início dos programas de rastreamento mamográfico nos anos 1980, em 1975 a taxa de incidência do CDIS era de 5,8 a cada 100.000 mulheres, esse valor foi aumentando progressivamente com o passar do tempo, e em 2004 alcançou a taxa de 32,5 a cada 100.000 mulheres. Apesar de alto, esse valor representa apenas de 20 a 25% do total de cânceres de mama diagnosticados, sendo a maior parcela representada pelo tipo invasivo (VIRNIG et al., 2010).

Devido a sua baixa incidência, quando comparada com o carcinoma ductal invasivo, e sua recente importância médica, atualmente existe uma limitada quantidade de informação sobre o CDIS, tornando difícil a exata previsão do seu comportamento biológico e progressão. Apesar da progressão

do CDIS para o carcinoma invasivo não ser obrigatório, onde apenas de 1 a 2% de todas as pacientes de CDIS primário apresentam metástase no linfonodo axilar, existe um consenso geral que o CDIS representa uma etapa intermediária entre o tecido mamário normal e o câncer de mama invasivo (HESELMAYER-HADDAD et al., 2012). Fato este baseado nas similaridades dos fatores de risco para ambas as incidências e suas similaridades de resposta ao tratamento, torna-se prudente aproximar clinicamente o CDIS do Carcinoma ductal invasivo (CDI) (HARTMAN et al., 2004; VIRNIG et al., 2010).

Apesar das semelhanças, alguns estudos apontam uma inadequada extrapolação direta de dados de ensaios clínicos que indicam a mastectomia e irradiação em carcinoma invasivo para o paciente com CDIS, uma vez que existe o risco de metástase no paciente com carcinoma invasivo no momento do diagnóstico, enquanto nos pacientes com CDIS esse risco se torna desprezível, para uma recorrência invasiva local (VOLINIA et al., 2012). Em contrapartida, tumores maiores que apresentam alto grau nuclear e a presença de comedo necrose apresentam uma alta probabilidade de recorrência local do CDIS ou CDI (VIRNIG et al, 2010).

Essas controvérsias criam dificuldades na escolha do tratamento mais adequado para o paciente, enquanto a mastectomia para o CDIS parece ser excessiva, as tentativas de excisão local em alguns centros têm uma alta taxa de recorrência local da doença *in situ* ou invasivo (VOLINIA et al., 2012). Neste contexto se torna necessária uma avaliação completa da extensão e da natureza da doença de cada paciente com CDIS, incluindo os aspectos clínicos, mamográficos e patológicos na determinação do tratamento mais adequado. Em termos clínicos, devem ser analisadas as presenças dos marcadores como RE, RP, HER-2, e presença de necrose, para diferenciar mulheres com alto risco das com menor risco de desenvolver doença invasiva, evitando assim um tratamento agressivo para aquelas que têm menor probabilidade de benefício (VIRNIG et al., 2010).

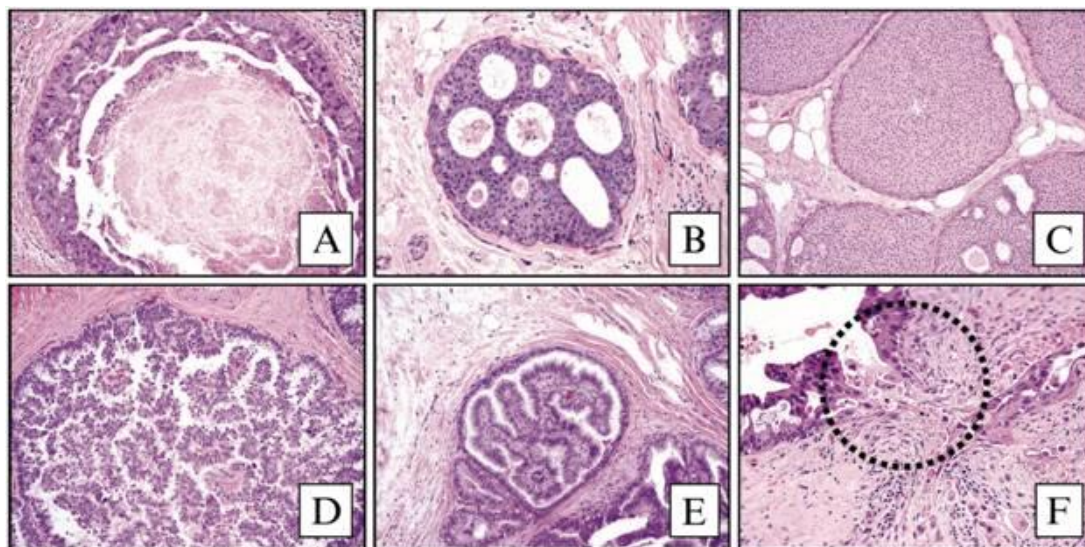


Figura 1. Fotomicrografias dos diferentes tipos histológicos de lesões encontradas no carcinoma ductal *in situ*. (A) comedo. (B) cribriforme. (C) sólido. (D) micropapilar. (E) papilar. (F) Invasão. (Fonte: Breastcancer .org, acessado em abril de 2013).

3.2 Glicosilação Celular

A glicosilação é a modificação covalente pós-tradução mais frequente das proteínas. Ela ocorre por meio da ligação de uma ou mais cadeias de oligossacarídeos a sequência de aminoácidos, conferindo à proteína um correto padrão de dobramento, maior resistência às proteases e uma maior estabilidade ante as modificações físico-químicas do meio, entre outras (ZOLDOS et al., 2012).

A presença dos carboidratos nas glicoproteínas gera uma grande diversidade de moléculas, dada variedade de glicanos que se pode produzir a partir de um número relativamente limitado de monossacarídeos. Essa grande diversidade permite que o padrão de glicosilação de uma proteína varie entre os tipos celulares que a produz e entre as diversas situações fisiológicas e patológicas do mesmo tecido. Em tecidos normais as glicoproteínas participam de diversas funções celulares importantes como reconhecimento biológico, interações célula-célula e célula-matriz extracelular e sinalização celular (HAKOMORI & CUMMINGS et al., 2012).

A adição dos carboidratos às proteínas é realizada por uma família de enzimas denominadas glicosiltransferases, cujas especificidades, a ação sequencial, níveis de atividade relativa e localização intracelular são de fundamental importância na determinação de um perfil de glicosilação célula-específica. Entretanto, devido à complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos, a glicosilação ainda é pouco conhecida (POTAPENKO et al., 2010).

Além da alta variabilidade gerada pelas possíveis combinações entre glicanos e proteínas, as estruturas dos carboidratos podem ser reduzidas ou modificadas de acordo com uma série de fatores, incluindo a especificidade das glicosiltransferases e sua localização no aparelho de Golgi (POTAPENKO et al., 2010). Embora a relação entre os genes e proteínas seja relativamente simples, os glicanos não são sintetizados a partir de um padrão genético direto, e mudanças genéticas ou ambientais na atividade e/ou localização de qualquer das enzimas envolvidas afetará a estrutura final do mesmo, tornando a herança de cada padrão de glicosilação abaixo de 50% (KNEZEVIC et al., 2009; ZOLDOS et al., 2012).

Devido a essa complexidade e as limitações tecnológicas para estudar o processo de glicosilação, o conhecimento da importância funcional dos carboidratos é significativamente mais atrasado que o conhecimento do DNA e das proteínas. Nos últimos anos significantes progressos foram feitos e muitos métodos de análise foram desenvolvidos (KNEZEVIC et al., 2010; RUHAAK et al., 2010), e atualmente estima-se que muitos milhares de glicanos diferentes estão ligados a proteínas humanas (RAKUS & MAHAL, 2011). Entretanto os atuais métodos disponíveis de análise fornece apenas uma visão limitada da complexidade dos glicanos (ZOLDOS et al., 2012).

Os glicanos são divididos em quatro categorias, baseadas na natureza da sua ligação e do tipo de sacarídeo encontrado, onde uma proteína ou lipídio pode apresentar um único tipo de glicosilação ou uma combinação, são eles: *N*-glicanos, *O*-glicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoesfingolipídios (GSL), sendo os dois primeiros os mais encontrados e estudados no tecido humano (MOREMEN et al., 2012).

A maioria das glicoproteínas apresentam a *N*-glicosilação, caracterizada pela união de uma cadeia oligossacarídica a uma sequência peptídica

estabelecida pela ligação de uma N-acetilglicosamina (GlcNAc) a um resíduo de asparagina. A menor sequência peptídica capaz de receber um N-glicano começa com asparagina seguida de qualquer aminoácido, exceto prolina, e termina com uma serina ou treonina (DALZIEL et al., 2014). Os N-glicanos são subdivididos com base no alongamento da sua estrutura comum, podendo ser alongado por resíduos de manose (N-glicanos do tipo *high mannose*), ramificado (N-glicanos complexos), ou pela combinação dos dois (N-glicanos híbridos) (Figura 2) (POTAPENKO et al., 2010).

Os N-glicanos têm importante papel no dobramento das proteínas, controle do ciclo celular, reconhecimento e adesão célula-célula e sinalização (DALZIEL et al., 2014). Portanto, defeitos em qualquer etapa da síntese destas glicoproteínas estão ligados a diversas doenças, entre elas câncer, defeitos na migração das células neuronais e imunes (por participar do extravasamento de leucócitos do endotélio), enfisema pulmonar e inflamações (CHRISTIANSEN et al., 2013).

Em todos os tipos de células humanas estudadas foram encontradas a expressão das enzimas glicosiltransferases responsáveis pela O-glicosilação (ppGalNAc-Ts), e essa onipresença indica um papel fundamental dessas glicoproteínas na homeostasia celular (TRAN & TEM HAGEN, 2013). Têm sido identificados diferentes tipos de O-glicosilação, sendo a mais frequente a união de um resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a serinas ou treoninas presentes no esqueleto polipeptídico por uma ligação α . Na N-acetilgalactosamina podem ser adicionados vários açúcares como galactose, N-acetilglicosamina, L-fucose ou ácido siálico, exceto resíduos de manose, glicose ou xilose (Figura 2) (HAKOMORI et al., 2012).

As O-glicoproteínas estão presentes em muitas superfícies epiteliais, incluindo o trato gastrointestinal, geniturinário e respiratório, onde protegem as superfícies epiteliais dos danos físicos e químicos e protegem contra infecção de patógenos. Modificações em sua estrutura são comumente observadas em doenças, provavelmente devido às ações de citocinas ou fatores de crescimento que influenciam o crescimento celular, diferenciação e morte celular e que alteram a expressão de genes de ppGalNAc-Ts (TRAN & TEM HAGEN, 2013).

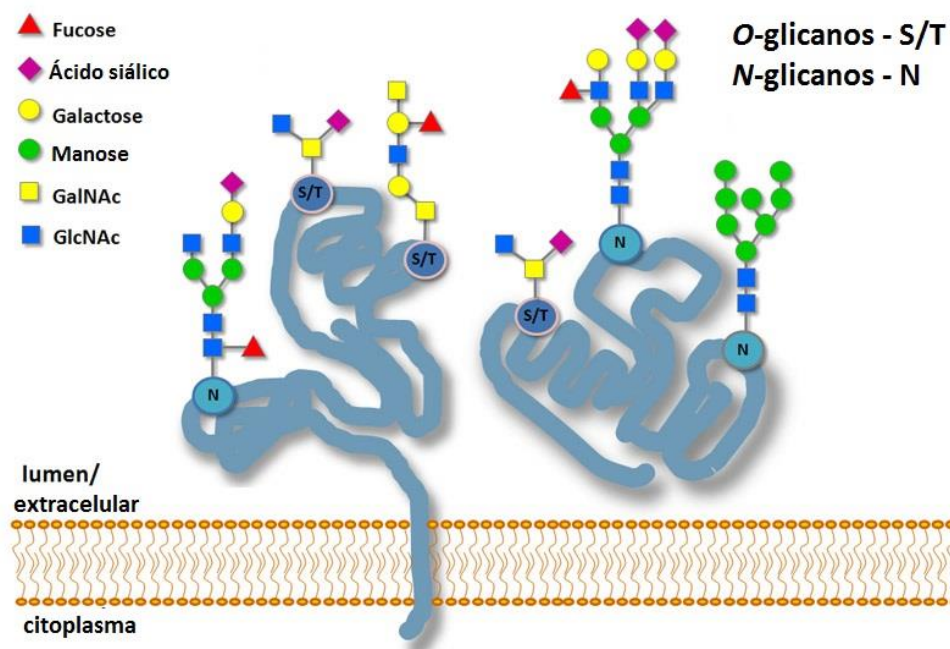


Figura 2. Representação gráfica dos tipos de ligações glicosídicas presentes nos N- e O-glicanos (Fonte: Modificado de www.neb.com, acessado em 23 de outubro de 2013).

3.2.1 Alterações da Glicosilação e o Câncer

Modificações do padrão glicosídico da superfície celular podem afetar as propriedades tanto de adesão e sinalização como modular a resposta provocada pelo sistema imune do organismo, e essas alterações estão diretamente ligadas ao processo carcinogênico. Isso tem sido demonstrado em vários cânceres e linhagens de células malignas, incluindo melanomas e câncer de mama (FERREIRA et al., 2013).

Além de auxiliar a tumorigênese, a glicosilação aberrante também está associada à malignidade, interferindo de forma negativa nas interações com células efectoras imunes, angiogênese, potencial invasor capacidade metastática das células tumorais (Figura 3) (MATTAINI & HEIDEN, 2012). Em adição, essas modificações podem ocorrer antes do processo de transformação e podem, portanto, ser de grande importância para o diagnóstico

de vários tipos de câncer. Por isso, o estudo destas modificações pós-tradução pode fornecer valiosas informações para as aplicações prognósticas e potencialmente terapêuticas (DALL'OLIO et al., 2012).

Dentro das alterações moleculares mais notórias das células cancerosas, destaca-se o aumento da exposição de resíduos de carboidratos produzidos pelas *N*- e *O*- glicosilações incompletas que, durante o alongamento da cadeia sacarídica, formam glicoconjugados truncados (REIS et al, 2010). Em adição, muitos estudos têm descrito a presença destes antígenos, presentes em mais de 90% dos carcinomas, e essa presença marcante se deve muito provavelmente a uma alteração qualitativa ou quantitativa da expressão das glicosiltransferases ou a disponibilidade de substratos acessíveis às mesmas (DRAKE et al., 2010).

Os *N*-glicanos são conhecidamente mais ramificados em células cancerosas, enquanto a biossíntese de *O*-glicanos pode ser diminuída ou aumentada dependendo da atividade de glicosiltransferases específicas. Quando aumentadas as mucinas podem ser encontradas como proteínas transmembrana ou como proteínas secretadas. Na Tabela 2 estão descritas alguns funções destes glicanos no processo carcinogênico (LOMINO et al., 2013).

No câncer de mama, o *N*-glicano fucosilado foi encontrado como um marcador potencial, mas também houve um aumento no tipo de *high mannose* nos *N*-glicanos e fucosilação em *O*-glicanos (PINHO et al., 2012; TRAN & TEM HAGEN, 2013). Em adição, Pierce e colaboradores (2010) descreveram que a combinação dos níveis de ambos glicanos foi significativamente maior em pacientes com câncer de mama linfonodos positivos comparados com os com linfonodos negativos, indicando o potencial maligno da expressão alterada destes carboidratos.

O fato de ocorrer à exposição dos antígenos truncados na superfície das células tumorais em diversos tipos de cânceres e a sua associação com um prognóstico reservado impulsionou a caracterização desses componentes glicoproteicos através da comparação do perfil carboidrático dos tecidos normais e tumorais realizados pela análise da mudança na atividade das

enzimas envolvidas na biossíntese dos glicanos durante o processo carcinogênico (MEANY & CHAN et al., 2011).

A partir das informações advindas desses estudos nasceu a possibilidade do desenvolvimento de anticorpos capazes de identificar alterações celulares e, com isso, se ter um melhor conhecimento de como se comportam as células cancerígenas de um indivíduo (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2012). Entretanto, estabelecer o quanto as mudanças na glicosilação afetam as propriedades das células tumorais requer um conhecimento mais detalhado de como os glicanos estão presentes na superfície celular, especificamente das proteínas que carregam os glicanos truncados para se descrever a adesão celular e o processo subsequente que permite a célula tumoral aderir ao endotélio vascular (ARNDT et al., 2011).

Apesar da importância da glicosilação na doença e transformação maligna ser conhecido desde a década de 60, seu papel em tais processos tem somente sido incipientemente explorado deixando o conhecimento disponível escasso e longe de ser completo (POTAPENKO et al., 2010).

As glicosiltransferases representam uma fonte promissora de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos no câncer, permitindo de forma mais precisa a distinção entre os tipos de lesão, a detecção precoce da doença bem como a prevenção de uma possível progressão e metástase do tumor. Em adição, biomarcadores exclusivos para cânceres de mama são pouco descritos, fazendo-se necessário o estudo mais aprofundado do seu processo de glicosilação (MEANY & CHAN et al., 2011).

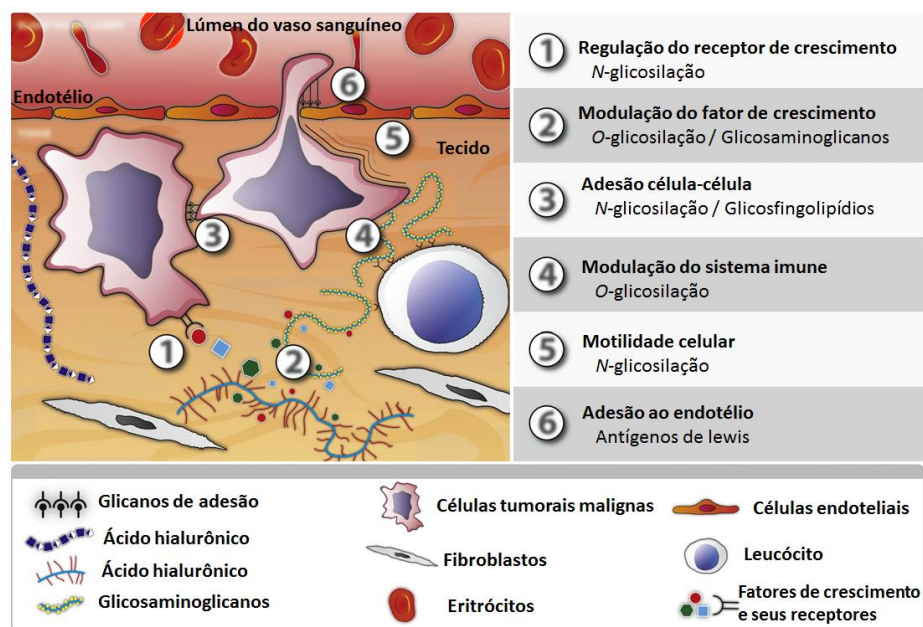


Figura 3. Importância da glicosilação durante a carcinogênese (Fonte: Modificado de POTAPENKO et al., 2010).

Tabela 2. Importância dos N- e O-glicanos na progressão tumoral (Fonte: Modificado de FUSTER & ESKO, 2005)

Carboidrato	Função proposta	Tipos de câncer	Referência
N-glicano	Supressor da apoptose	Mama e melanoma	Girnit et al., 2000; Komatsu et al., 2001
	Invasão tumoral	Mama e cólon	Granovsky et al., 2000; de Freitas Junior et al., 2011
	Metástase - Agregação tumoral	Melanoma	Takenaka et al., 2004
	Angiogênese - Migração endotelial	Próstata	Pili et al., 1995
	Crescimento e proliferação tumoral	Mama	Komatsu et al., 2001
O-glicano	Supressor da apoptose	Cólo e pâncreas	Takenaka et al., 2004
	Invasão- inibição da adesão celular	Mama, estômago e ovário	Julien, et a., 2001
	Adesão tumoral durante a metástase hematogênica	Cólon	Fuster & Esko, 2003
	Metástase - Agregação tumoral	Melanoma	Takenaka et al., 2004

3.2.2 UDP-GalNAc: polipeptídeo *N*-acetilgalactosaminil transferase (ppGalNAc-T)

É uma família de enzimas que catalisa a ligação do primeiro monossacarídeo *N*-acetilgalactosamina ao peptídeo serina ou treonina no passo inicial da *O*-glicosilação das proteínas. Essas enzimas são proteínas de membrana tipo II, caracterizadas por uma pequena porção N-terminal citoplasmática (de 4 a 24 aminoácidos), seguida por uma pequena âncora transmembrana (de 15 a 25 aminoácidos) que está ligada a um largo segmento (mais de 450 aminoácidos) no lúmen do complexo de Golgi (MEANY & CHAN, 2011).

Já foram descritas na literatura 20 tipos diferentes de ppGalNAc-T nos humanos, das quais 14 já foram funcionalmente caracterizadas (PENG et al., 2010). Alguns membros desta família exibem distintas especificidades de acordo com a sequência polipeptídica das serinas e treoninas que serão glicosiladas por um modo de operação hierárquico controlado pela presença de outros *O*-glicanos vizinhos (LI et al., 2011).

Por apresentar diferentes especificidades as enzimas apresentam um padrão de expressão diferente entre os tecidos, onde alguns membros são amplamente expressos, consideradas constitutivas (ppGalNAc-T1, -T2, -T8), enquanto outros apresentam uma distribuição mais restrita (ppGalNAc-T3 a -T7, -T9, -T10, -T11 e -T12, -T17), sendo expressos em certas células ou tecidos, associados com estados fisiológicos ou diferenciação (GERKEN et al., 2011; DING et al., 2012; TRAN et al., 2012).

Alguns membros da família parecem glicosilar preferencialmente polipeptídios nus, enquanto outros requerem uma glicosilação prévia antes de atuarem, sugerindo a possibilidade de uma regulação complexa e sutil de início do *O*-glicosilação de proteínas (GILL et al., 2011). Em adição, quando expressas no mesmo tecido, as ppGalNAc-Ts apresentam um significativo grau de sobreposição de especificidade por substratos, tornando a definição da função individual e múltipla dos genes que codificam essas enzimas um grande desafio (GERKEN et al., 2013).

Os O-glicanos encontram-se frequentemente truncados nas células tumorais da mama, diferente das células mamárias normais onde suas cadeias são expandidas. Essa glicosilação anormal se deve principalmente às alterações na expressão das ppGalNAc-Ts (DING et al., 2012). Muitos membros desta família de enzimas são encontrados em ambos tecidos, normal e tumoral (-T1, -T2, -T7, -T8, -T14). Enquanto outros se encontram exclusivamente expressos nas células carcinogênicas (-T3, -T4 e -T6) (GERKEN et al., 2011; DING et al., 2012; TRAN et al., 2012).

A observação mais interessante foi que ppGalNAc-T3 e ppGalNAc-T6 foram prontamente detectadas em todas as linhagens de células malignas, mas não na linhagem celular de mama normal. Assim, as linhagens de células derivadas a partir de fontes malignas têm um amplo perfil de ppGalNAc-T, em comparação com a linhagem celular derivada do epitélio mamário normal/benigno que foram positivas apenas para as enzimas constitutivas -T1 e -T2 (BENNET et al., 2011).

Entre as enzimas encontradas exclusivamente no câncer de mama, destaca-se a ppGalNAc-T6, a qual Brook e colaboradores (2007) relacionaram sua alta expressão a um aumento na densidade de O-glicano que possivelmente altera a conformação e acessibilidade de outras enzimas de glicosilação, interrompendo padrões de glicosilação normais.

Em adição, o aumento da regulação da ppGalNAc-T6 nas células tumorais da mama pode causar a estabilização da proteína MUC1 através da sua atividade de glicosilação. Subsequentemente, o acúmulo de MUC1 glicosilada pode induzir anormalidades nas moléculas que participam da adesão celular como β -catenina e E-caderina, resultando em um efeito antiaderente (PARK et al., 2010).

A atuação desta família de enzimas na glicosilação das proteínas vem sendo estudada nas mais diversas doenças, e uma vez que um correto padrão de glicosilação é importante para funções essencialmente alteradas no câncer, como adesão, controle da proliferação e sinalização, os estudos destas moléculas permitirá identificar possíveis biomarcadores prognósticos no câncer de mama.

3.2.3 β 1,4-N-Acetilglicosaminiltransferase III

A β 1,4-N-Acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) pertence a família das N-acetilglicosaminiltransferase (GnT) que abrange enzimas que catalisam a transferência do grupo N-acetilglicosamina (GlcNAc) do UDP-GlcNAc para o resíduo de açúcar aceitor (Manose, Galactose e N-acetilgalactosamina) na asparagina dos N-glicanos. Nos seres humanos já foram identificadas ao menos cinco GnTs, nomeadas de GnT-I a GnT-V (PINHO et al., 2012). Entre elas, destacam-se a GnT-III e GnT-V, as quais apresentaram uma atividade aumentada em vários tipos de câncer como mama (GABIUS et al., 2011), colon (FREITAS JÚNIOR et al., 2011), pâncreas (HUFFMAN et al., 2011) e próstata (LANGE et al., 2012).

A GnT-III, primeiramente descrita por Narasimhan em 1982, transfere o grupo GlcNAc para β 1,4-manose na porção central dos N-glicanos para formar a estrutura “bisecting”- β 1,4 GlcNAc (Figura 4) (TAKAMATSU et al., 2013). Atualmente esta enzima é considerada uma glicosiltransferase chave na via de biossíntese dos N-glicano, uma vez que a formação da estrutura “bisect”-GlcNAc afeta a conformação da cadeia carboidrática e após a ação da GnT-III, outras glicosiltransferases como GnT-II, GnT-IV e GnT-V não são mais capazes de atuar no glicano (TANIGUCHI & KOREKANE, 2011).

A expressão do gene de *Mgat-3*, responsável pela produção da GnT-III, é controlada de uma maneira tecido-célula e célula-específica, por essa razão a estrutura “bisect”-GlcNAc e a GnT-III têm propriedades e funções multifatoriais, variando bastante entre os diferentes tipos de tecidos e células. (TANIGUCHI & KOREKANE, 2011). O papel desta enzima na carcinogênese vem sendo descrita ao longo dos anos, e sua principal atuação ocorre no processo de adesão celular.

A N-glicosilação da E-caderina, mediada pela GnT-III, altera sua distribuição celular, e a maioria das E-caderinas glicosiladas são recrutadas para a superfície das células, onde aumentam o contato célula-célula. Em adição, a GnT-III também regula a adesão célula-matriz extracelular, através da glicosilação da integrina, e é através deste dois mecanismos que a GnT-III

desempenha um papel fundamental na supressão de metástase (PINHO et al., 2012).

A supressão da metástase mediada pela GnT-III foi descrita em diversos tipos de células tumorais encontradas no pulmão, ovários, pâncreas, pele e mama, assim como um aumento da proliferação e invasividade do tumor na ausência desta enzima (PINHO et al., 2013).

No câncer de mama a adição de estruturas “bisect”-GlcNAc-1,4 nas glicoproteínas das células tumorais participam da sinalização do fator de crescimento, reduzindo o crescimento e retardando a progressão do tumor mamário, em adição a atividade elevada da GnT-III inibe a atuação da GnT-V, uma enzima considerada prómestastática, e por esta razão a GnT-III dita é antimetastática neste tipo de câncer (HUANG et al., 2013).

É aparente que a adição de “bisect”- GlcNAc nos *N*-glicanos das glicoproteínas mamárias protege as células epiteliais da mama da progressão tumoral. Assim a perda da expressão do *Mgat3*, e a consequente diminuição da GnT-III, no câncer de mama podem ser considerados potenciais fatores preditores da progressão e invasão tumoral (SONG et al., 2010), entretanto ainda se faz necessários mais estudos para uma apurada correlação prognóstica.

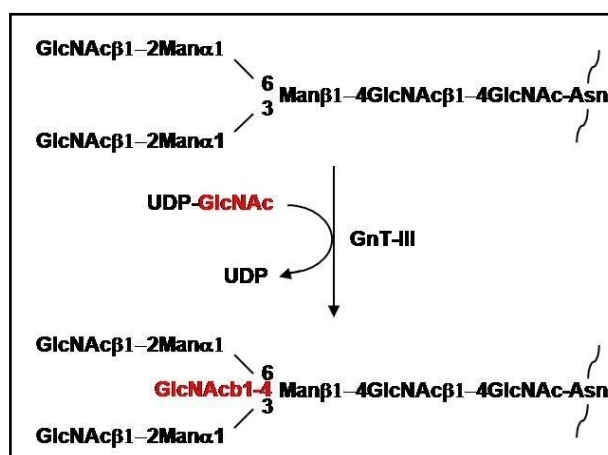


Figura 4. Atuação da enzima GnT-III durante a glicosilação dos *N*-glicanos (KOREKANE & TANIGUCHI, 2013).

3.3 Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas ubíquas que se ligam de forma específica e reversível aos diversos carboidratos celulares e estão envolvidas em inúmeros processos celulares. O estudo destas proteínas teve impulso após a publicação de Sharon e Lis em 1972, e foram inicialmente definidas como hemaglutininas. Posteriormente, foram denominadas lectinas a partir dos conhecimentos mais modernos das propriedades estruturais e funcionais destas moléculas e seus locais de ligação (YOSHIZAKI, 1990).

As superfícies celulares são ricas em glicoproteínas que interagem com lectinas, e desta interação lectina-célula dependem vários processos biológicos como reconhecimento de patógenos, interações célula-célula e célula-matriz extracelular e processos de migração e proliferação celular. Por essa razão elas são amplamente utilizadas como ferramentas de investigação, devido ao seu alto nível de especificidade aos carboidratos nos diferentes tipos celulares em ambas as condições, normal e patológica (LAM et al., 2011).

Os glicanos alterados, produzidos por uma glicosilação incorreta, são uma característica comum a uma ampla variedade de tipos de tumor (KALTNER & GABIUS, 2012). Estas superfícies de carboidratos alterados das células tumorais têm sido amplamente investigadas com o auxílio das lectinas em diversos tumores, como tumor meningotelial (BELTRÃO et al., 2003), carcinoma mucoepidermóide da glândula parótida (SOBRAL et al., 2010), câncer de pele (FERREIRA et al., 2013) e câncer de mama (VIEIRA-DE-MELLO et al., 2013).

As lectinas têm sido utilizadas em técnicas, tais como blot, citometria de fluxo e histoquímica para caracterizar o perfil carboidrático de diferentes materiais biológicos como soro, células ou tecidos tumorais. Em adição, Fry e colaboradores (2011) afirmaram que a fixação dos tecidos em formalina não tem efeitos profundos sobre a ligação das lectinas aos carboidratos, permitindo o estudo dos tumores de mama em parafina, comuns em arquivos de patologia, onde através da revelação com a peroxidase permite sua visualização nas células.

Para a avaliação do perfil carboidrático das células do CDIS, foi analisado um painel de cinco lectinas. Os carboidratos por elas reconhecidos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Especificidades das lectinas

Lectina	Carboidrato reconhecido	Referências
<i>Triticum vulgare</i> (wheat germ agglutinin, WGA)	(GlcNAc β 1-4) ₂₋₅ , Neu5Ac	PETERS et al., 1979
<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin (L-Pha)	N-linked β -1,6-GlcNAc	CUMMINGS & KORNFELD, 1982
<i>Maackia amurensis</i> II (MAL-II)	Neu5Ac α 2-3Gal/GalNAc (α -2,3-ácido siálico)	RAVINDRANATH et al., 1985
<i>Arachis hypogaea</i> (Peanut, PNA)	β -1-3-N-acetilgalactosamina	SWAMY et al., 1991
<i>Sambucus Nigra</i> (SNA)	Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc (α -2,6-ácido siálico)	WANG & CUMMINGS, 1988

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

No presente estudo foram utilizados dois grupos distintos de amostras de lesões mamárias diagnosticadas como carcinoma ductal *in situ* fixadas em parafina. No grupo 1 foram coletadas 218 lesões de CDIS do Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) entre os anos de 2000 e 2012. Os respectivos dados clínicos e histopatológicos como idade, sexo, tempo livre de doença, tratamento e variantes histológicas foram obtidas no mesmo setor. Neste mesmo grupo, as lesões foram classificadas de acordo com seu padrão de arquitetura celular como comedônica, sólida, cribriforme, papilar e micropapilar segundo Page et al. (1985) Bellamy et al. (1993). Foram excluídos do estudo os casos de CDIS associados com CDI.

O grupo 2 foi constituído por 109 amostras diagnosticadas entre 1994 a 2010 no Departamento de Patologia da Universidade de Medicina de Ribeirão Preto em São Paulo (USP), sendo 47 lesões exclusivas de CDIS e 62 lesões mistas de CDIS mais CDI. Os dados clínicos incluíram idade, status menopausal, tamanho do tumor no momento do diagnóstico, status dos receptores hormonais (RE e RP), grau nuclear e a condição multifocal.

Em ambas as populações, nenhum dos pacientes recebeu tratamento oncológico antes da biópsia.

4.2 Microarranjos Teciduais (TMA – “*Tissue Microarray*”)

Para a construção de TMA das amostras do grupo 2 foram extraídos de cada um dos 109 blocos de parafina cilindros de 1 mm de diâmetro dos fragmentos mais representativos de cada lesão. As amostras foram então dispostas em cinco novos blocos de parafina receptores, contendo 23 biópsias em cada, com a utilização do equipamento *Manual Tissue arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Posteriormente, de cada novo bloco foram cortadas secções de 3µm utilizando o sistema de transferência *Paraffin Tape-transfer System* (Instrumedics, Saint Louis, USA). Um corte de cada novo

bloco foi então corado com hematoxilina e eosina para confirmar a presença do tecido tumoral em microscópio de luz branca. A confecção dos blocos de TMA foi feita no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

4.3 Histoquímica com lectinas

As lectinas utilizadas no estudo em ambos os grupos foram: WGA (Aglutinina de Gérmen de Trigo), L-PHA (Leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), MAL-II (Lectina de *Maackia Amurensis*), SNA (Lectina de *Sambucus nigra*) e PNA (Lectina de Amendoim) todas conjugadas a biotina (Vector Laboratories Inc., EUA). As especificidades das lectinas estão descritas na tabela 3. Cortes de tecidos em parafina (4µm) do grupo 1 foram desparafinizados em xilol e reidratados em etanol seriado (100 – 70%). As amostras foram, então, tratadas com solução de tripsina a 0,1% por 15 min a 37°C e incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS (tampão fosfato 100mM pH 7,2 contendo NaCl 150mM) por 30 min a 25°C.

Para L-PHA e WGA, após a tripsina foi feito tratamento com neuraminidase de *Clostridium perfringens* 0,1 U/mL por 1h a 37°C. PBS foi utilizado para lavagens entre cada etapa (2x 5min). Na sequência os tecidos foram incubados, separadamente, com as lectinas por 2 horas a 4°C. Após lavagem com PBS as lâminas foram incubadas com o polímero streptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) por 45 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada com a diaminobenzidina (DAB) e contra-corada com hematoxilina. Os cortes foram desidratados em etanol seriado (70% – 100%) e as lâminas cobertas por lamínula com Permount (Fischer, Fairlawn, NJ). Nos controles negativos, as lectinas foram substituídas pelo tampão PBS. Para as lectinas utilizadas neste trabalho, foi utilizado o *cut-off* definido por Dosaka-Akita e colaboradores (2004), que define como negativo uma marcação <10% das células tumorais.

4.4 Imunohistoquímica

Cortes de 3 μ m foram retirados dos blocos de parafina de TMA do grupo 2. As reações imunohistoquímicas foram realizadas com o kit de detecção Mach 4 Universal HRP-*Polymer Detection* (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. A desparafinização foi realizada em xilol, seguida de reidratação em etanol seriado (100% - 70%). Em seguida os cortes foram tratados com solução 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS por 30 min e posterior recuperação antigênica com tampão citrato 10 mM, pH 6,0 em câmara a vapor por 40 min.

Após o resfriamento a 25°C por 30 min, as amostras foram incubadas em albumina de soro bovino (BSA) a 2%, lavadas com solução tris salina (TBS) pH 7,6 e incubadas com o anticorpo primário a 4°C *overnight*, as concentrações e fabricantes estão descritas na tabela 4. Após lavagens (2x 5min) com TBS, os cortes foram incubados com solução de bloqueio pós-anticorpo primário por 30 min, e incubados com o polímero streptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) por 30 min a 25 °C. A reação foi visualizada com DAB seguida de contra-coração com hematoxilina. Os cortes foram desidratados em etanol e xilol e cobertos por lamínula com Permount (Fischer, Fairlawn, NJ).

Todas as reações foram feitas com um controle negativo (substituindo-se o anticorpo primário por PBS) e com controles positivos, conforme especificação dos fabricantes. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen, Alemanha). Os cilindros de tecido nos TMAs com menos de 50% da área representativa do tumor foram desconsiderados da análise.

Foram classificadas como positivas as amostras com >1% das células tumorais marcadas nas análises do receptor de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) segundo Hammond et al. (2010). O HER-2 foi avaliado de acordo com o manual ASCO/CAP HER2 (WOLF et al., 2007) e os casos 2+ foram submetidos a hibridização *in situ* cromógena (chromogen *in situ* hybridization - CISH) segundo Oliveira-Costa et al. (2010). Apenas os casos HER-2 2+ amplificados no CISH foram considerados positivos nas análises

estatísticas. As ppGalNac-T6 e ppGalNac-T8 foram consideradas positivas quando 10% das células apresentaram marcação, independentemente do compartimento celular (KITADA et al., 2013) e a expressão da GnT-III foi classificada como positiva quando $\geq 50\%$ das células estavam marcadas e negativa quando $< 50\%$ apresentavam marcação (DOSAKA-AKITA et al., 2004).

Tabela 4. Especificações dos anticorpos

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
HER-2	TJ1	1:50	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
RE	6F11	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
RP	16	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK.
ppGalNac-6		1:200	Sigma Aldrich, USA
ppGalNac-8		1:200	Sigma Aldrich, USA
GnT-III		1:300	Sigma Aldrich, USA

4.5 Hibridização *in situ* Cromógena (CISH)

O kit ZytoDot 2C SPEC HER-2/CEN 17 (Zytovision, Bremerhaven, Germany) foi utilizado na detecção do gene humano *HER-2* e das regiões alfa-satélites do cromossomo 17 nos cortes de 3 μm de biópsias em parafina dos casos HER-2 2+. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. No kit, dois sinais verdes (HER-2) e dois vermelhos (CEN 17) foram esperados na intérfase nuclear normal. HER-2 foi considerado amplificado quando a proporção HER-2/CEN 17 foi ≥ 2 em uma média de 60 células (OLIVEIRA-COSTA et al., 2010). Apenas os casos pontuados como 2+ pela imunohistoquímica e HER-2 amplificados no CISH foram considerados positivos.

4.6 Análise de Imagens

Para a análise morfológica foi usado o sistema interativo de análise de imagens que utiliza software e câmera digital NikonTM disponível no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco. A análise semi-quantitativa das células marcadas foi feita analisando três campos aleatórios em cada amostra.

4.7 Aspectos Éticos

O presente projeto foi aprovado no Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE Nº 195/09) e pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (nº 242/2011).

4.8 Análises Estatísticas

Para a análise estatística do grupo 1 foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes para a validação dos dados. Para a relação entre a marcação das lectinas e a classificação morfológica do CDIS foi realizado o teste de Fisher.

O estudo estatístico do grupo 2 foi realizado de acordo com Santos et al. (2012), onde a marcação das células tumorais foi classificada como positivas (forte marcação positiva +3 e moderada marcação positiva +2) ou negativa (fraca marcação positiva +1 e marcação negativa 0). Os resultados foram analisados com o software PASW Statistics 19.0 (Chicago, IL, USA). A relação entre os resultados da histoquímica com lectinas, imunohistoquímica e os dados clínicos foi testada com tabelas cruzadas aplicando o qui-quadrado, para três ou mais variáveis, e o teste de Fisher, para duas variáveis.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*.



Research Article

Open Access

Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*Gabriela Souto Vieira-de-Mello^{1*}, Antônio Felix da Silva Filho^{1*}, Petra Barros dos Santos¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹ and Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2*}¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

* Both authors contributed equally

Abstract

Breast Ductal Carcinoma *in situ* (DCIS) show a high degree of architectural heterogeneity and what kind of DCIS lesions will progress to invasive disease remains unknown. Thus, its characterization remains a complex process. In addition, in the same tumor we can find different types of lesions that presented different biological behaviour and morphology. Carbohydrate expression changes play crucial roles in carcinogenesis of the breast, becoming the study these changes a useful tool for an accurate predictor. In this context, this work aimed analyzed the differential expression of specific carbohydrates among the DCIS lesion through lectin histochemistry and its correlation with its behaviors. Glycobiology expression of 218 DCIS samples of human breast cancer was investigated by MAL-II, PNA, WGA, PHA-L and SNA lectins. MAL-II was more expressed ($p=0.0191$) in cribriform (positive in 100%) than in comedo (positive in 41.2%) and solid lesions ($p=0.0440$). However, PNA profile showed a higher reactivity in comedo ($p=0.0052$) and micropapillary ($p=0.0010$) lesions when compared to solid one. The other lectins showed different expression degrees in all lesions analyzed but none was statistically relevant. Our results reveals different carbohydrate patterns concerning different DCIS morphological subtypes indicating that these lesions could act as independent biological entities.

Keywords: Ductal carcinoma *in situ*; Breast cancer; Glycobiology; Lectin histochemistry; Tumoral morphology

Introduction

Among women, breast cancer is the most common type and is the leading cause of cancer deaths in world [1]. In past few decades the mammography screening programs have design a new breast tumors profile frequency, when Ductal Carcinoma *in situ* (DCIS) stands out among them showing an increase in their occurrence due to the increase of early diagnosis. However this type of lesion is still poorly studied. The few studies available show contradictory results when compared to invasive ductal carcinoma, especially regarding to whether or not subtypes of DCIS lesions may progress to the invasive disease [2-4]. DCIS study is challenged by the presence of a high degree of architectural and morphological heterogeneity in their lesions. In this scenario their lesions are segregated into different histopathological groups classified as comedo (which often presents central necrosis and calcification), solid (presenting ducts filled by neoplastic cells where there is no necrosis), cribriform (with small holes or open spaces in ducts) and micropapillary (featuring finger-like projections) [5]. Commonly, a mix of theses lesions is found in the same tumor; however each of these histological lesion subtypes has a different prognosis [6].

In homeostasis, cells express surface proteins that undergo post-translational modifications which glycosylation stands as one of the most important event mediated by the action of glycosyltransferases. This carbohydrate profile is implicated in the regulation of several important physiological processes such as adhesion, signal transduction and biological recognition besides mediate cell-cell interactions and cell-matrix [7].

The human glycode is of particular interest in cancer research given that altered glycans, produced by an interrupted glycosylation, are a common feature of a broad variety of tumor types [7,8]. Lectin histochemistry has been used in the medical and biological areas as a tool to investigate these altered surface carbohydrates [9], in meningotheial

tumour [10], in fetal minor salivary glands [11] and parotid gland mucoepidermoid carcinoma [12]. Thus, a better understanding of the cell surface glycocode of each DCIS lesion is an initial step in identifying the reasons that lead some lesions to progress to invasive behavior. For this, the present study evaluated the expression pattern of different types of carbohydrates in DCIS subtype lesions using lectin histochemistry.

Materials and Methods

Specimens

We performed a per-lesion basis analysis of breast ductal carcinoma *in situ*. The 218 analyzed lesions were classified according to the architectural pattern as comedo, solid, cribriform and micropapillary according to Bellamy [13] and Page [14]. Samples and clinic-histopathological data were obtained from the tissue archives of Pathology Service at Hospital das Clínicas (HC) from the Federal University of Pernambuco (UFPE) after approval by Health Sciences Centre Ethics Board. Cases of DCIS associated with IDC were excluded.

Lectin histochemistry

Four micrometer thick specimens sections were deparaffinized in xylene and hydrated in graded series of alcohol (100-70%). Slices were

***Corresponding author:** Dr. Eduardo Beltrão, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, Recife, Pernambuco, 50670-490, Brazil, Fax: + 55-81-2126-8000; E-mail: ebeltrao@hotmail.com

Received July 11, 2013; Accepted July 26, 2013; Published July 30, 2013

Citation: Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB, de Melo Rêgo MJB, Beltrão EC (2013) Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*. J Cytol Histol 4: 179. doi:10.4172/2157-7099.1000179

Copyright: © 2013 Vieira-de-Mello GS, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB, de Melo Rêgo MJB, Beltrão EC (2013) Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*. J Cytol Histol 4: 179. doi:10.4172/2157-7099.1000179

treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 15 min at 37°C and with a 0.3% (v/v) methanol-H₂O₂ solution for 30 min at 25°C according to Beltrão [10]. After that, samples were incubated, separately, with the biotin conjugated lectins (*Maackia amurensis* agglutinin (MAL-II), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), Wheat germ agglutinin (WGA), *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) and *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA)-Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) at 70 µg/mL for 2 h at 4°C. For PHA-L lectin after trypsin treatment slides were incubated with a 0.1 U/mL neuraminidase solution from *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich, Missouri, USA), for 1 h at 37°C. After washes with 100mM phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2, containing 150mM NaCl, slides were incubated with streptavidin-peroxidase polymer (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 45 min at 25°C. The reaction was revealed with diaminobenzidine (DAB) and counter-stained with hematoxylin (PBS was used to prepare all solutions and as washing solution between each step). Negative controls were performed replacing the lectin for PBS. Histochemistry staining was independently analyzed by two pathologists and cases with discrepant scores were reevaluated jointly. The staining intensity was determined by previously study established by Lima [15] as the pattern observed in at least 20% of cells with cytoplasm or membrane staining in four categories: 0=no staining, 1=weak staining, 2=moderate staining and 3=intense staining. For statistical analysis, we dichotomized as negative (0 and 1+) and positive (2+ and 3+) following previously studies [16,17]. Tissue sections were examined using Olympus microscope optic Eclipse 50i (Tokyo, Japan) and an Image Analyses System (software NIS-Elements F version 2.30-Nikon, USA) was used for image acquisition.

Statistical analysis

Data analysis was performed with GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) using a p-value<0.05 as significant. The relationships between lectin staining and the DCIS morphological classification were analyzed by two-tailed Fisher Exact Test.

Results

The distribution of the lesions per lectin is showed in (Table 1). MAL-II and PNA presented a significant correlation between lectin staining and lesions subtypes. MAL-II results (Figures 1 and 2) revealed that α-2,3-sialic acid expression was increased (p=0.0191) in cribriform (positive in 100% of analyzed lesions) in comparison to comedo (positive in 41.2%) subtype, in addition, the expression of this carbohydrate also increased in cribriform compared to solid (44.4% positive samples) lesions (p=0.0440). The relationship between the staining pattern of the four subtypes of DCIS lesions and PHA-L, SNA and WGA showed no significant correlation.

Lectins	Status	Comedo	Micropapillary	Cribriform	Solid
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
PHA-L	Positive	16 (94.1)	4 (100)	6 (100)	6 (100)
	Negative	1 (5.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MAL-II	Positive	7 (41.2)	4 (100)	6 (100)	4 (44.4)
	Negative	10 (58.8)	0 (0)	0 (0)	5 (55.6)
PNA	Positive	17 (73.9)	11 (91.7)	6 (66.7)	3 (23.1)
	Negative	6 (26.1)	1 (8.3)	3 (33.3)	10 (76.9)
SNA	Positive	14 (93.3)	4 (100)	5 (83.3)	7 (87.5)
	Negative	1 (6.7)	0 (0)	1 (16.7)	1 (12.5)
WGA	Positive	17 (70.9)	6 (60)	10 (71.4)	7 (63.6)
	Negative	7 (29.1)	4 (40)	4 (28.6)	4 (36.4)

Semi-quantitative analysis of the lectin histochemistry staining to morphological subtypes of DCIS.

Table 1: Lectin histochemistry per DCIS lesions status.

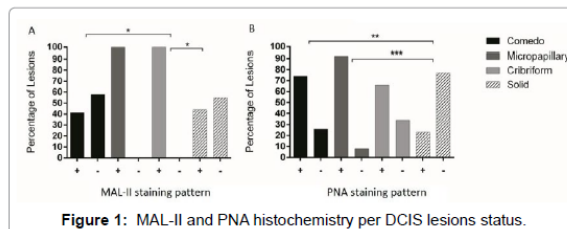


Figure 1: MAL-II and PNA histochemistry per DCIS lesions status.

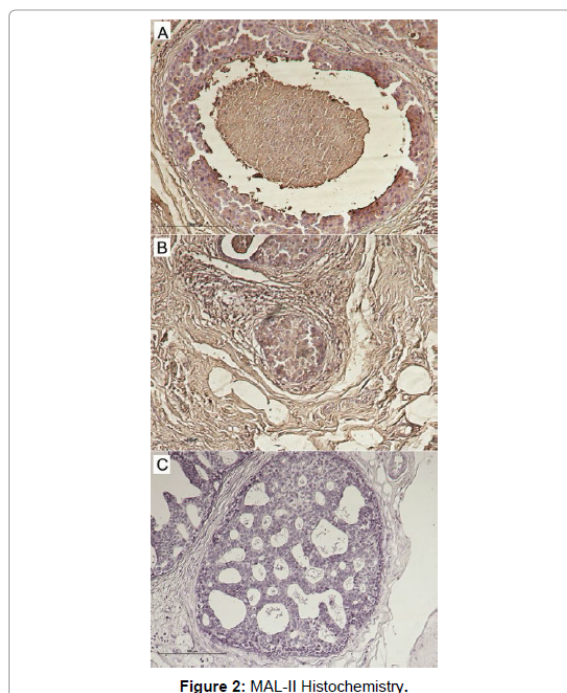


Figure 2: MAL-II Histochemistry.

The expression of β-1-3-N-acetylgalactosamine, recognized by PNA (Figure 3), was increased in both lesions comparisons, comedo (positive in 73.9%) versus solid (positive in 23.1%) with a p=0.0052 and micropapillary (positive in 91.7%) versus solid (positive in 23.1%) with a p=0.0010.

Discussion

Our results showed that different types of DCIS lesions exhibit not only a broad range of differentiation in terms of conventional histologic grades, but also a specific pattern of carbohydrate expression which may help to differentiate the subtypes in a histochemistry way. The presence of necrosis in DCIS lesions, characteristic of comedo/high-grade type, pursue a different course of evolution [18], presenting a more aggressive behavior compared with non-comedo lesions. Comedo type DCIS showed a much higher rate of short-term local recurrence and it is more histologically similar to invasive disease than is the non-comedo-type [2,19].

The comedo-type cell behavior may be related to the carbohydrate expression pattern changes found among the lesions as shown by our results. Besides individual genome alterations in cycle cell controlling

Citation: Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB, de Melo Rêgo MJB, Beltrão EC (2013) Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*. J Cytol Histol 4: 179. doi:10.4172/2157-7099.1000179

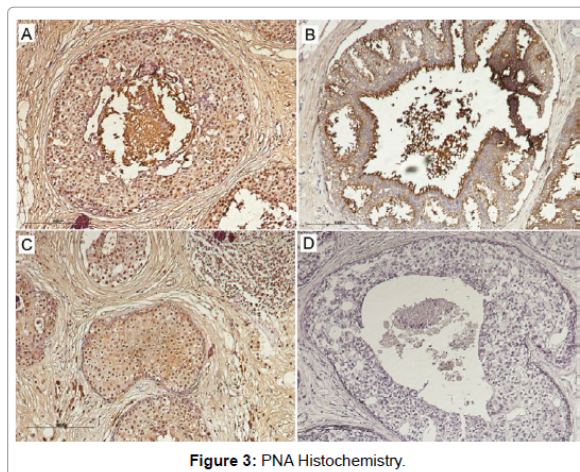


Figure 3: PNA Histochemistry.

genes glycosyltransferases and glycosylhydrolases genes, responsible for the addition and removal of sugars on proteins in the ER and Golgi apparatus, can change activity during oncogenesis, causing different oligosaccharide structures to emerge on cell surface glycoproteins [20].

Our results suggest that α -2,3-sialic acid (recognized by MAL-II) and β -1,3-N-acetylgalactosamine (recognized by PNA) expression patterns changed in response to the necrosis presence. The first carbohydrate exhibited a decrease in its expression on comedo lesions compared to cribriform lesions (non-comedo), contrasting with an increase in expression of β -1,3-N-acetylgalactosamine in comedo compared to solid lesions.

Altered sialylation is one of the most striking features of several tumors and the specific α -2,6 sialylation has most often been associated with poor prognosis, once that is directly connected with migration and invasion [21,22]. In our results α -2,3 sialylation, recognized by MAL-II, was predominant in cribriform lesions, while SNA results showed a predominance of α -2,6 sialylation in comedo and micropapillary lesions, despite the fact that presented no statistical relevance.

The results suggest that DCIS may have a prognosis when an early high degree of α -2,6 sialylation is observed. Moreover, since it is not possible to predict individually whether or not a lesion will progress to an invasive form lectin histochemistry presents that the different carbohydrate pattern found in DCIS can help to understand a possible behavior and further can help to classify the tumor as a unique entity despite the broad diagnosis of DCIS.

The altered expression of both carbohydrates recognized by PHA-L and WGA has already been shown to be involved in numerous cellular pathways as adhesion, motility, angiogenesis, and apoptosis [23]. A higher expression of these carbohydrates was observed in all subtypes of lesions.

According to Allred [18] in the majority of DCIS cases there is a gradual change from well-differentiated to poorly differentiated lesions, suggesting diversity within individual lesions at some point. Our results provide new insights into DCIS subtypes demonstrating that the different carbohydrate profile between them may help to understand the progression and relationship between benign and malignant lesions.

The present work showed that the DCIS subtypes present not only a

morphological difference but also that using lectin histochemistry these tumors present a differential carbohydrate expression. Such feature may, to some extent, suggest an individual identity, especially in the presence of necrosis. In addition, the results reinforce the importance of lectins as important scientific tools for detection of changes in phenotype of breast tumors helping to clarify the existence, or not, of a linear progression between low-grade and high-grade DCIS lesions.

Acknowledgments

Authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and to Msc. Carmelita de Lima Cavalcanti for technical assistance.

References

1. American Cancer Society (2011) Breast Cancer Facts & Figures. Atlanta: Inc, 2011.
2. Phillips LS, Millikan RC, Schroeder JC, Barnholtz-Sloan JS, Levine BJ (2009) Reproductive and hormonal risk factors for ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18: 1507-1514.
3. Zhang W, Gao EL, Zhou YL, Zhai Q, Zou ZY, et al. (2012) Different distribution of breast ductal carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ with microinvasion, and invasion breast cancer. World J Surg Oncol 10: 262.
4. Fota GL, Stepan A, Ciurea RN (2012) The evaluation of the immunoexpression of Her2-neu oncoprotein in ductal carcinoma in situ in association with invasive ductal carcinoma of the breast. Rom J Morphol Embryol 53: 805-810.
5. Provenzano E, Brown JP, Pinder SE (2013) Pathological controversies in breast cancer: classification of ductal carcinoma in situ, sentinel lymph nodes and low volume metastatic disease and reporting of neoadjuvant chemotherapy specimens. Clin Oncol (R Coll Radiol) 25: 80-92.
6. Wang SY, Shamliyan T, Virnig BA, Kane R (2011) Tumor characteristics as predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat 127: 1-14.
7. Kim YS, Kim SH, Kang JG, Ko JH (2012) Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. BMB Rep 45: 623-628.
8. Fry SA, Afrough B, Lomax-Browne HJ, Timms JF, Velentz LS, et al. (2011) Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. Glycobiology 21: 1060-1070.
9. Schnegelsberg B, Schumacher U, Valentiner U (2011) Lectin histochemistry of metastasizing and non-metastasizing breast and colon cancer cells. Anticancer Res 31:1589-97.
10. Beltrão EI, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valença MM, et al. (2003) Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. Eur J Histochem 47: 139-142.
11. Rêgo MJB, Cavalcanti CLB, Beltrão EIC, Sobral APV (2011) Histochemical localization of carbohydrates in morphological stages of developing human minor salivary glands: a comparative study with cytoskeletal markers. Int J Morphol 29:604-13.
12. Sobral AP, Rego MJ, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EI (2010) ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucocystic carcinoma. J Oral Sci 52: 49-54.
13. Bellamy CO, McDonald C, Salter DM, Chetty U, Anderson TJ (1993) Noninvasive ductal carcinoma of the breast: the relevance of histologic categorization. Hum Pathol 24: 16-23.
14. Page DL, Anderson TJ, Rogers LW (1987) Carcinoma in situ. In: Page DL, Anderson TJ (eds) Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, pp 157-92.
15. de Lima AL, Cavalcanti CC, Silva MC, Paiva PM, Coelho LC, et al. (2010) Histochemical evaluation of human prostatic tissues with Cratylia mollis seed lectin. J Biomed Biotechnol 2010: 179817.
16. dos Santos PB, Zanetti JS, Ribeiro-Silva A, Beltrão EI (2012) Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. Diagn Pathol 7: 104.

Citation: Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB, de Melo Rêgo MJB, Beltrão EC (2013) Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*. J Cytol Histol 4: 179. doi:[10.4172/2157-7099.1000179](https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000179)

Page 4 of 4

17. Petricevic B, Vrbancic D, Jakic-Razumovic J, Brcic I, Rabic D, et al. (2012) Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. Med Oncol 29: 486-494.
18. Allred DC, Wu Y, Mao S, Nagtegaal ID, Lee S, et al. (2008) Ductal carcinoma in situ and the emergence of diversity during breast cancer evolution. Clin Cancer Res 14: 370-378.
19. Yagata H, Harigaya K, Suzuki M, Nagashima T, Hashimoto H, et al. (2003) Comedonecrosis is an unfavorable marker in node-negative invasive breast carcinoma. Pathol Int 53: 501-506.
20. Virmig BA, Tuttle TM, Shamlivan T, Kane RL (2010) Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. J Natl Cancer Inst 102: 170-178.
21. Chen G, Zou Q, Yang Z (2010) [Expression of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin and its clinicopathological significance in benign and malignant lesions of breast]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 35: 584-589.
22. Swindall AF, Bellis SL (2011) Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. J Biol Chem 286:22982-22990.
23. Handerson T, Pawelek JM (2003) Beta1,6-branched oligosaccharides and coarse vesicles: a common, pervasive phenotype in melanoma and other human cancers. Cancer Res 63: 5363-5369.

Citation: Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB, de Melo Rêgo MJB, Beltrão EC (2013) Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma *in situ*. J Cytol Histol 4: 179. doi:[10.4172/2157-7099.1000179](https://doi.org/10.4172/2157-7099.1000179)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 20,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submission>

5.2 Artigo 2: *Maackia amurensis* Lectin II Predicts Prognostic in Ductal Carcinoma of the Breast (a ser submetido à revista Acta Histochemica et Cytochemica)

***Maackia amurensis* LECTIN II PREDICTS PROGNOSTIC IN DUCTAL
CARCINOMA OF THE BREAST**

Gabriela Souto Vieira-de-Mello¹, Antônio Felix da Silva Filho¹, Petra Barros dos Santos¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo², Alfredo Ribeiro-Silva³, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2*}.

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

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

3. Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

*Corresponding author: Eduardo Beltrão, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami–LIKA/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, Recife, Pernambuco, 50670-910, Brazil, Fax: + 55-81-2126-8000; E-mail: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

The glycode participates in tumorigenesis, increasing the malignancy. Among the major changes in the carbohydrates expression, the sialic acid alterations have been associated with a poor prognosis in several types of tumors. Around 70% of all ductal carcinomas are invasive; however the modifications that lead the *in situ* to invasive form remains unclear. This work aimed to evaluate the correlation between the two main sialic acid linkages (α 2,3 and α 2,6) as prognostic factors in pure lesion of ductal carcinomas *in situ* (DCIS) and mixed lesion with invasive component (IDC). Histochemistry with *Maackia amurensis* II (MAL-II, specific to α 2,3 sialic acid) and *Sambucus nigra* (SNA, specific to α 2,6 sialic acid) were used to evaluate 47 samples of pure DCIS and 62 samples of DCIS/IDC). MAL-II showed that in pure DCIS α 2,3 sialic acid linkage inversely correlates with ER and PR ($p=0.015$ and $p=0.024$, respectively) and is highly expressed in tumor >5 cm ($p=0.01$) while in the mixed lesion MAL-II is inversely correlated with HER-2 expression. Residues of α 2,6 sialic acid not correlated to any prognostic factors investigated. Results presented a differential expression of α 2,3 sialic acid among the prognostic factors, indicating its importance as DCIS biomarkers for poor prognostics.

Key-words: DCIS, *Maackia amurensis*, sialic acid, biomarker, prognosis.

INTRODUCTION

Ductal carcinoma is the most frequent breast cancer type and therefore, currently the most known, nevertheless its progression remains elusive. Ductal carcinoma *in situ* (DCIS) is a pre-invasive lesion that represents 20% of all ductal carcinomas of the breast [29], and despite the fact that it is considered an intermediate step in the development of invasive ductal carcinoma (IDC), the specific factors that lead this type of lesion to malignancy is not well ascertained or accepted [33].

Aberrant expression of carbohydrate profile on cell surface has been associated with several pathologies, and tumor development stands out among them [30; 14]. In homeostasis, the proteins found on cell surface undergo covalent addition of a wide spectrum of saccharides, a process termed glycosylation, ending in the formation of heterogeneous complex glycans. This glycode is responsible for a large number of very important cell functions such as adhesion, signal transduction, biological recognition, cell-cell and cell-matrix interactions [17].

In tumorigenesis, the aberrant glycosylation results in a shorter glycan chains or an over-expression of outer part of the carbohydrate moiety of glycoproteins that are normally absent or scarce [13]. Among the altered carbohydrates found in cancer, an increase of sialylated structures on cell surface is commonly observed in carcinoma cells. The relationship between the pattern of sialylation on membrane glycoconjugates and the potential of invasion and metastasis have been reported in many types of tumors, including colon, skin, stomach and breast [36; 35; 11; 32].

Sialic acid residues has the ability to bind to galactose residues through α 2,3 or α 2,6-linkage or linked to galactosamine or N-acetylgalactosamine ones via α 2,6-linkage. In normal cells they play a role on carbohydrate binding proteins such as lectins, hormones, antibodies and inorganic cations [27; 18]. On the other hand, the majority of studies associate the high levels of sialylation, in particular α 2,3-linked sialic acids, with invasion and metastasis, since this particular carbohydrate mediated platelet aggregation and adhesion to endothelial cells and extracellular matrix components [16; 36; 17].

In cancer breast, as well as other types of tumors, hypersialylation is the result of modifications in the expression of genes encoding sialyltransferases, being associated with poor prognosis, increased adhesion, migration, invasion and reduced overall survival of the patients [5; 6]. Despite the several studies molecular markers in DCIS that indicates a potential progression to invasive form [1; 25] the role of the sialic acid in the progression of breast cancer remains undefined.

Lectin histochemistry with *Maackia amurensis* agglutinin (MAL-II) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) which recognizes α 2-3 and 2-6 sialic acid linked residues, respectively, we evaluated a possible association between the acid sialic expression and the potential malignity of DCIS through their correlations with established tumor prognostic factors in pure DCIS cases and mixed cases (DCIS tumors with IDC).

MATERIALS AND METHODS

Tumor samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded samples of pure DCIS (n=47) and DCIS with IDC (n=62) diagnosed between 1994 to 2010, were randomly retrieved from the Department of Pathology of Ribeirão Preto Medical School at São Paulo University (USP). Clinical included age, menopausal status, tumor size, hormone receptors status, nuclear grade and tumor multifocal status. Patients were selected based on their histopathologic diagnosis and for each case diagnosis slides (Hematoxylin and Eosin) were reviewed by an independent pathologist. None of the patients received any oncologic treatment before the biopsy procedure. Protocols used in this study were in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee.

Tissue microarray (TMA)

DCISs and DCIS-IDC TMAs were constructed with 1-mm diameter core biopsies of 109 donor paraffin blocks and arrayed using the *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). TMAs slices (3µm) were cut using a Paraffin Tape-transfer System (Instrumedics, Saint Louis, USA). Haematoxylin and Eosin staining was used to confirm tumor integrity in TMAs by light microscopy. TMA spots containing less than 50% of tumor were removed from the analysis.

Immunohistochemistry

TMA sections (3µm) were immune stained with the Mach 4 Universal Polymer Detection kit (Biocare Medical, CA, USA) according to Ribeiro-Silva et al. [24] and Santos et al. [26]. Antibodies (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) dilutions are as follows: ER (1:100, clone 6 F11), PR (1:100, clone 16) and HER-2 (1:100, clone CB11). DCIS cases previously known to be positive for ER, PR and HER-2 were used as positive controls for each reaction. The reaction was revealed with diaminobenzidine (DAB) followed by hematoxylin counterstaining. Negative controls were prepared omitting the primary antibody.

Lectin Histochemistry

Maackia amurensis agglutinin (MAL-II, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) conjugated to biotin were used in this study. TMA sections (3µm) were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol (100-70%) incubated with a 0.3% hydrogen peroxide solution for 30 minutes at 25°C and treated with a 0.1% trypsin solution for 15 min at 37°C.

After trypsin treatment slices were incubated with 2% BSA (bovine serum albumin) solution and then incubated, separately, with the lectins solutions (20µg/mL) overnight at 4°C. Slices were then incubated with streptavidin-peroxidase polymer (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 45 min at 25°C. Phosphate buffer solution (PBS) 100mM pH 7.4 was used for slice washes between each protocol step. Lectin staining was revealed with a DAB followed

by hematoxylin counterstaining. Negative controls were prepared replacing the lectin by PBS.

Immuno and lectin histochemistry evaluation

In immunohistochemistry ER and PR were positive for >1% of cancer cells [15]. HER-2 status was evaluated according to the ASCO/CAP HER2 Guideline [37] and cases as 2+ were submitted to chromogenic *in situ* hybridization (CISH) according to Oliveira-Costa et al. [22]. Only HER-2 2+ cases in immunohistochemistry amplified on CISH were considered positive for statistical purposes. Lectin histochemistry were considered negative for <10%, moderate for 10% to 30% and intense for >30% of neoplastic cells according Dosaka-akita et al. [8]. All staining score were evaluated using light microscopy.

Chromogenic *in situ* hybridization (CISH)

Positive (2+) immunohistochemistry HER-2 cases were also evaluated by CISH. The ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe kit (Zytovision, Bremerhaven, Germany) was used for the detection of the human HER-2 gene and alpha-satellites of chromosome 17. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions where two green (HER-2) and two red (CEN 17) signals were expected in a normal interphase nucleus. HER-2 was considered amplified when the HER-2/CEN 17 ratio was ≥ 2 on average for 60 cells. Only cases scored as 2+ by immunohistochemistry in which the HER-2 was amplified on CISH analysis were considered positive.

Statistical methods

Statistical analysis we carried out according to Santos et al. [26] where the results were presented as positive (strong positive staining 3+ and moderately positive staining 2+) or negative (weak positive 1+ and negative staining 0) for tumor cells. Tests were performed with PASW Statistics 19.0 software (Chicago, IL, USA). The relationships among immunohistochemistry and lectin histochemistry findings and clinico-histopathologic features were tested with cross tables applying the χ^2 (three or more variables) or Fisher tests (2 variables). All tests were 2-tailed.

RESULTS

Relationship between the MAL-II and SNA staining with clinic-histopathological features and routine immunohistochemical markers in breast DCIS lesions

Among the 47 selected cases of DCIS 25 were included of statistical analyses. Twenty two cases were excluded due the absence of at least one of the results. The average age of patients included in the study was 55 year-old (range 31–83 years).

The expression of MAL-II (Figure 1) was correlated with tumor size ($p=0.01$) being its expression associated with 5cm larger tumors. The absence of multifocal tumors was correlated with positive staining of MAL-II ($p=0.037$). In addition, the hormonal status of ER and PR positives were inversely correlated with MAL-II presence ($p=0.015$ and $p=0.024$, respectively). The other clinic-histopathologic features such as age, menstrual status, nuclear grade, presence of comedo lesions and HER2 showed no significant correlation with MAL-II staining. SNA staining presented no correlation with all analyzed aspects (Table 1).

Relationship between the MAL-II and SNA staining with clinicopathological features and immunohistochemical markers in DCIS plus IDC lesions

The mixed DCIS and IDC samples 62 cases were analyzed but only 42 were included in MAL-II statistical analyses, and 41 in SNA analyses due to exclusion criterion. The average age of patients included in both groups was 50 year-old (range 24–75 years).

MAL-II staining was correlated with ER and HER-2 biomarkers ($p=0.045$ and 0.038 , respectively) where in both cases a decreasing expression of $\alpha 2,3$ sialic acid residues (recognized by MAL-II) accompanied a positive staining of these two biomarkers (Table 2). SNA staining showed no correlation with all studied aspects in DCIS population (Figure 2).

DISCUSSION

Studies in the glycobiology have allowed comprehensive comparisons of glycans and glycoproteins in different stages of carcinogenesis, and the identification of differential expression of these cancer-associated molecules provides an opportunity to discover new biomarkers for cancer prognosis, diagnosis and treatment [7].

Sialylation is associated with the addition of shorter glycans, and type of carbohydrate linkage is commonly found in breast carcinogenesis, resulting in an overexpression of sialylated antigens at the surface of breast cancer cells [31]. Sialic acid residues expression and poor prognosis have been associated with tumor cell migration and invasion in many types of cancer, including, skin, pancreatic and breast [23; 11; 32].

Lectins have been used in scientific studies as well as diagnostic purposes. This broad application is mainly due to high and specific ability of these (glyco)proteins to bind selectively to carbohydrate in glycoconjugates, making them differentiating probes in pathology as auxiliary diagnostic tool [11; 21; 26]. Our results in lectin histochemistry of TMA showed the presence of the two main sialic acid linkage, α 2,3 and α 2,6, in both analyzed population of DCIS of the breast, pure DCIS and DCIS with IDC component, exclusively in cancer cells, being absent in the stroma.

The expression of sialic acid has been associated with tumor malignity, increasing the tumor cell migration and invasion in several types of cancers, including invasive breast cancer [11; 26]. In accordance to this, our work showed that this carbohydrate is also associated with poor prognostic not only

in DCIS with IDC component but also in pure ductal carcinoma of the breast. In addition, throughout the tumoral progression, the main molecular changes occurs during the normal to DCIS transition [10], suggesting a possible role of this carbohydrate in the early stages of the malign carcinogenic process and turning the expression of sialic acid an important indicator of malignancy in ductal carcinomas.

The sialic acid is bound through different types of linkages, being the most important the $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$. Our results show that the histochemical profile of the $\alpha 2,3$ linkage (recognized by MAL-II) in ductal carcinomas showed a high correlation with a well-established prognostic factors as tumor size ($p=0.01$), estrogen ($p=0.015$) and progesterone receptors ($p=0.024$), HER-2 ($p=0.038$) and multifocal tumors ($p=0.037$), being its expression related with a poor prognostic (Table 2).

Estrogen and progesterone hormones and their respective receptors ER and PR, play important roles in carcinogens, and along with HER-2, they participate in tumor development and progression [28]. The presence of ER is a stronger prognostic factor than PR, since 70% of IDC are positive for ER, indicating that this hormone contributes to tumor growth [12]. PR is considered a slightly less important predictor of tumor growth and more than 70% of ER+ tumors are also PR+, becoming its presence connected with the expression of the former [9] mainly in DCIS pure lesions as shown in our results.

The loss of estrogen receptor correlates with a more aggressive stage of disease [3] where previous studies revealed that the tumorigenic epithelial cells in the breast duct overlying a focally disrupted myoepithelial cell layer have lost their response to anti-estrogen drugs because they no longer express the ER,

contributing to their higher potential for aggressiveness and invasion [19; 20; 34]. Therefore, the search for new markers for breast cancer progression from ER+ to ER- lesions it will help to predict a more accurate prognostic and might reveal possible biomarkers for pro- and pre-aggressive breast cancer stages.

In this context, our results confirms the aggressiveness of the tumor with the ER lost, since this loss is associated with increased expression of the sialic acid α 2,3-linked, leading not only to a lack of response to hormonal therapy but also with greater invasiveness and migration potential where the presence of this carbohydrate is an important feature. Thus, the association between ER and α 2,3-linked sialic acid expression allows the proposition that the MAL-II is a potential probe for this sialic acid linkage as a biomarkers for DCIS prognostic.

The TNM classification has been used as indicator in the search for glycoproteins that indicates the tumor malignity and Cui et al [6] suggested that high levels of α 2,3-sialic acid residues was closely associated with lymph node metastasis and invasive depth in breast cancer patients. In TMN classification, tumors that have size greater than 5 cm are considered of poor prognostic [2], and based on this fact, our results show that this factor is closely linked with the high expression of α 2,3-linked sialic acid in tumors larger than 5 cm.

Although DCIS is considered a precursor for IDC [4] the reported incidence of accompanying DCIS in IDC is not clearly understood. Our results showed a clear difference regarding the correlation between the classic prognostic factors and MAL-II histochemistry in pure DCIS and DCIS with IDC component giving support to the idea that the alteration of sialic acid expression is an important landmark of this progression.

CONCLUSIONS

Our results strongly suggest that the expression of MAL-II-reactive carbohydrate antigens may contribute to a higher malign DCIS of the breast and increase the invasiveness potential. Such carbohydrates might ultimately serve as viable prognostic markers for early stage breast cancer (or IDC precursors). However, the elucidation of their role in biology and patho-physiology of the disease, which needs further research on much larger sample size, precedes such efforts.

ACKNOWLEDGMENT

Authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) for financial support; CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for scholarship and financial support; and Deisy Mara da Silva for technical assistance.

REFERENCES

1. Al-Abbadi, M. A., Washington, T. A., Saleh, H. A., Tekyi-Mensah, S. E., Lucas, D. R. and Briston, C.A. (2006) Differential expression of HER-2/NEU receptor of invasive mammary carcinoma between Caucasian and African American patients in the Detroit metropolitan area. Correlation with overall survival and other prognostic factors. *Breast Cancer Res. Treat.* 97; 3-8.
2. American Joint Committee on Cancer (AJCC) (2002). Cancer staging manual 6th ed.
3. Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, m. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C., Heikkila, P., Nevanlinna, H., Akslen, L. A., Bégin, L. R., Foulkes, W. D., Couch, F. J., Wang, X., Cafourek, V., Olson, J. E., Baglietto, L., Giles, G. G., Severi, G., McLean, C. A., Southey, M. C., Rakha, E., Green, A. R., Ellis, I. O., Sherman, M. E., Lissowska, J., Anderson, W. F., Cox, A., Cross, S. S., Reed, M. W. R., Provenzano, E., Dawson, S., Dunning, A. M., Humphreys, M., Easton, D. F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P. D. and Huntsman, D. (2010) Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*. 7; e1000279.

4. Cakir, A., Gonul, I. and Uluoglu, O. (2012) A comprehensive morphological study for basal-like breast carcinomas with comparison to non basal-like carcinomas. *Diagnostic Pathol.* 7; 145.
5. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M. A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S. and Delannoy P. (2010) Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carboh. Res.* 345; 1377-1383.
6. Cui, H., Lin, Y., Yue, L., Zhao, X. and Liu, J. (2011) Differential expression of the α 2,3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. *Oncol. Reports.* 25; 1365-1371.
7. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M. and Chiricolo, M. (2012). Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *Front. Biosci.* 17; 670-699.
8. Dosaka-Akita, H., Miyoshi, E., Suzuki, O., Itoh, T., Katoh, H. and Taniguchi, N. (2004). Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.* 10; 1773-1779.
9. Eisenberg, A. L. A. and Koifman, S. (2001). Câncer de mama: marcadores tumorais. *Rev. Bras. Cancerol.* 47; 377-88.

10. Ernster, V.L., Ballard-Barbash, R., Barlow, W. E., Zheng, Y., Weaver, D. L., Cutter, G., Yankaskas, B. C., Rosenberg, R., Carney, P. A., Kerlikowske, K., Taplin, S. H., Urban, N., Espina, V. and Liotta, L. A. (2011). What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? *Nat. Rev. Cancer* 11; 68–75.

11. Ferreira, S. A., Vasconcelos, J. L. A., Cavalcanti, C. L. B., Rêgo, M. J. M. B. and Beltrão, E. I. C. (2013). Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. *Medical mol. Morphol.* 46; 198-202.

12. Fillmore, C. M., Gupta, P. B., Rudnick, J. A., Caballero, S., Keller, P. J., Lander, E. S. and Kuperwasser, C. (2010). Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *PNAS*. 107; 21737-21742.

13. Fry, S. A., Afrough, B., Lomax-Browne, H. J., Timms, J.F., Velentzis, L.S. and Leathem, A. J. C. (2011) Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. *Glycobiol.* 21; 1060–1070.

14. Hakomori, S. I. and Cummings, R. D. (2012). Glycosylation effects on cancer development. *Glycoconjugate J.* 1-2.

15. Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K.L., Badye, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D.

G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F. C. G., Taube, S., Torlakovic, E. E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R. B., Wittliff, J. L. and Wolff, A. C. (2010) American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 28; 2784–95.

16. Kaneko, M., Kato, Y., Kunita, A., Fujita, N., Tsuruo, T. and Osawa, M. (2004) Functional sialylated O-glycan to platelet aggregation on Aggrus (T1a/Podoplanin) molecules expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem*. 279; 38838–38843.

17. Kim, Y., Kim, S., Kang, J. and Ko, J. (2012) Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB Reports*. 45; 623-28.

18. López-Morales, D., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Zenteno, E. and Vallejo-Ruiz, V. (2010) Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagn. Pathol*. 5; 74–78.

19. Man, Y. G. and Sang, Q. X. A (2004) The significance of focal myoepithelial cell layer disruptions in human breast tumor invasion: a paradigm shift from the "protease-centered" hypothesis. *Expl. Cell Res*. 301; 103-18.

20. Man, Y. G., Shekitka, K. M.; Bratthauer, G. L. and Tavassoli, F. A. (2002) Immunohistochemical and genetic alterations in mammary epithelial cells immediately overlying focally disrupted myoepithelial cell layers. Breast Cancer Res. Treat. 76; S143-S143.

21. Melo-Júnior, M. R., Lima-Neto, R. G., Lacerda, A. M. and Beltrão, E. I. C (2011). Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis. Mycopathol. 171; 403–409.

22. Oliveira-Costa, J. P., Zanetti, J. S., Oliveira, L. R., Soares, F. A., Ramalho, L. Z., Silva Ramalho, F., Garcia, S. B. and Ribeiro-Silva, A. (2010) Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. Hum. Pathol. 41; 1624–30.

23. Perez-Garay, M., Arteta, B., Pages, L., de Llorens, R., de Bolos, C., Vidal-Vanaclocha, F. and Peracaula, R. (2010) α 2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo. PLoS One. 5; e12524.

24. Ribeiro-Silva, A., Moutinho, M. A. H., Moura, B., Vale, F. R. and Zucoloto, S. (2006). Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. Histol. Histopathol. 21; 373-82.

25. Roos, M. A., de Bock, G. H., de Vries, J., van der Vegt, B. and Wesseling, J. (2007). p53 overexpression is a predictor of local recurrence after treatment for both in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. J. Surg. Res. 140; 109-114.
26. Santos, P. B., Zanetti, J. S., Silva, A. R. and Beltrão, E. I. C. (2012). Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. Diagn. Pathol. 7; 104.
27. Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 19; 507-514.
28. Semaan, S. M., Wang, X., Marshall, A. G. and Sang, Q. A. (2012). Identification of Potential Glycoprotein Biomarkers in Estrogen Receptor Positive (ER+) and negative (ER-) human breast cancer tissues by LC-LTQ/FT-ICR mass spectrometry. J. Cancer. 3; 269-284.
29. Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. Cancer J. Clin. 62; 10-29.
30. Suzuki, H., Kiryluk, K., Novak, J., Moldoveanu, Z., Herr, A. B., Renfrow, M. B., Wyatt, R. J., Scolari, F., Mestecky, J., Gharavi, A. G. and Julian, B. A. (2011). The pathophysiology of IgA nephropathy. J. Am. Society of Nephrol. 22; 1795-1803.

31. Tian, Y., Esteva, F. J., Song, J. and Zhang, H. (2012). Altered expression of sialylated glycoproteins in breast cancer using hydrazide chemistry and mass spectrometry. Mol. Cel. Proteomics 11; 2012.
32. Vieira-de-Mello, G. S., da Silva Filho, A. F., dos Santos, P. B., de Melo Rêgo, M. J. B. and Beltrão, E. I. C. (2013). Lectin histochemistry reveals changes in carbohydrate expression on morphological types of breast ductal carcinoma *in situ*. J. Cytol. Histol.
33. Virnig, B. A., Tuttle, T. M., Shamliyan, T. and Kane, R. L. (2010). Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. J. Natl. Cancer Inst. 102; 170–178.
34. Yousefi, M., Mattu, R., Gao, C. L., Man, Y. G. (2005). Mammary ducts with and without focal myoepithelial cell layer disruptions show a different frequency of white blood cell infiltration and growth pattern: Implications for tumor progression and invasion. Appl. Immunohisto. M. M. 13; 30-7.
35. Wang, F. L.; Cui, S. X.; Sun, L. P.; Qu, X. J., Xie, Y. Y., Zhou, L., Mu, Y. L., Tang, W. and Wang, Y. S. (2009). High expression of α 2, 3-linked sialic acid residues is associated with the metastatic potential of human gastric cancer. Cancer Detec. Prev. 32; 437–443.
36. Wang, P. H. (2005). Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferase, J. Cancer Mol. 1; 73–81.

37. Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H, van de Vijver, M., Wheeler, T. M and Hayes, D. F. (2007). American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch. Pathol. Lab. Med. 131; 18–43.

TABLES

Table 1. Relationship between MAL-II and SNA staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesions

Clinico-histopathologic Features	MAL-II ⁻ n (%)	MAL-II ⁺ n (%)	<i>p</i> value	SNA ⁻ n (%)	SNA ⁺ n (%)	<i>p</i> value
Age (years)						
<50	9 (36)	3 (12)	0.96 ^a	10 (40)	2 (8)	0.363 ^a
>50	13 (52)	0 (0)		9 (36)	4 (16)	
Menstrual Status						
Pre-menopausal	9 (36)	3 (12)	0.96 ^a	10 (40)	2 (8)	0.363 ^a
Post-menopausal	13 (52)	0 (0)		9 (36)	4 (16)	
Tumor Size (cm)						
<2.0	7 (28)	0 (0)	0.01 ^b	7 (28)	0 (0)	0.154 ^b
2.0-5.0	13 (52)	0 (0)		8 (32)	5 (20)	
>5.0	2 (8)	3 (12)		4 (16)	1 (4)	
Nuclear Grade						
Low	7 (28)	0 (0)	0.383 ^b	5 (20)	2 (8)	0.697 ^b
Intermediate	2 (8)	0 (0)		2 (8)	0 (0)	
High	13 (52)	3 (12)		12 (48)	4 (16)	
Multifocal						
Yes	16 (64)	0 (0)	0.037 ^a	13 (52)	3 (12)	0.363 ^a
No	6 (24)	3 (12)		6 (24)	3 (12)	
Comedo lesions (+)						
Yes	16 (64)	3 (12)	0.421 ^a	14 (56)	5 (20)	0.547 ^a
No	6 (24)	0 (0)		5 (20)	1 (4)	
ER						
Negative	4 (16)	3 (12)	0.015 ^a	5 (20)	2 (8)	0.557 ^a
Positive	18 (72)	0 (0)		14 (56)	4 (16)	
PR						
Negative	5 (20)	3 (12)	0.024 ^a	5 (20)	3 (12)	0.274 ^a
Positive	17 (68)	0 (0)		14 (56)	3 (12)	
HER-2						
Negative	5 (20)	0 (0)	0.496 ^a	5 (20)	2 (8)	0.557 ^a
Positive	17 (68)	3 (12)		14 (56)	4 (16)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 2. Relationship between MAL-II staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS plus IDC lesions.

Clinico-histopathologic Features	MAL-II ⁻ n (%)	MAL-II ⁺ n (%)	P-value	SNA ⁻ n (%)	SNA ⁺ n (%)	P-value
Age (years)						
<50	13 (31)	7 (16.7)	0.188 ^a	14 (34.1)	5 (12.2)	0.148 ^a
>50	18 (42.8)	4 (9.5)		20 (48.8)	2 (4.9)	
Menopausal Status						
Pre-menopausal	13 (31)	7 (16.7)	0.188 ^a	14 (34.1)	5 (12.2)	0.148 ^a
Post-menopausal	18 (42.8)	4 (9.5)		20 (48.8)	2 (4.9)	
Size (cm)						
<20	11 (26.2)	4 (9.5)	0.344 ^b	11 (26.8)	4 (9.8)	0.371 ^b
20-50	15 (35.7)	7 (16.7)		19 (46.3)	3 (7.3)	
>50	5 (11.9)	0 (0)		4 (9.8)	0 (0)	
Nuclear Grade						
Low	2 (4.8)	2 (4.8)	0.430 ^b	2 (4.9)	2 (4.9)	0.115 ^b
Intermediate	6 (14.3)	1 (2.4)		6 (14.6)	0 (0)	
High	23 (54.7)	8 (19)		26 (63.4)	5 (12.2)	
Multifocal						
Yes	20 (47.6)	6 (14.3)	0.407 ^a	22 (53.6)	3 (7.3)	0.254 ^a
No	11 (26.2)	5 (11.9)		12 (29.3)	4 (9.8)	
Comedo Lesion +						
Yes	19 (45.2)	8 (19)	0.384 ^a	21 (51.2)	5 (12.2)	0.490 ^a
No	12 (28.6)	3 (7.2)		13 (31.7)	2 (4.9)	
ER						
Negative	9 (21.4)	0 (0)	0.045^a	9 (21.9)	0 (0)	0.150 ^a
Positive	22 (52.4)	11(26.2)		25 (61)	7 (17.1)	
PR						
Negative	9 (21.4)	3 (7.2)	0.618 ^a	11 (26.8)	1 (2.6)	0.323 ^a
Positive	22 (52.4)	8 (19)		23 (56)	6 (14.6)	
HER-2						
Negative	14 (34.1)	9 (21.9)	0.038^a	17 (41.4)	6 (14.6)	0.092 ^a
Positive	17 (39.1)	2 (4.9)		17 (41.4)	1 (2.6)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

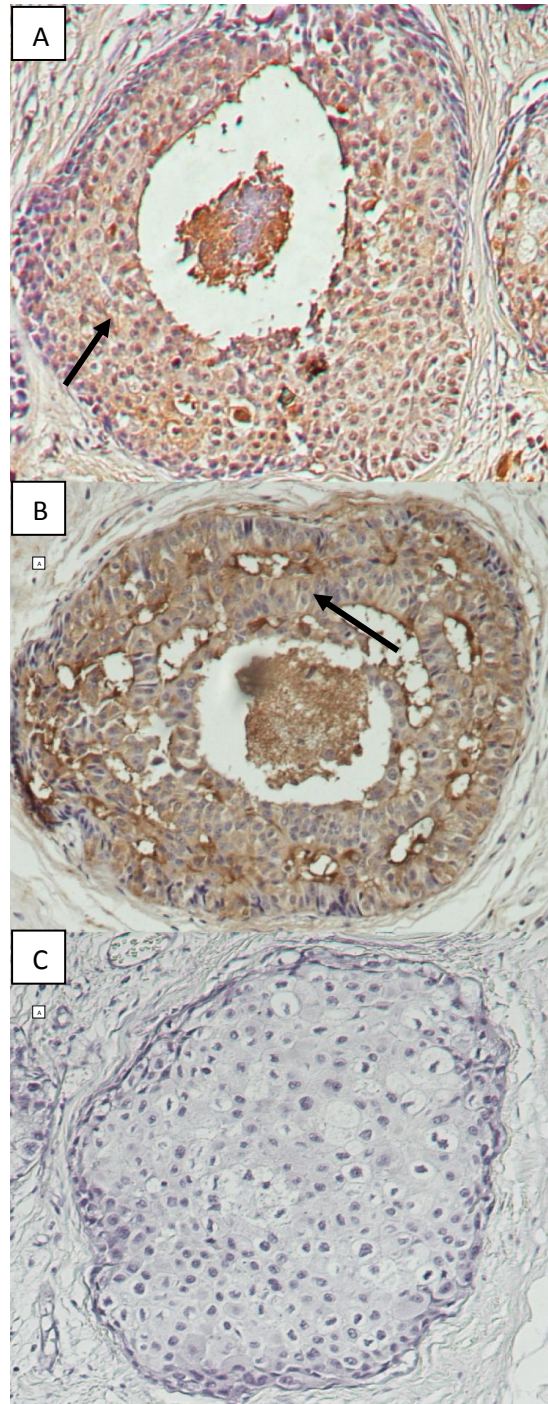
FIGURES

Figure 1. Lectin histochemistry of DCIS lesions (100X). (A) MAL-II staining pattern. (B) SNA staining pattern. (C) Negative control (black arrows indicates positive cells).

5.3 Artigo 3: Glycobiologic Aspects of the Breast Cancer: An Immunohistochemistry and Lectin Histochemistry Approach of Ductal Carcinoma *in situ* (a ser submetido à revista Folia Histochemica et Cytobiologica)

**GLYCOBIOLOGYC ASPECTS OF THE BREAST CANCER: AN
IMUNOHISTOCHEMISTRY AND LECTIN HISTOCHEMISTRY
APPROACH OF DUCTAL CARCINOMA *in situ***

Gabriela Souto Vieira-de-Mello¹, Antônio Felix da Silva Filho¹, Petra Barros dos Santos¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^{1,2}, Alfredo Ribeiro-Silva³, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2*}.

1. Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

2. Department of Biochemistry, Biology Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

3. Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil

*Corresponding author: Eduardo Beltrão, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami–LIKA/UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, Recife, Pernambuco, 50670-910, Brazil, Fax: + 55-81-2126-8000; E-mail: ebeltrao@hotmail.com

ABSTRACT

The specific glycobiology profile of morphological variations of breast cancer represents an excellent field for the identification of molecules which differential expression provides valuable information related to tumor biology. This process is implied by several alterations that occur in tumor cells derived from an impaired glycosylation driven by abnormal expressions of glycosyltransferases. To provide a comprehensive significance of the differential carbohydrate expression in ductal carcinoma of the breast this study aimed to analyze the correlation among the expression of the enzymes ppGalNAc-T6, -T8, N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III), lectin histochemistry with PHA-L, WGA and PNA and clinic-histopathological factors related to breast cancer. Formalin-fixed and paraffin-embedded samples (n=109) of pure ductal carcinoma *in situ* (DCIS, n=47) and DCIS with invasive ductal carcinoma (IDC) components (n=62) were analyzed. In pure DCIS samples GnT-III was over-expressed in comedo lesion ($p = 0.007$) while ppGalNAc-T8 directly correlated with premenopausal patients ($p=0.037$). In samples of DCIS with IDC component GnT-III expression was statistically associated with high nuclear grade tumors ($p = 0.039$) while the presence of the target carbohydrates for PHA-L and WGA were inversely related to HER-2 expression ($p=0.001$; $p=0.036$, respectively). In addition the PHA-L presented a high expression in premenopausal patients ($p=0.047$). Expression analysis of ppGalNAc-T6 and PNA staining showed no significant association with all parameters. These findings contribute to the understanding of the glycode of cell surface glycoconjugates in DCIS and allow to infer the involvement of GnT-III, ppGalNAc-T8, PHA-L and WGA as targets in the prognostic determination in DCIS tumors.

Key-words: Glycosyltransferases, glycode, lectins, breast cancer.

INTRODUCION

In both, developed and developing countries, breast cancer presents itself as the most incident malignant neoplasm in women around the world [1], and its progression is influenced by risk factors such as age, family history, late menopause, or by tumor clinical features as nuclear grade, hormonal status and morphological subtyping [2;3].

Ductal carcinomas of the breast are the most frequent morphological type and can occur as *in situ* (DCIS) and/or invasive (IDC) forms. The first can be defined as a proliferation of neoplastic epithelial cells enclosed in the mammary duct while the second is characterized by the tumor cells invasion phenomenon [4]. Although the *in situ* tumor may be considered as an initial step for the development of the invasive tumor, both lesions represent distinct prognostic factors [5], where patients early diagnosed with DCIS have a longer survival rate than those early IDC diagnosed [6].

In tumor progression various aspects of cell biology are altered, including the synthesis and/or processing of glycoproteins on the cell surface [7]. Currently, post-transcriptional and post-translational modifications of proteins and lipids have been constant targets of research due to its influences on the normal and pathological cell function [8]. Various enzymes, as kinases are involved in these changes, being glycosylation of proteins one of the most abundant modifications [9]. The altered activity of glycosyltransferases and glycosidases promotes the rearrangement of various abnormal glycoconjugates favoring tumor progression, including the breast cancer [10].

The study of glycobiology universe began by monomeric carbohydrate identification and analysis of polysaccharide chains composition, however the scientific advances led to the discovery of meaningful participation of *N*- and *O*-glycans on cell biology functions such as adhesion [11], signaling [12], migration [13] and endocytosis [14]. The glycans are ordered in sequence by glycosyltransferases which act as the anabolic component in glycobiology context, allowing the synthesis of molecules which may serve as potential biomarkers [7].

The main type of human O-glycosylation is mediated by the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts), responsible for the first catalysis the addition of GalNAc to the hydroxyl groups of serine or threonine residues in protein structures. The catalytic products of this enzyme are involved in several physiological and pathological conditions, such as signaling, host-pathogen interactions, cell differentiation, migration, tumor invasion and metastasis [15].

The *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) is considered a key glycosyltransferase in *N*-glycan biosynthetic pathway since the introduction of the bisecting GlcNAc residue precludes further processing and elongation of *N*-glycans catalyzed by GnT-V, suppressing the formation of β 1,6-GlcNAc branching structures [16].

The altered expression of members of glycosyltransferase family is a common feature of many types of cancer as well as the abnormal carbohydrates profile in tumor cells. These cancer unique glycode has been investigated by lectin histochemistry, since these (glyco)proteins have saccharide-binding sites that can recognize and specifically and reversibly bind their specific glycol moiety in glycoconjugates [17].

There is a vast need for discovery of new biomarkers that can help in the prognosis and diagnosis, and consequently provide subsidies for therapy sorting of the different breast cancer forms [18]. Face to this context, this study aimed to identify the glycosyltransferases ppGalNAc-T6 and -T8, GnT-III and evaluate the lectins WGA, PNA and PHA-L as glycoprobes in breast cancer context. Then, with the help of immunohistochemical and lectin histochemical techniques intends to find molecules that are significantly associated with progression of *in situ* and invasive ductal carcinoma.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Formalin-fixed paraffin embedded samples of pure DCIS (n=47) and DCIS with IDC component (n=62) diagnosed from 1994 to 2010 were randomly chosen from the Department of Pathology of Ribeirão Preto Medical School at São Paulo University (USP). The clinical data of these patients were retrieved from medical files, and included age, menopausal status, tumor size, hormone receptors status (ER and PR), nuclear grade and tumor multifocal status. Patients were selected based on their histopathologic diagnosis and for each case diagnosis slides (Hematoxylin and Eosin) were reviewed by an independent pathologist. None of the patients received any oncology treatment before the biopsy procedure. Protocols used in this study were in accordance with the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the local Ethics Committee.

Tissue microarray (TMA)

For the construction of TMAs blocks, core biopsies of 1-mm diameter were punched from the selected regions of each 109 donor paraffin blocks and arrayed into a new paraffin block using the *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Silver Spring, USA) and were arrayed into three-micrometer-thick sections cut from the TMA paraffin block using a paraffin tape-transfer system (Instrumedics, Saint Louis, USA). One section of each was stained with hematoxylin and eosin to confirm the presence of the tumor by light microscopy. TMA spots containing less than 50% of tumor were removed from the analysis.

Immunohistochemistry

TMAs sections (3 μ m) were immune stained with the Mach 4 Universal Polymer Detection kit (Biocare Medical, CA, USA) according to Ribeiro-Silva et al. [19] and Santos et al. [20]. The dilution and clone specification of the primary

antibodies used in this study are in Table 1. DCIS cases previously known to be positive for ER, PR, HER-2, ppGalNac-T6, -8 and GnT-III were used as positive controls for each reaction. The reaction was revealed with diaminobenzidine (DAB) followed by hematoxylin counterstaining. Negative controls were prepared omitting the primary antibody.

Lectin Histochemistry

Phaseolus vulgaris agglutinin (PHA-L; specific for β 1,6-N-acetylglucosamine); Wheat germ agglutinin (WGA; specific for N-acetylglucosamine) and Peanut agglutinin lectin (PNA; specific for β -1-3-N-acetylgalactosamine) conjugated to biotin were used in this study (Table 1). TMAs sections (3 μ m) were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded ethanol (100-70%), incubated with a 0.3% hydrogen peroxide solution for 30 minutes at 25°C and treated with a 0.1% trypsin solution for 15 min at 37°C for PNA analysis.

For PHA-L and WGA, after trypsin treatment, sections were also treated with a neuroaminidase solution (0.1 U/mL) from *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich, Missouri, USA), for 1 hour at 37°C. After enzymes treatment slices were incubated with 5% BSA (bovine serum albumin) solution and then incubated, separately, with the lectins solutions (20 μ g/mL) overnight at 4°C. After that slices were incubated with streptavidin-peroxidase polymer (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 45 min at 25°C. Phosphate buffer solution (PBS) 100mM pH 7.4 was used for slice washes between each protocol step. Lectin staining was revealed with DAB followed by hematoxylin counterstaining. Negative controls were prepared replacing the lectin by PBS.

Immuno and histochemistry evaluation

In immunohistochemistry Estrogen and Progesterone Receptors (ER and PR) were positive for >1% of cancer cells [21]. HER-2 status was evaluated according to the ASCO/CAP HER2 Guideline [22] and cases as 2+ were submitted to chromogenic *in situ* hybridization (CISH) according to Oliveira-Costa et al. [23]. Only HER-2 2+ cases in immunohistochemistry amplified on CISH were considered positive for statistical purposes. Lectin histochemistry were considered negative for <10%, moderate for 10% to 30% and intense for >30% of neoplastic cells [24]. ppGalNAc-T6 and T8 expressions were classified as positive when >10% of cancer cells were stained [25]. GnT-III expression was classified as high or low ($\geq 50\%$ was positive and $< 50\%$ was negative) [24]. All staining score were evaluated using light microscopy.

Chromogenic in situ hybridization (CISH)

Positive (2+) immunohistochemistry HER-2 cases were also evaluated by CISH. The ZytoDot 2C SPEC HER2/CEN 17 probe kit (Zytovision, Bremerhaven, Germany) was used for the detection of the human HER-2 gene and alpha-satellites of chromosome 17. All procedures were performed step by step according to the manufacturer's instructions. Using this kit, two green (HER-2) and two red (CEN 17) signals were expected in a normal interphase nucleus. HER-2 was considered amplified when the HER-2/CEN 17 ratio was ≥ 2 on average for 60 cells. Only cases scored as 2+ by immunohistochemistry in which the HER-2 was amplified on CISH analysis were considered positive.

Statistical methods

Statistical analysis we carried out according to Santos et al. [20] where the results were presented as positive (strong positive staining 3+ and moderately positive staining 2+) or negative (weak positive 1+ and negative staining 0) for tumor cells. Tests were performed with PASW Statistics 19.0

software (Chicago, IL, USA). The relationships among immunohistochemistry and lectin histochemistry findings and clinic-histopathologic features were tested with cross tables applying the χ^2 (three or more variables) or Fisher tests (2 variables). All tests were 2-tailed.

RESULTS

Clinical parameters were associated with the glycosyltransferases and lectins staining in both groups (DCIS and DCIS with IDC component).

Glycosyltransferases and carbohydrates expression and their relationship with clinical factors in samples of pure DCIS.

The evaluation of glycosyltransferases and carbohydrate expression in pure DCIS (Table 2 and 3) revealed a strong association between the expression of GnT-III and ppGAlNAc-T8 with the presence of comedo subtype and menopausal status, respectively, where 16 out of 18 GnT-III positive cases presented comedo subtype ($p=0.007$). While 18 out of 29 ppGAlNAc-T8 positive samples belonged to premenopausal patients ($p=0.037$).

ppGAlNAc-T6 had no correlation with the markers used in this analysis. The same pattern was observed for PHA-L, WGA and PNA histochemistry that showed no significant association with clinic-histopathological factors (Table 4).

Glycosyltransferases and carbohydrates expression and their relationship with clinical factors in samples of DCIS with IDC component.

GnT-III expression was associated with tumor nuclear grade, in 31 in 33 cases, classified as high nuclear grade, showed positivity for GnT-III ($p=0.039$; Table 6). However, ppGAlNAc-T6 and -T8 showed no correlation to nuclear grade (Table 5).

The presence of the target carbohydrate for PHA-L and WGA (specific for β 1,6-N-acetylglucosamine and N-acetylglucosamine, respectively) was correlated to HER-2 expression (Table 7). For PHA-L the absence of staining is associated with HER-2 positive and vice-versa where 17 of 28 PHA-L negative cases being were positive for HER-2 ($p=0.001$). This profile was also found for WGA where 14 WGA positives samples were HER-2 negative ($p=0.036$) (Table 2). In addition, an increased expression of β 1,6-N-acetylglucosamine residues (recognized by PHA-L) was found in premenopausal patients samples ($p=0.047$)

DISCUSSION

The pathological evolution history of breast cancer is made up of stages already established, ranging from exacerbated cell proliferation, through the *in situ* carcinomas to invasive carcinomas until high probable metastasis [26]. Each of these differentiation and maturation stages is characterized by a specific molecular profile, which can exhibit wide and specific changes in molecular function and organization [27]. Thus the present study provides important information regarding the cell glycobiology in distinct morphological types of ductal carcinoma of the breast.

Glycosylation is an important post-transcriptional and post-translational modification regulated indirectly through the gene expression [28]. Nevertheless, several evidences suggest that changes in cell glycobiology profile induced by oncogenic or suppressor genes transformation are one of the main factors involved in tumor progression to malignancy [29]. Therefore, the differential glycosylation can be defined as a cancer hallmark and leads to altered expression of enzymes including glycosyltransferases [30].

Inside the family of the six glycosyltransferases stands out N-acetylglucosaminiltransferase III for its association with lower malignancy tumors [13]. The results in this study pointed the controversy association between the n-III expression and the comedo subtype presence in pure DCIS samples and the high nuclear grade in mixed lesion. While the GnT-III is linked

to a good prognostic through the promotion of the synthesis and addition of binary residues of GlcNAc that alters the N-glycans composition and conformation, preventing the action of GnT-V commonly associated with metastasis [31], the presence of necrosis, characteristic of comedo subtype, is often related with a more aggressive behavior with a higher rate of short-term local recurrence [32;33].

DCIS of the breast is considered a set of lesions with different malignant potential [34] and the significant expression of GnT-III, that occur only in pure DCIS samples containing comedonic lesions, indicates that the protective role of GnT-III is exclusively to suppress metastasis, not avoiding recurrence. The lack of studies that investigate the direct relationship between the GnT-III expression and the morphological subtypes of DCIS prevents advance inferences about the issue but raised several hypotheses that need further studies.

GnT-III and GnT-V have generally a dual role; while GnT-III and its bisecting GlcNAc structures act as metastases suppressors, GnT-V and its β 1,6 GlcNAc branching structures are associated with increased metastasis. In invasive tumors the GnT-V expression overlaps GnT-III action, giving the tumor a more aggressive behavior [16]. This fact may explain the correlation of GnT-III with high nuclear grade only in DCIS lesion with invasive components.

Another important group of glycosyltransferases are the UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAc-Ts), which are responsible for the initial stages of O-glycosylation-carrying monomers [15]. The modification of the ppGalNAc-T activity can lead to truncated or high glycosylated structures formation, which in turn may favor the breast cancer progression [35].

Member of this enzyme family differ in their tissue expression, enzymatic substrate specificity, and isoforms different of ppGalNAc-T1, -T2 and -T10, which are the most widely expressed, have a more restricted expression profile [36]. In agreement with that both ppGalNAc-Ts (-T6 and -T8) analyzed here showed different results; only the ppGalNAc-T8 presented a significant correlation with tumors from pre-menopausal patients.

The association of ppGalNAc-Ts and prognostic factors has been already described in breast cancer, as for ppGalNAc-T14 associated with histological grading [37]. However no information was presented regarding ppGalNAc-T8. Here we first described this correlation, placing the ppGalNAc-T8 expression directly associated with premenopausal status, allowing us to suggest that this enzyme as a useful biomarker for DCIS breast cancer.

An alternative to study the carbohydrate moiety modulated by glycosyltransferases is the lectin histochemistry [17]. In this scenario a possible altered glycosylation regarding β 1,6-N-acetylglucosamine, β 1,4-N-acetylglucosamine and β -1-3-N-acetylgalactosamine residues and the clinic-histopathological factors was evaluated using PHA-L, WGA and PNA lectins, respectively.

In our results residues of β -1-3-N-acetylgalactosamine presented no correlation with all analyzed clinic-histopathological parameters in both population, pure DCIS and DCIS with invasive component. In the other hand WGA and PHA-L staining was inversely correlated to the expression of HER-2 in DCIS with IDC component. Overexpression of this receptor leads to signal transduction prolongation through biochemical pathways which favor tumor development through the proliferation, cell cycle activation [38] and escape from apoptosis [39].

Also using lectin histochemistry Handerson et al [40] observed that a greater expression of β 1,6-N-acetylglucosamine were directly associated with breast carcinoma nodal metastasis, in addition this carbohydrate was also associated with GnT-V activity, increasing the tumor malignancy [10]. In agreement with those facts, in our results the β 1,6-GlcNAc expression was mainly present in tumors from younger women, in who tumor generally exhibit high aggressiveness [41].

PHA-L staining revealed a dualistic aspect of tumor glycobiology being altered depending on the context in which the tumor is inserted. As indicated by Abbott et al [42], *N*-glycosylation promoted by GnT-V, and recognized by PHA-L, is necessary for the final configuration of various proteins in mammary carcinomas, and can be directly involved in cancer progression.

Although breast cancer glycode has been exceedingly investigated, several gaps and important questions still need to be elucidated, mainly regarding de DCIS. This work brings to light features of the unique environment of this tumor and contributes to understanding the molecular mechanisms that underlies aberrant glycosylation in breast carcinogenesis, highlighting the potential of ppGalNAc-T8 as prognostic biomarker.

CONCLUSION

Our results present a potential role of β 1,6-N-acetylglucosamine, N-acetylglucosamine and β -1-3-N-acetylgalactosamine residues and the glycosyltransferases ppGalNAc-T6, ppGalNAc-T8 and GnT-III as biomarkers in the tumor environment. Through our results was possible to observe that the GnT-III association with comedo morphological subtype in pure DCIS, and its relation with high nuclear grade tumors, function as an aggressive (poor) prognostic factor. Also ppGalNAc-T8 expression was correlated to premenopausal status. Besides that PHA-L positivity was correlated to younger patients while its negativity was to HER-2 positive revealing the multifunctionality of cell surface carbohydrate profile changes. Therefore, this work has contributed to widen the knowledge in glycobiology of breast neoplastic phenotype plasticity.

ACKNOWLEDGMENT

Authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) for financial support; CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for scholarship and financial support and Deisy Mara da Silva for technical assistance.

REFERENCES

1. Victorino VJ, Campos FC, Herrera ACSA et al. Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumor Biol.* 2013;54:1-10.
2. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: A pooled analysis from the breast cancer Association Consortium Studies. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:250–263.
3. Butt S, Harlid S, Borgquist S et al. Genetic predisposition, parity, age at first childbirth and risk for breast cancer. *BMC Res Notes.* 2012;5:414-425.
4. Song Y, Liu X, Zhang G et al. Unique clinicopathological features of metaplastic breast carcinoma compared with invasive ductal carcinoma and poor prognostic indicators. *World J Surg Oncol.* 2013;11:129-138.
5. Wei Z, Er-li G, Yi-li Z et al. Different distribution of breast ductal carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ with microinvasion, and invasion breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2012;10:262.
6. Liu Y, Pérez M, Schootman M et al. A longitudinal study of factors associated with perceived risk of recurrence in women with ductal carcinoma in situ and early stage invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124:835–844.
7. Kar G, Gursoy A, Keskin O et al. Human Cancer Protein-Protein Interaction Network: A Structural Perspective. *PLoS Comp Biol.*, 2009;12: e1000601.

8. Triantafyllou A, Fletcher D, Scott J et al. Glycosylations in demilunar and central acinar cells of the submandibular salivary gland of ferret investigated by lectin histochemistry. *Arch Oral Biol*. 2004; 49:697-703.
9. Yang X, Liu S, Yan Q. Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cell Death Dis*, 2013;4:735-744.
10. Li M, Song L, Qin X et al. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *J Biosci*, 2010;35: 665–673.
11. Kariya Y, Gu J. N-Glycosylation of $\beta 4$ Integrin Controls the Adhesion and Motility of Keratinocytes. *PLoS One*. 2011; 6:e27084.
12. Kim Y, Park J, Lee H et al. TGF- β sensitivity is determined by N-linked glycosylation of the type II TGF- β receptor. *Biochem J*. 2012;445:403–411.
13. Xu Q, Isaji T, Lu Y et al. Roles of N-Acetylglucosaminyltransferase III in Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in Epithelial Cell Lines. *J Biol Chem*. 2012;287: 16563–16574.
14. Guo H, Johnson H, Randolph M et al. Knockdown of GnT-Va expression inhibits ligand-induced downregulation of the epidermal growth factor receptor and intracellular signaling by inhibiting receptor endocytosis. *Glycobiol*. 2009;19:547–559.
15. Beaman E, Brooks SA. The extended ppGalNAc-T family and their functional involvement in the metastatic cascade. *Histol Histopathol*. 2013.

16. Pinho SS, Oliveira P, Cabral J et al. Loss and recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation is a mechanism involved in epithelial-mesenchymal-epithelial transitions. *PloS one*. 2012;7:e33191.
17. Andrade CG, Cabral Filho PE, Tenório DP et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *Intern J Nanomedicine*. 2013;8:4623.
18. Cazet A, Julien S, Bobowski M et al. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12:204-217.
19. Ribeiro-Silva A, Moutinho MAH, Moura B et al. Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. *Histol Histopathol*. 2006;21:373-82.
20. Santos PB, Zanetti JS, Silva AR et al. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagn Pathol*. 2012;7:104.
21. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2784–95.
22. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131:18–43.

23. Oliveira-Costa JP, Zanetti JS, Oliveira LR et al. Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. *Hum Pathol*. 2010;41:1624–30.
24. Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Suzuki O et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1773-1779.
25. Kitada S, Yamada S, Kuma A et al. Polypeptide Nacetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2013;23:472-481.
26. Geiger T, Madden SF, Gallagher WM, Cox J, Mann M. Proteomic portrait of human breast cancer progression identifies novel prognostic markers. *Cancer Res*. 2012;72:2428-2439, 2012.
27. Park S, Koo JS, Kim MS et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21:50-57.
28. Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abraham JL, Packer NH. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*. 2013.
29. Hu M, Yao J, Carroll DK et al. Regulation of In Situ to Invasive Breast Carcinoma Transition. *Cancer Cell*. 2008;13:394–406.
30. Lange T, Samatov TR, Tonevitsky AG Schumacer U. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydr Res*. 2014.

31. Pinho SS, Figueiredo J, Cabral J et al. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Bioch et Biophy Acta*. 2013;1830:2690-2700.
32. Vieira-de-Mello GS, da Silva Filho AF, dos Santos PB et al. Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma in situ. *J Cytol Histol*. 2013;1-4.
33. Ozkan-Gurdal S, Cabioglu N, Ozcinar B et al. Factors Predicting Microinvasion in Ductal Carcinoma in situ. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:55-60.
34. Duggal S, Robin J, Julian TB et al. Ductal carcinoma in situ: an overview. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13:955-62.
35. Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. Changes in mucin-type O-linked glycosylation in cancer. *Changes*. 2013;23:20-33.
36. Raman J, Guan Y, Perrine CL et al. UDP-N-Acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: Completion of the Family Tree. *Glycobiol*. 2012;22:768-777.
37. Wu C, Guo X, Wang W et al. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *BMC Cancer*. 2010;10:123.

38. Steven A, Leisz S, Massa C et al. HER-2/neu mediates oncogenic transformation via altered CREB expression and function. *Mol Cancer Res.* 2013;11:1462-77.
39. Aranda V, Haire T, Nolan ME et al. MuthuswamyPar6–aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1235–45.
40. Handerson T, Camp R, Harigopal M et al. β 1, 6-Branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2969-2973.
41. Shannona C, Smithb IE. Breast cancer in adolescents and young women. *Eur J Cancer.* 2003;39:2632-2642.
42. Abbott KL, Aoki K, Lim JM et al. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *J of Proteome Res.* 2008;7:1470-1480.

TABELS

Table 1: Histological markers, lectins and immunohistochemistry reagents.

Antibody/ Lectin	Dilution/ Concentration	Clone/ Source	Manufacturer
GnT-III	1:50	Polyclonal	Sigma-Aldrich, USA
ppGalNAc-T8	1:50	Polyclonal	Sigma-Aldrich, USA
ppGalNAc-T6	1:50	Polyclonal	Sigma-Aldrich, USA
ER	1:100	6F11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
PR	1:100	16	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
HER-2	1:100	CB11	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
PNA	20µg/ml	Peanut	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
WGA	20 µg/ml	Wheat germ	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
PHA-L	20 µg/ml	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Vector Labs, Burlingame, CA, USA

Table 2. Relationship between ppGalNAc-T6 and –T8 expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.

Clinico-histopathologic Features	ppGalNAc-T6 ⁻ n (%)	ppGalNAc-T6 ⁺ n (%)	p value	ppGalNAc-T8 ⁻ n (%)	ppGalNAc-T8 ⁺ n (%)	p value
Age (years)						
<50	13 (54.2)	7 (50)	0.535 ^a	3 (25)	17 (58.6)	0.052 ^a
>50	11 (45.8)	7 (50)		9 (75)	12 (41.4)	
Menopausal Status						
Pre-menopausal	14 (58.3)	7 (50)	0.435 ^a	3 (25)	18 (62.1)	0.034^a
Post-menopausal	10 (41.7)	7 (50)		9 (75)	11 (37.9)	
Tumor Size (cm)						
<2.0	10 (41.7)	5 (35.7)	0.930 ^b	5 (41.7)	12 (41.4)	0.284 ^b
2.0-5.0	9 (37.5)	6 (42.9)		3 (25)	13 (44.8)	
>5.0	5 (20.8)	3 (21.4)		4 (33.3)	4 (13.8)	
Nuclear Grade						
Low	4 (16.7)	5 (35.7)	0.206 ^b	4 (33.3)	4 (13.8)	0.250 ^b
Intermediate	3 (12.5)	0 (0)		2 (16.7)	3 (10.3)	
High	17 (70.8)	9 (64.3)		6 (50)	22 (75.9)	
Multifocal						
Yes	12 (50)	9 (64.3)	0.304 ^a	7 (58.3)	17 (58.6)	0.626 ^a
No	12 (50)	5 (35.7)		5 (41.7)	12 (41.4)	
Comedo lesions						
Yes	16 (66.6)	10 (71.4)	0.528 ^a	7 (58.3)	21 (72.4)	0.300 ^a
No	8 (33.3)	4 (28.6)		5 (41.7)	8 (27.6)	
ER						
Negative	7 (31.8)	5 (35.7)	0.544 ^a	4 (36.4)	9 (32.1)	0.542 ^a
Positive	15 (68.2)	9 (64.3)		7 (63.6)	19 (67.9)	
PR						
Negative	5 (27.8)	7 (53.8)	0.137 ^a	2 (20)	10 (41.7)	0.211 ^a
Positive	13 (72.2)	6 (46.2)		8 (80)	14 (58.3)	
HER-2						
Negative	3 (30)	1 (10)	0.291 ^a	2 (33.3)	3 (18.8)	0.419 ^a
Positive	7 (70)	9 (90)		4 (66.6)	13 (81.3)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 3. Relationship between GnT-III expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.

Clinico-histopathologic Features	GnT-III ⁻ n (%)	GnT-III ⁺ n (%)	<i>p</i> value
Age (years)			
<50	6 (37.5)	12 (66.7)	0.087 ^a
>50	10 (62.5)	6 (33.3)	
Menopausal Status			
Pre-menopausal	6 (37.5)	12 (66.7)	0.087 ^a
Post-menopausal	10 (62.5)	6 (33.3)	
Tumor Size (cm)			
<2.0	8 (50)	4 (22.2)	0.222 ^b
2.0-5.0	5 (31.3)	10 (55.6)	
>5.0	3 (18.8)	4 (22.2)	
Nuclear Grade			
Low	4 (25)	4 (22.2)	0.063 ^b
Intermediate	4 (25)	0 (0)	
High	8 (50)	14 (77.8)	
Multifocal			
Yes	8 (50)	12 (66.7)	0.262 ^a
No	8 (50)	6 (33.3)	
Comedo lesions			
Yes	7 (43.8)	16 (88.9)	0.007 ^a
No	9 (56.3)	2 (11.1)	
ER			
Negative	3 (18.8)	7 (41.2)	0.154 ^a
Positive	13 (81.3)	10 (58.8)	
PR			
Negative	2 (16.7)	8 (50)	0.076 ^a
Positive	10 (83.3)	8 (50)	
HER-2			
Negative	3 (42.9)	1 (7.7)	0.101 ^a
Positive	4 (57.1)	12 (92.3)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 4. Relationship between lectin staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in pure DCIS lesions.

Clinico-pathologic Features	PHA-L ⁻ n (%)	PHA-L ⁺ n (%)	<i>p</i> value	WGA ⁻ n (%)	WGA ⁺ n (%)	<i>p</i> value	PNA ⁻ n (%)	PNA ⁺ n (%)	<i>p</i> value
Age (years)									
<51	9 (47.4)	3 (50)	0.637 ^a	9 (50)	3 (42.9)	0.550 ^a	14 (48.3)	8 (61.5)	0.323 ^a
>51	10 (52.6)	3 (50)		9 (50)	4 (57.1)		15 (51.7)	5 (38.5)	
Menopausal Status									
Pre-menopausal	9 (47.4)	3 (50)	0.637 ^a	9 (50)	3 (42.9)	0.550 ^a	15 (51.7)	8 (61.5)	0.401 ^a
Post-menopausal	10 (52.6)	3 (50)		9 (50)	4 (57.1)		14 (48.3)	5 (38.5)	
Size (cm)									
<2.0	5 (26.3)	2 (33.3)	0.371 ^b	5 (27.8)	2 (28.6)	0.266 ^b	16 (55.2)	2 (15.4)	0.050 ^b
2.0-5.0	9 (47.4)	4 (66.7)		8 (44.4)	5 (71.4)		8 (27.6)	6 (46.2)	
>5.0	5 (26.3)	0 (0)		5 (27.8)	0 (0)		5 (17.2)	5 (38.5)	
Nuclear Grade									
Low	5 (26.3)	2 (33.3)	0.697 ^b	6 (33.3)	1 (14.3)	0.342 ^b	4 (13.8)	5 (38.5)	0.193 ^b
Intermediate	2 (10.5)	0 (0)		2 (11.1)	0 (0)		4 (13.8)	1 (7.7)	
High	12 (63.2)	4 (66.7)		10 (55.6)	6 (85.7)		21 (72.4)	7 (53.8)	
Multifocal									
Yes	11 (57.9)	5 (83.3)	0.267 ^a	10 (55.6)	6 (85.7)	0.174 ^a	17 (58.6)	7 (53.8)	0.517 ^a
No	8 (42.1)	1 (16.7)		8 (44.4)	1 (14.3)		12 (41.4)	6 (46.2)	
Comedo Lesion									
Yes	13 (68.4)	6 (100)	0.153 ^a	12 (66.7)	7 (100)	0.105 ^a	19 (65.5)	9 (69.2)	0.553 ^a
No	6 (31.6)	0 (0)		6 (33.3)	0 (0)		10 (34.5)	4 (30.8)	
ER									
Negative	7 (36.8)	0 (0)	0.105 ^a	6 (33.3)	1 (14.3)	0.337 ^a	8 (30.8)	5 (38.5)	0.645 ^a
Positive	12 (63.2)	6 (100)		12 (66.7)	6 (85.7)		18 (69.2)	8 (61.5)	
PR									
Negative	8 (42.1)	0 (0)	0.070 ^a	6 (33.3)	2 (28.6)	0.607 ^a	7 (31.8)	4 (33.3)	0.610 ^a
Positive	11 (57.9)	6 (100)		12 (66.7)	5 (71.4)		15 (68.2)	8 (66.7)	
HER2									
Negative	4 (21.1)	1 (16.7)	0.657 ^a	5 (27.8)	0 (0)	0.451 ^a	3 (23.1)	2 (22.8)	0.684 ^a
Positive	15 (78.9)	5 (83.3)		13 (72.2)	7 (100)		10 (76.9)	7 (77.3)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 5. Relationship between ppGalNAc-T6 and –T8 expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesion with invasion.

Clinicopathologic Features	ppGalNAc-T6 ⁻	ppGalNAc-T6 ⁺	p value	ppGalNAc-T8 ⁻	ppGalNAc-T8 ⁺	p value
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
AGE (years)						
<51	10 (47.6)	11 (45.8)	0.571 ^a	7 (53.8)	12 (37.5)	0.250 ^a
>51	11 (52.4)	13 (54.2)		6 (46.2)	20 (62.5)	
Menopausal Status						
Pre-menopausal	9 (42.9)	11 (45.8)	0.540 ^a	5 (38.5)	14 (43.8)	0.506 ^a
Post-menopausal	12 (57.1)	13 (54.2)		8 (43.8)	18 (56.3)	
Size (cm)						
<2.0	6 (28.6)	9 (37.5)	0.818 ^b	4 (30.8)	13 (40.6)	0.825 ^b
2.0-5.0	13 (61.9)	13 (54.2)		8 (61.2)	17 (53.1)	
>5.0	2 (9.5)	2 (8.3)		1 (7.7)	2 (6.3)	
Nuclear Grade						
Low	4 (19)	2 (8.3)	0.494 ^b	2 (15.4)	5 (15.6)	0.967 ^b
Intermediate	2 (9.5)	4 (16.7)		2 (15.4)	4 (12.5)	
High	15 (71.4)	18 (75)		9 (69.2)	23 (71.9)	
Multifocal						
Yes	13 (68.9)	13 (54.2)	0.413 ^a	6 (46.2)	21 (65.6)	0.191 ^a
No	8 (38.1)	11 (45.8)		7 (53.8)	11 (34.4)	
Comedo Lesion						
Yes	12 (57.1)	16 (66.7)	0.363 ^a	6 (46.2)	19 (59.4)	0.315 ^a
No	9 (42.9)	8 (33.3)		7 (53.8)	13 (40.6)	
ER						
Negative	4 (20)	3 (12.5)	0.394 ^a	1 (8.3)	6 (18.8)	0.372 ^a
Positive	16 (80)	21 (87.5)		11 (91.7)	26 (81.3)	
PR						
Negative	6 (30)	8 (33.3)	0.537 ^a	3 (23.1)	10 (31.3)	0.436 ^a
Positive	14 (70)	16 (66.7)		10 (76.9)	22 (68.8)	
HER2						
Negative	8 (47.1)	14 (63.6)	0.239 ^a	7 (70)	16 (53.3)	0.293 ^a
Positive	9 (52.9)	8 (36.4)		3 (30)	14 (46.7)	

^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 6. Relationship between GnT-III expression with clinicopathologic features and immunohistochemical markers in DCIS lesion with invasion.

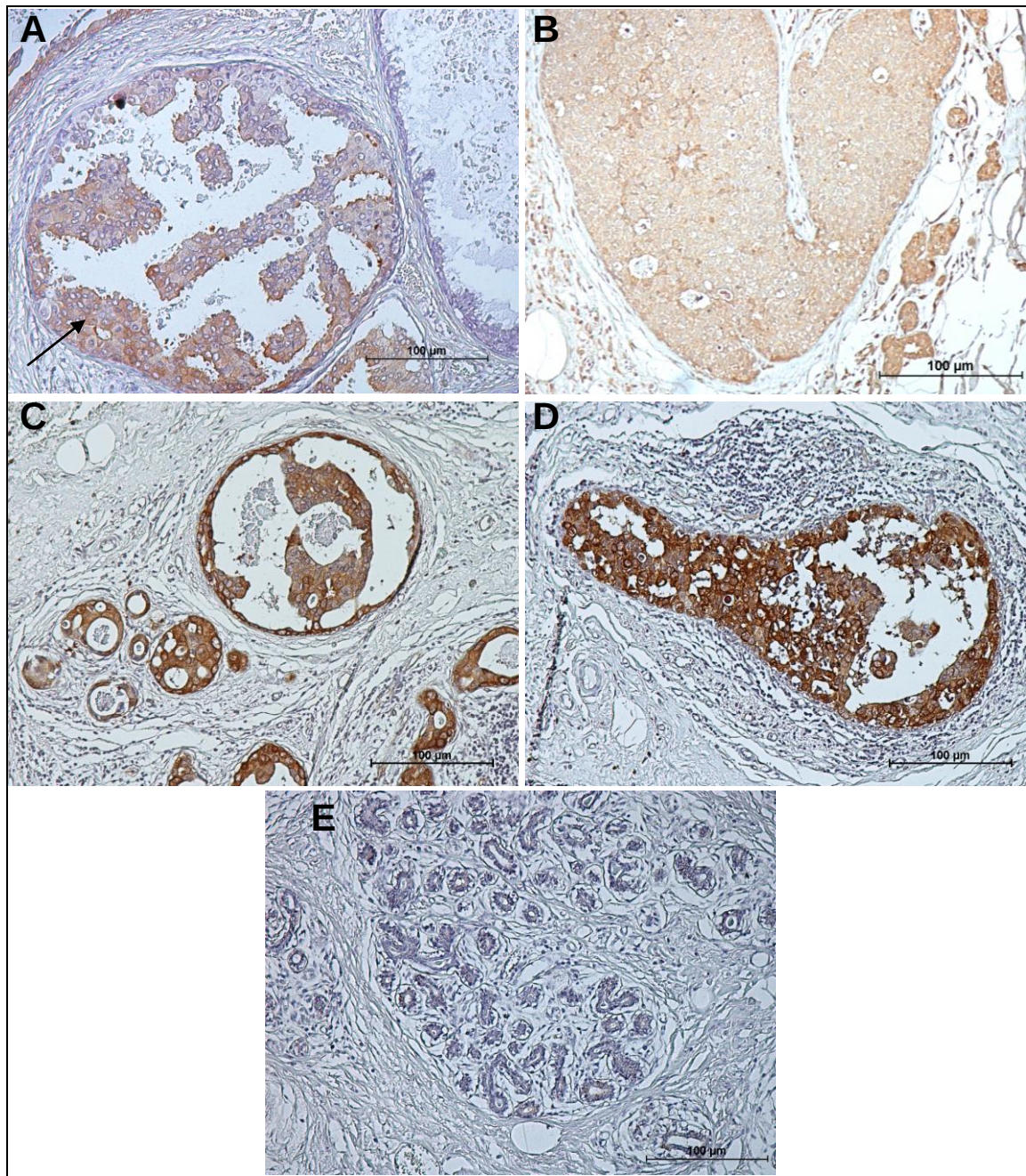
Clinicopathologic Features	GnT-III ⁻ n (%)	GnT-III ⁺ n (%)	p value
Age (years)			
<51	2 (50)	17 (43.6)	0.602 ^a
>51	2 (50)	22 (56.4)	
Menopausal Status			
Pre-menopausal	2 (50)	17 (43.6)	0.602 ^a
Post-menopausal	2 (50)	22 (56.4)	
Size (cm)			
<2.0	2 (50)	13 (33.3)	0.696 ^b
2.0-5.0	2 (50)	22 (56.4)	
>5.0	0 (0)	4 (10.3)	
Nuclear Grade			
Low	2 (50)	3 (7.7)	0.039 ^b
Intermediate	0 (0)	5 (12.8)	
High	2 (50)	31 (79.5)	
Multifocal			
Yes	3 (75)	24 (68.5)	0.521 ^a
No	1 (25)	15 (38.5)	
Comedo Lesion			
Yes	2 (50)	26 (66.7)	0.436 ^a
No	2 (50)	13 (33.3)	
ER			
Negative	0 (0)	8 (21.1)	0.414 ^a
Positive	4 (100)	30 (78.9)	
PR			
Negative	0 (0)	15 (38.5)	0.166 ^a
Positive	4 (100)	24 (61.5)	
HER2			
Negative	4 (100)	19 (54.3)	0.108 ^a
Positive	0 (0)	16 (45.7)	

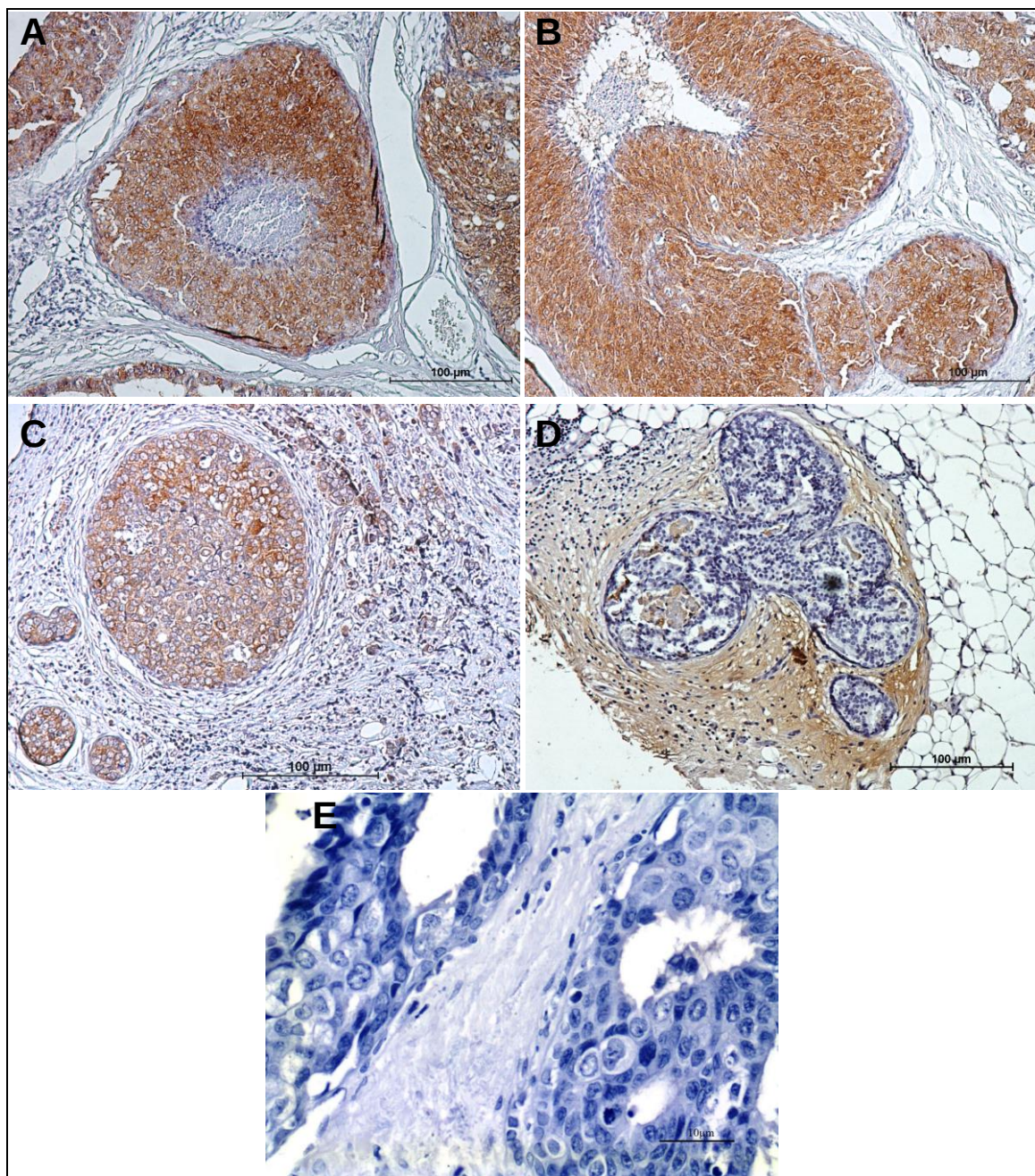
^aFisher's exact test; ^bChi-square test

Table 7. Relationship between lectin staining with clinicopathologic features and immunohistochemical markers DCIS lesions with invasion

Clinico pathologic Features	L-PHA ⁻ n (%)	L-PHA ⁺ n (%)	p value	WGA ⁻ n (%)	WGA ⁺ n (%)	p value	PNA ⁻ n (%)	PNA ⁺ n (%)	p value
Age (years)									
<51	10 (35.7)	9 (69.2)	0.047	8 (36.4)	11 (57.9)	0.144	20 (46.5)	7 (63.6)	0.250
>51	18 (64.3)	4 (30.8)		14 (63.6)	8 (42.1)		23 (53.5)	4 (36.4)	
Menopausal Status									
Pre-menopausal	12 (42.9)	7 (53.8)	0.374	10 (45.5)	9 (47.4)	0.576	17 (39.5)	8 (72.7)	0.576
Post-menopausal	16 (57.1)	6 (46.2)		12 (54.5)	10 (52.6)		26 (60.5)	3 (27.3)	
Size (cm)									
<2.0	10 (35.7)	5 (38.5)	0.351	8 (36.4)	7 (36.8)	0.653	15 (34.9)	5 (45.5)	0.809
2.0-5.0	14 (50)	8 (61.5)		11 (50)	11 (57.9)		23 (53.5)	5 (45.5)	
>5.0	4 (14.3)	0 (0)		3 (13.6)	1 (5.3)		5 (11.6)	1 (9.1)	
Nuclear Grade									
Low	1 (3.6)	3 (23.1)	0.061	0 (0)	4 (21.1)	0.068	7 (16.3)	0 (0)	0.334
Intermediate	3 (10.7)	3 (23.1)		3 (13.6)	3 (15.8)		5 (11.6)	2 (18.2)	
High	24 (85.7)	7 (53.8)		19 (86.4)	12 (63.2)		31 (72.1)	9 (81.8)	
Multifocal									
Yes	16 (57.1)	9 (69.2)	0.350	13 (59.1)	12 (63.2)	0.522	28 (65.1)	8 (72.7)	0.463
No	12 (42.9)	4 (30.8)		9 (40.9)	7 (36.8)		15 (34.9)	3 (27.3)	
Comedo Lesion									
Yes	19 (67.9)	7 (46.2)	0.300	14 (63.6)	12 (63.2)	0.614	24 (55.8)	8 (72.7)	0.253
No	9 (32.1)	6 (53.8)		8 (36.4)	7 (36.8)		19 (44.2)	3 (27.3)	
ER									
Negative	7 (25)	2 (15.4)	0.399	6 (27.3)	3 (15.8)	0.308	8 (19)	2 (18.2)	0.660
Positive	21 (75)	11 (84.6)		16 (72.7)	16 (84.2)		34 (81)	9 (81.8)	
PR									
Negative	8 (28.6)	4 (30.8)	0.581	6 (27.3)	6 (31.6)	0.581	13 (31)	3 (27.3)	0.564
Positive	20 (71.4)	9 (69.2)		16 (72.7)	13 (68.4)		29 (69)	8 (72.7)	
HER2									
Negative	11 (39.3)	12 (92.3)	0.001	9 (40.9)	14 (73.7)	0.036	19 (50)	7 (70)	0.221
Positive	17 (60.7)	1 (7.7)		13 (59.1)	5 (26.3)		19 (50)	3 (30)	

FIGURES





LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Immunohistochemistry panel (40X). (A) GnT-III staining in pure DCIS (black arrow indicate positive cells). (B) GnT-III staining in DCIS plus IDC samples. (C) ppGalNAc-T8 staining in pure DCIS samples (D) ppGalNAc-T8 staining in DCIS plus IDC samples. (E) Negative control.

Figure 2. Histochemistry panel. (A) PHA-L staining in pure DCIS. (B) PHA-L staining in DCIS-IDC samples. (C) WGA staining in DCIS-IDC. (D) WGA staining in DCIS-IDC samples. (E) Negative control.

6 CONCLUSÕES

- O padrão de expressão da O-glicosilação não é semelhante entre os diferentes tipos de lesão, onde apenas a enzima ppGalNAc-T8 apresentou correlação com o *status* menopausal em lesões puras de CDIS;
- O padrão de expressão de GnT-III, responsável por N-glicosilação, foi maior nas lesões comedônicas no CDIS puro e nos casos com alto grau nuclear nas lesões CDIS com componente invasivo, demonstrando que no CDIS alterações na N-glicosilação estão associadas a um prognóstico reservado;
- A maior expressão do HER-2 ocorreu apenas em células de CDIS com componente invasivo, onde não se observou marcação para resíduos de β -1,6-N-acetilglicosamina (por ausência ou por inacessibilidade), reconhecido pela L-PHA. Comportamento inverso foi observado para N-acetilglicosamina, resíduos de carboidrato reconhecidos pela WGA;
- Resíduos de β -1,3-N-acetilgalactosamina, reconhecidos por PNA, foram mais expresso em lesões comedônicas e micropapilares quando comparados com as lesões sólidas, entretanto não obteve correlação com os dados clínico-histopatológicos dos pacientes.
- Resíduos de ácido siálico α 2,3-ligados foram mais expressos nas lesões cribriformes da mama quando comparados com as lesões comedônicas e sólidas. Com relação aos dados clínico-histopatológicos foi possível observar a relação deste carboidrato e um prognóstico reservado, uma vez que sua expressão foi maior em tumores maiores que 5cm e negativos para os receptores de estrógeno, progesterona e HER-2;

- Resíduos de ácido siálico α 2,6-ligados, reconhecidos por SNA, não apresentaram correlação estatística com nenhum dos parâmetros clínico-histopatológicos analisados;
- A lectina MAL-II apresentou o maior potencial como sonda prognóstica para lesões pré-malignas da mama, situando o ácido siálico α 2,3-ligado como um forte biomarcador deste tipo de neoplasia.

7 PERSPECTIVAS

O recente histórico do carcinoma ductal *in situ* permitiu que essa doença fosse negligenciada pelos pesquisadores por muito tempo, e por essa razão o conhecimento que se tem sobre seu surgimento e evolução ainda permanecem escassos. Em adição, o CDIS se apresenta como uma entidade heterogênea, se desenvolvendo de formas diferentes nos diversos pacientes não permitindo o estabelecimento de padrão de crescimento.

Mesmo sendo classificada como uma lesão pré-maligna, e de uma forma geral, de bom prognóstico, muitos pacientes acometidos evoluem para uma forma invasiva e até metastática. Por isso reconhecer o CDIS a nível molecular e suas características possibilitarão a determinação de seus marcadores de malignidade.

O glicocódigo das células representa uma importante fonte de informação sobre o estado da mesma, sendo alterado, por exemplo, durante o processo carcinogênico. Reconhecer e entender esse padrão e suas alterações patológicas pode permitir identificar de forma precoce o surgimento de uma doença e predizer de forma mais acurada seu prognóstico.

O estudo de enzimas e carboidratos envolvidos no processo de glicosilação de proteínas, principalmente, através do uso de anticorpos e lectinas, que fazem parte das células tumorais do CDIS permitirá o melhor entendimento da sua evolução clínica bem como o reconhecimento de moléculas como potenciais biomarcadores prognósticos e diagnósticos.

O Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer (BmC), neste contexto, busca o delineamento do glicocódigo do CDIS, sendo o próximo passo a análise dos genes GnT-III e ppGalNAc-T6 e -T8. Além da ampliação do número de carboidratos e enzimas envolvidos na carcinogênese deste tumor como as enzimas já reconhecidamente ligadas à malignidade, GnT-V e β 1-integrina.

8 REFERÊNCIAS

ARNDT, N. X.; TIRALONGO, J.; MADGE, P. D.; VON ITZSTEIN, M.; DAY, C. J. Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines. **J Cel Biochem**, v. 112, n. 9, p. 2230–2240, 2011.

BELLAMY, C. O. C.; McDONALD, C.; SALTER, D. M.; CHETTY, U.; ANDERSON, T. J. Noninvasive ductal carcinoma of the breast: the relevance of histologic categorization. **Human pathol**, v. 24, n. 1, p. 16-23, 1993.

BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M. et al. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **Eur J Histochem**, v. 47, n. 2, p. 139-42, 2003.

BENNETT, E. P.; MANDEL, U.; CLAUSEN, H.; GERKEN, T. A.; FRITZ, T. A.; et al. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiol**, v. 22, n. 6, pp. 736-756, 2011.

BERKEY, C. S.; TAMIMI, R. M.; ROSNER, B.; FRAZIER, L.; COLDITZ, G. A. Young women with family history of breast cancer and their risk factors for benign breast disease. **Cancer**, v. 118, n. 11, p. 2796-2803, 2012.

BIJKER, N.; DONKER, M.; WESSELING J.; den HEETEN, J. G.; RUTGERS, E. J. Is DCIS breast cancer, and how do i treat it? **Cur Treat Options Oncol**, v. 14, n. 1, p.75-87, 2013.

BLOOM, H. J.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br J Cancer**, v. 11, p. 359-377, 1957.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Ad Drug Del R**, v. 64, p. 206–212, 2012.

BROOK, S. A.; CARTERA, T. M.; BENNETT, E. P.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U. Immunolocalisation of members of the polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase (ppGalNAc-T) family is consistent with biologically relevant altered cell surface glycosylation in breast cancer. **Acta histochem**, v. 109, p. 273-284, 2007.

BUERGER, H.; OTTERBACH, F.; SIMON, R.; SCHÄFFER, K. L.; POREMBA, C. et al. Different genetic pathways in the evolution of breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. **J Pathol**, v.189, p. 521-526, 1999.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com Cien Saúde**, v. 22, n. 1, p. S69-S82, 2011.

CHLEBOWSKI, R. T.; MANSON, J. E.; ANDERSON, G. L.; CAULEY J. A.; ARAGAKI, A. K. et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. **J National Cancer Inst**, v. 105, n. 8, p. 526-535, 2013.

CHRISTIANSEN, M. N.; CHIK, J.; LEE, L.; ANUGRAHAM, M.; ABRAHAMS, J. L.; PACKER, N. H. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**, 2013.

CUMMINGS, R. D.; KORNFELD, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. **J Biol Chem**, v. 257, p. 11230-11234, 1982.

DALL'OLIO, F.; MALAGOLINI, N.; TRINCHERA, M.; CHIRICOLO, M. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. **Front Biosci**, v.1, n. 17, p. 670-699, 2012.

DALZIEL, M.; CRISPIN, M.; SCANLAN, C. N.; ZITZMANN, N.; DWEK R. A. Emerging Principles for the Therapeutic Exploitation of Glycosylation. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 1235-1241, 2014.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. N.; GIORDANO, S. H. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by *HER2* Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. **JCO**, v. 28, n. 1, p. 92-98, 2010.

DING, M.; WANG, H.; WANG, J.; ZHAN, H.; ZUO, Y. et al. ppGalNAc-T1 as a Potential Novel Marker for Human Bladder Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 11, p. 5653-5657, 2012.

DOSAKA-AKITA, H.; MIYOSHI, E.; SUZUKI, O.; ITOH, T.; KATOH, H. et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 1773-1779.

DRAKE, M. P.; CHO, W.; LI, B.; PRAKOBPHOL, A.; JOHANSEN, E.; ANDERSON, N. L. et al. Sweetening the Pot: Adding Glycosylation to the Biomarker Discovery Equation. **Clin Chem**, v. 56, n. 2, p. 223-236, 2010.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F. L.; TROTTI, A. editors. AJCC cancer staging manual (7^a ed). Nova York, NY: Springer; 2010.

ELLIS, I. O. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and biology. **Mod Pathol**, v. 23, p. 1-7, 2010.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathol**, v. 19, p. 403-410, 1991.

FERREIRA, S. A.; VASCONCELOS, J. L. A.; CAVALCANTI, C. L. B.; RÊGO, M. J. M. B.; BELTRÃO, E. I. C. Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. **Medical mol. Morphol**, v. 46, p. 198-202, 2013.

FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D.; ALLRED, D. C. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

FOULKES, W. D.; REIS-FILHO, J. S.; NAROD, S. A. Tumor size and survival in breast cancer-a reappraisal. **Nature R Clin Oncol**, v. 7, p. 348-353, 2010.

FREITAS JUNIOR, J. C. M.; D'AGUIAR SILVA, B. D. R.; SOUZA, W. F.; ARAÚJO, W. M. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells. **Can Chem Pharmacol**, v. 68, p. 227-238, 2011.

FRY, S. A.; AFROUGH, B.; LOMAX-BROWNE, H. J.; TIMMS, J. F.; VELENTZIS, L. S. et al. Lectin microarray profiling of metastatic breast cancers. **Glycobiol**, v. 21, n. 8, p. 1060-1070, 2011.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Rev Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526-542, 2005.

GABIUS, H.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends in Biochem Sci**, v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GEIGER, T.; MADDEN, S. F.; GALLAGHER, W. M.; COX, J.; MANN, M. Proteomic portrait of human breast cancer progression identifies novel prognostic markers. **Cancer Res**, v. 72, n. 9, p. 2428-2439, 2012.

GERKEN, T. A.; JAMISON, O.; PERRINE, C. L. Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. **J Biol Chem**, v. 286, p. 14493-14507, 2011.

GERKEN, T.; REVOREDO, L.; THORNE, J. J. C.; TABAK, L. A.; VESTER-CHRISTENSEN, M. B. A. et al. Family of Glycosyltransferases (ppGalNAc Ts) Acts as a Switch Directing Glycopeptide Substrate Glycosylation in an N-or C-terminal Direction, Further Controlling Mucin Type O-Glycosylation. **J Biol Chem**, v. 288, n. 27, p. 19900-19914, 2013.

GILL, D. J.; CLAUSEN, H.; BARD, F. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. **T Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 149–158, 2011.

GIULIANELLI, S.; VAQUÉ, J. P.; WARGON, V.; SOLDATI, R.; VANZULLI, S. I. et al. The role of estrogen receptor alpha in breast cancer cell proliferation mediated by progestins. **Medicina**, v. 72, n. 4, p. 315, 2012.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; GELBER, R. D.; COATES, A. S.; THURLIMANN, B. et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol**, v. 18, n. 7, p. 1133-1144, 2007.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B. et al. Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22; p. 1736-1747, 2011.

GOODWIN, P. J.; PHILLIPS, K.; WEST, D. W.; ENNIS, M.; HOPPER, J. L. et al. Breast Cancer Prognosis in *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. **J Clin Onco**, v. 30, n. 1, p. 19-26, 2012.

HAKOMORI, S.; CUMMINGS, R. D. Glycosylation effects on cancer development. **Glycoconj J**, v. 29, n.8-9, p. 565-566, 2012.

HAMMOND, M. E. H.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; ALLRED, C.; HAGERTY, K. L. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). **Arch Pathol Lab Med**, v. 134, 2010.

HANSEN, N. M.; GRUBE, B. J.; TE, W. BRENNAN, M. L.; TURNER, R. et al. Clinical significance of axillary micrometastases in breast cancer: how small is too small? **Proc Am Soc Clin Oncol**, v. 20, p. 24a, 2001.

HARTMAN, A. R.; DANIEL, B. L.; KURIAN, A. W.; MILLS, M. A.; NOWELS, K. W. et al. Breast magnetic resonance image screening and ductal lavage in women at high genetic risk for breast carcinoma. **Cancer**, v. 100, n. 3, p. 479–489, 2004.

HESELMAYER-HADDAD, K.; GARCIA, L. Y. B.; BRADLEY, A.; ORTIZ-MELENDEZ, C.; LEE, W. et al. Single-Cell Genetic Analysis of Ductal Carcinoma *in Situ* and Invasive Breast Cancer Reveals Enormous Tumor Heterogeneity yet Conserved Genomic Imbalances and Gain of *MYC* during Progression. **The Am J Pathol**, v. 181, n. 5, p. 1807–1822, 2012.

HUANG, B.; SUN, L.; CAO, J.; ZHANG, Y.; WU, Q. et al. Downregulation of the GnT-V gene inhibits metastasis and invasion of BGC823 gastric cancer cells. **Oncol reports**, v. 29, n. 6, p. 2392-2400, 2013.

HUFFMAN, J. E.; KNEŽEVIĆ, A.; VITART, V.; KATTLA, J.; ADAMCZYK, B. et al. Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. **Hum Mol Gen**, v. 20, n. 24, p. 5000-5011, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2014. Rio de Janeiro; 2013; Disponível em:
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.

KALTNER, H.; GABIUS, H. A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. **Histol Histopathol**, v. 27, p. 397-416, 2012.

KITADA, S.; YAMADA, S.; KUMA, A.; OUCHI, S.; TASAKI, T. et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas. **Br J Cancer**, v. 23, n. 2, p.472-481, 2013.

KNEZEVIC, A.; POLASEK, O.; GORNIK, O.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H. et al. Variability, heritability and environmental determinants of human plasma N-glycome. **J Proteome Res**, v. 8, p. 694-701, 2009.

KOREKANE, H.; TANIGUCHI. GlycoPOD <http://jcggdb.jp/GlycoPOD>. (2013). Acessado em 15 de janeiro de 2014.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LANGE, T.; ULLRICH, S.; MULLER, I.; NENTWICH, M. F.; STUBKE, K. et al. Human Prostate Cancer in a Clinically Relevant Xenograft Mouse Model: Identification of b(1,6)-Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression. **Clin Cancer Res**, v. 18, p. 1364-1373, 2012.

LI, X.; WANG, J.; LI, W.; XU, Y.; SHAO, D. et al. Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. **Glycobiol Adv Acc**, v. 22, n. 5, p. 602-615, 2012.

LINDSTRÖM, L.; KARLSSONE, E.; WILKING U. M.; JOHANSSON U., HARTMAN, J. et al. Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression. **J of Clinical Oncol**, v. 30, n. 21, p. 2601-2608, 2012.

LOMINO, J. V.; NAEGELI A.; ORWENYO, J.; AMIN, M. N.; AEBI, M. et al. Two-step enzymatic glycosylation of polypeptides with complex N-glycans. **Bioorgan Med Chem**, v. 21, n.8, p. 2262-2270, 2013.

LOPES-GARCIA, M. J.; GEYER, F. C.; LACROIX-TRIKI, M.; MARCHIÓ, C.; REISFILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathol**, v. 57, n. 2, p. 171-192, 2010.

LYNGE, E.; PONTI, A.; JAMES, T., MÁJEK, O.; EULER-CHELPIN, M. et al. Variation in detection of ductal carcinoma in situ during screening mammography: A survey within the International Cancer Screening Network. **Eur J Cancer**, v. 50, n. 1, p. 185-192, 2014.

MATTAINI, R. K.; HEIDEN, M. G. V. Glycosylation to Adapt to Stress. **Sci**, n. 337, p. 925-926, 2012.

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

MIRZA, A. N.; MIRZA, N. Q.; VLASTOS, G.; SINGLETARY, S. E. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. **Ann Surg**, v. 235, n. 1, p. 10-26, 2002.

MIWA, H. E.; SONG, Y.; ALVAREZ, R.; CUMMINGS, R. D.; STANLEY, P. The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. **Glycoconj J**, v. 29, n. 8-9, p. 609-618, 2012.

MOOK, S. Prognostic factors in breast cancer: One fits all? Eds. Gildeprint Drukkerijen. Amesterdã, Holanda, 2011.

MOOK, S.; VAN'T VEER L. J.; RUTGERS, E. J.; RAVDIN, P. M.; van de VELDE, A.O et al. Independent prognostic value of screen detection in invasive breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 7, p. 585-97, 2011.

MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature R Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 448-462, 2012.

NAKADA, H. Ikuo Yamashina: a pioneer who established the basis of current glycobiology. **J Biochem**, v. 151, n. 5, p. 461-468, 2012.

OLIVEIRA-COSTA, J. P.; ZANETTI, J. S.; OLIVEIRA, L. R.; SOARES, F. A.; RAMALHO, L. Z. et al. Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. **Hum Pathol**, v. 41, p. 1624-30, 2010.

PAGE, D. L.; DUPONT, D. W.; ROGERS, L. W.; RADOS, M. S. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long term follow-up study. **Cancer**, v.55, p. 2698-2608, 1985.

PARK, J. H.; NISHIDATE, T.; KIJIMA, K.; OHASHI, T.; TAKEGAWA, K. et al. Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 70, n. 7, p. 2759-2769, 2010.

PENG, C.; TOGAYACHI, A.; KWON, Y. D.; XIE, C.; WU, G. et al. Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 402, p. 680-686, 2010.

PETERS, B. P.; EBISU, S.; GOLDSTEIN, I. J.; FLASHNER, M. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. **Biochem**, v. 18, n. 24, p. 5505–5511, 1979.

PIERCE, A.; SALDOVA, R.; HAMID, U. M. A.; ABRAHAMS, J. L.; MCDERMOTT, E. W. et al. Levels of specific glycans significantly distinguish lymph node-positive from lymph node-negative breast cancer patients. **Glycobiol**, v. 20, n. 10, p. 1283–1288, 2010.

PINHO, S.S.; OLIVEIRA, P.; CABRAL, J.; CARVALHO, S.; HUNTSMAN, D. et al. Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions. **PLoS ONE**, n. 7, v. 3, p. 33191, 2012.

PINHO, S.; CARVALHO, S.; MARCOS-PINTO, R.; MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, C. et al. Gastric cancer: adding glycosylation to the equation. **Trends in Mol Med**, v. 19, n. 11, p. 664-676, 2013.

POTAPENKO, I. O.; HAAKENSEN, V. D.; LÜDERSC, T.; HELLAND, A., BUKHOLM, I. et al. Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. **Mol Oncol**, v. 4, p. 98-118, 2010.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J.; DECKER, T. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade Thomas Decker. **Breast Can R**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010.

RAKHA, E. A. The low nuclear grade breast neoplasia family. **Diagnostic Histopathol**, v. 18, n. 3, p. 124-132, 2012.

RAKUS, J. F.; MAHAL, L. K. New technologies for glycomic analysis: toward a systematic understanding of the glycome. **Annu Rev Anal Chem**, v. 4, p. 367-392, 2011.

RAVINDRANATH, M. H.; HIGA, H. H.; COOPER, E. L.; PAULSON, J. C. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. **J Biol Chem**, v. 260, p. 850–8856, 1985.

REEVES, G. K.; PIRIE, K.; GREEN, J.; BULL, D.; BERAL, V. Comparison of the effects of genetic and environmental risk factors on *in situ* and invasive ductal breast cancer. **IJC**, v. 131, n. 4, p. 930-937, 2012.

REIS, C. A.; OSORIO, H.; SILVA, L.; GOMES, C.; DAVID, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J Clin Pathol**, v. 63, p. 322-329, 2010.

RUHAAK, L. R.; HENNIG, R.; HUH, C.; BOROWIAK, M.; DOLHAIN, R. J. et al. Optimized workflow for preparation of APTS-labeled N-glycans allowing high-throughput analysis of human plasma glycomes using 48- channel multiplexed CGE-LIF. **J Proteome Res**, v. 9, p. 6655-6664, 2010.

SANTOS, P. B.; ZANETTI, J. S.; SILVA, A. R.; BELTRÃO, E. I. C. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. **Diagn Pathol**, v. 7, p. 104, 2012.

SCOMERSI, S.; DA POZZO, F.; TORELLI, L.; ZANCONATI F.; TONUTTI, M. et al. Clinicopathologic factors predicting involvement of nonsentinel axillary lymphonodes in breast cancer patients: Is axillary dissection always indicated? **Ann Ital Chir**, v. 81, p. 335-341, 2010.

SCULLY, J. O.; BAY, B.; YIP, G.; YU, Y. Breast Cancer Metastasis. **Can Gen Proteo**, v. 9, p. 311-320, 2012.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Sci**, v. 177, p. 949–959, 1972.

SOBRAL, A. P.; RÊGO, M. J.; CAVALACANTI, C. L.; CARVALHO, L. B. JR.; BELTRÃO, E.I. ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Sci**, v.52, n.1, p.49-54, 2010.

SONG, Y.; AGLIPAY, J. A.; BERNSTEIN, J. D.; GOSWAMI, S.; STANLEY, P. The bisecting GlcNAc on N-glycans inhibits growth factor signaling and retards mammary tumor progression. **Cancer Res**, v. 70, p. 3361–3371, 2010.

SPERDUTO, P. W.; KASED, N.; ROBERGE, D.; XU, Z.; SHANLEY, R. et al. Effect of tumor subtype on survival and the graded prognostic assessment for patients with breast cancer and brain metastases. **Internl J Radiation Oncol Biol Physics**, v. 82, n. 5, p. 2111-2117, 2012.

STEPHENS, P. J.; PATRICK, S. T.; DAVIES, H.; VAN LOO, P.; GREENMAN, C. et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 400-404, 2012.

SWAMY, M. J.; GUPTA, D.; MAHANTA, S. K.; SUROLIA, A. Further characterization of the saccharide specificity of peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. **Carbohydr Res**, v. 213, p. 59–67, 1991.

TAKAMATSU, S.; KOREKANE, H.; OHTSUBO, K.; OGURI, S.; PARK, J. Y. et al. N-Acetylglucosaminyltransferase (GnT) Assays Using Fluorescent Oligosaccharide Acceptor Substrates: GnT-III, IV, V, and IX (GnT-Vb). **Humana Press**, p. 283-298, 2013.

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**, p. 772-782, 2011.

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

TRAN, D. T.; LIM, J. M.; LIU, M.; STALNAKER, S. H.; WELLS, L. et al. Glycosylation of α -dystroglycan: O-mannosylation influences the subsequent addition of GalNAc by UDP-GalNAc polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. **J Biol Chem**, v. 287, p. 20967-20974, 2012.

TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.; EKBOM, A.; HSIEH, C.; LAGIOU, P. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int J Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-485, 2008.

VERKOOIJEN, H. M.; HARTMAN, M.; USEL, M.; BENHAMOU, S.; NEYROUD-CASPAR, I. et al. Breast cancer prognosis is inherited independently of patient, tumor and treatment characteristics. **IJC**, v. 130, n. 9, p. 2103-2110, 2012.

VIEIRA-DE-MELLO, G. S.; FILHO, A. F. S.; SANTOS, P. B. S.; RÊGO, M. J. B. M.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin Histochemistry Reveals Changes in Carbohydrate Expression on Morphological Types of Breast Ductal Carcinoma in situ. **Cytol Histol**, v.4, n. 3, p. 1-4, 2013.

VIRNIG, B. A.; TUTTLE, T. M.; SHAMLIYAN, T.; KANE, R. L. Ductal Carcinoma in situ of the Breast: A Systematic Review of Incidence, Treatment, and Outcomes. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, p. 170–178, 2010.

VODUC, K. D.; CHEANG, M. C. U.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; NIELSEN, T. O. et al. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684 – 1691, 2010.

VOLINIA, S.; GALASSO, M.; SANA, M. E.; WISE, T. F. et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **PNAS**, v. 109, n. 8, p. 3024–3029, 2012.

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 sialic acid-linked α 2,3 to penultimate galactose residues. **J Biol Chem**, v. 263, p. 4576-4585, 1988.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, n. 1, p. 18, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Disponível em http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html. Acesso em 24 de novembro de 2013

WONG, S. L.; CHAO, C.; EDWARDS, M. J. CARLSON, D. J.; LAIDLEY, A. et al. Frequency of sentinel lymph node metastases in patients with favorable breast cancer histologic subtypes. **Am J Surg**, v. 184, n. 6, p. 492-498, 2002.

YOSHIZAKI, N. Functions and properties of animal lectins. **Zool Sci**, v. 7, p. 581-591, 1990.

ZHAO, W.; CAI, M.; XU, H.; JIANG, J.; WANG, H. Single-Molecule Force Spectroscopy study of the interactions between lectins and carbohydrates on cancer and normal cells. **Nanoscale**, v. 5, p. 3226-3229, 2013.

ZOLDOS, V.; HORVAT, T.; LAUC, G. Glycomics meets genomics, epigenomics and other high throughput omics for system biology studies. **Cur Opp Chem Biol**, v. 17, p. 1-7, 2012.

9 ANEXOS

9.1 Normas da revista *Acta Histochemica et Cytochemica*

9.1.1. Editorial Scope

Acta Histochemica et Cytochemica is the official online journal of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry. It is intended primarily to publish concise, original articles in all fields of histochemistry and cytochemistry promptly. Manuscripts oriented towards methodological subjects, which contain significant technical advances in the fields, are also welcome.

Manuscripts in English are accepted from investigators in any country whether or not they are members of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry. Manuscripts should be original work not previously published or being considered for publication elsewhere, with the exception of abstracts. Manuscripts that have been published or accepted, or are under consideration for publication, with essentially the same content, will not be considered.

All submitted papers will be peer-reviewed by at least two referees selected by appropriate Associate Editors and acceptance is based on scientific significance, originality, and clarity. When required, a revised manuscript should be submitted within 3 months, otherwise it will be dealt with as a newly submitted one. The Editor-in-Chief will make all final decisions regarding acceptance.

9.1.2. Categories

Regular Articles should report complete findings of original research and should be presented in the following order: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. There are no restrictions on the number of pages and figures.

9.1.3 Manuscript Organization

The manuscript should be double-spaced throughout, A4 (210 × 297 mm) size, with approximately 3 cm margin on all sides. All pages in manuscripts should be numbered consecutively. The manuscript should have a uniform style and be submitted in the correct journal format, carefully proofread for grammar, spelling, and punctuation. Authors who are not native speakers of English should have their manuscripts checked by scientists whose native language is English.

After acceptance, all manuscripts will be forwarded to the language editor, but this does not diminish the responsibility of the author to pay attention to the linguistic accuracy of the manuscript. Please take special care in regard to the following points:

- Type the text unjustified and without breaking words by hyphens.
- Use only underline (for italic), bold, subscript, and superscript.
- Avoid multiple fonts, style or ruler changes, or graphics inserted into the text.
- Use line breaks (carriage returns) only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Type special characters (e.g., Greek letters and mathematical symbols) in red on the manuscript.

Manuscript style

Generally, papers should be divided into the following sections: *Title page*, *Abstract*, *Text*, *Acknowledgments*, *References*, *Tables*, *Figures*. Start each subdivision on a new page.

Title page

The first page of the manuscript should include: title of paper, full name(s) of author(s), institutional affiliation and complete address, a running title not to exceed 45 letters and spaces, individual(s), address, and telephone and fax numbers to whom correspondence

concerning the manuscript should be sent, footnotes containing dedications to persons and organizations, grants awarded and the present address of the author(s). Other footnotes should be arranged at the bottom of the pages cited with asterisk marks and separated from the text with a line.

Abstract and Key words

Each paper should begin with an informative abstract of not more than 200 words, followed by a maximum of five key words. Quotations of scientific papers within the abstract should be avoided; if mentioned, however, the full citation of the source should be given.

Text

The text should be arranged in the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. If necessary, each section can be divided into subsections with short informative subheadings marked with a single underline. Genus and species names should be marked with a single underline for printing in an *italics* font.

References

References to literature should appear in the text as numbers between angular brackets [3]. Only papers that have been published or are in press may be cited; personal communications can only be included by permission; and unpublished data should not be referenced but may be included in the text.

The references at the end of the text should be listed in alphabetical order according to the surname of the first author. Two or more references to the same first author should be in chronological order. The list of references must be set out as follows:

a) from journals: name(s) of author(s) followed by initials (do not use “*et al.*”); year of publication; complete title; name of the journal as

abbreviated in the Serial Sources for the BIOSIS Data Base published by Bio Sciences Information Service of Biological Abstracts; volume number; first and last page numbers.

1. Osamura, R. Y., Miyai, S., Egashira, N., Takekoshi, S., Yamazaki, M., Sanno, N. and Teramoto, A. (2004) Application of genetic engineering technologies for the study of pituitary development and neoplasms. Acta Histochem. Cytochem. 36; 249–254.

b) from books: name(s) of author(s) followed by initials (do not use “*et al.*”); year of publication; complete title; volume and edition if appropriate; publisher; place of publication.

2. Pearse, A. G. E. (1985) Histochemistry. Theoretical and Applied, vol. 2, Analytical Technology, 4th ed., Churchill Livingstone, London.

3. Tokuyasu, K. T. (1985) Immuno-cryoultramicrotomy. In “Immunolabelling for Electron Microscopy”, ed. by J. M. Polak and I. M. Varndell, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 71–82.

Citations in the text of Letters to the Editor should be made according to author’s name (for more than one author: use “first author’s name and *et al.*”) followed by abbreviated name of journal, volume number, first page number, and year:... earlier reports (Iino and Horiguchi, Acta Histochem. Cytochem. 39: 145, 2006)..... developed by Matsuzaki et al. (Acta Histochem. Cytochem., 42: 159, 2009) reveal...

Table

All tables should be numbered consecutively as text figures. Each table should be numbered separately (Table 1, Table 2, etc.). Supply a short explanatory title above the body of the table, and table footnotes lettered a, b, c, etc., below the body of the table. Do not use vertical rules.

Figures

All figures, including graphs should be numbered consecutively as text figures. For details, see the “Digital Art Guidelines” on a separate sheet. The magnification should be clearly stated in the figure legends for photographs.

Terminology and Abbreviations

Scientific abbreviations and symbols should conform to those listed in the International Code for the Abbreviations of Title of Periodicals, ISO Recommendation R4 by the International Organization for Standardization.

Chemical abbreviations of biological compounds should be the same as those recommended in “IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and Symbols for Chemical Names of Special Interest in Biological Chemistry, Revised Tentative Rules (1965),” in *J. Biol. Chem.* 241: 527–533, 1966. If unit abbreviations are used, the following are preferred: cm, mm, μm , nm, Å, g (not gm), ml (not cc or cm^3), hr, min, sec, M, mM, N, %, etc.

9.2 Normas da revista *Folia Histochemica et Cytobiologica*

9.2.1 Focus and Scope

Folia Histochemica et Cytobiologica is an international, English-language journal devoted to the rapidly developing fields of histochemistry, cytochemistry, cell biology, cell and tissue biology. The *Folia Histochemica et Cytobiologica* publishes papers that meet the needs and intellectual interests of medical professionals, basic scientists, college and university teachers and students.

Prospective authors should read most recent issues of *Folia Histochemica et Cytobiologica* to determine the appropriateness of a possible contribution. However, such an examination does not provide an infallible guide because editorial policy is always under review. Technical correctness is necessary, but it is not the only condition for acceptance. Clarity of exposition and potential interest of the readers are important considerations; it is the reader, not the author, who must receive the benefit of the doubt.

Folia Histochemica et Cytobiologica publishes review articles, original articles, short communications, proceedings of scientific congresses/symposia and book reviews. Fields of particular interests include development and application of modern techniques in histochemistry and cell biology, cell biology and pathology, cell-microenvironment interactions, tissue organization and pathology.

Manuscripts announcing new theoretical or experimental results, or manuscripts questioning well-established and successful theories, are highly desirable and are a subject for evaluation by specialists. Manuscripts describing original research that clarifies past misunderstandings or allows a broader view of a subject are acceptable. Manuscripts that demonstrate new relations between apparently unrelated areas of fields of interests are appropriate. Manuscripts that show new ways of understanding, demonstrating, or deriving familiar results are also acceptable. Such manuscripts must provide some original cytobiological insight and not just a clever derivation.

Regularly, review or tutorial articles are published, often of a length greater than that of the average article. Most of these articles are a subject of a

review; authors planning such articles are asked to consult with the editors at an early stage.

Most readers of a particular article will be specialists in the subject matter presented; the context within which the paper is presented should be established in the order given in Instructions to for Authors. Manuscripts must be technically correct and must take proper cognizance of previous work on the same subject regardless of where it may have appeared. Such referencing is especially important for reminders of once well known ideas, proofs, or techniques that may have again become useful to physics teachers and students. It is the responsibility of the author to provide adequate references; editors and referees will not do the literature search that should have been done by the authors. The references are a matter of review though.

Contributions considered include: Regular Articles (Papers), Short Communications, Review Articles, Conference Proceeding, Book Reviews and Technical Notes, which describe new laboratory methods or substantial improvements of the existing techniques. Regular articles should be about five journal pages or less in length. Short communications are usually confined to the discussion of a single concept and should be about two journal pages in length. Review articles are confined to a broad discussion and should contain the most recent knowledge about the subject.

9.2.2 Organization of manuscript

The first page must include the title, name(s) of author(s), affiliation(s), short running head (no more than 60 characters incl. spaces) and detailed address for correspondence including e-mail.

Organization of the manuscript:

1. Abstract (not exceeding one typed page);
2. Key words - max. 10;
3. Introduction;
4. Materials and methods;
5. Results;
6. Discussion;
7. Acknowledgements (if any);
8. References;

9. Tables (with legends);
10. Figures;
11. Legends to figures.

In References section of article please use following citation style (exactly as it is given):

AMA Citation Style
American Medical Association Manual of Style, 9

Notes:

- **Items are listed** numerically in the order they are cited in the text, not alphabetically.
- **If you are using a typewriter and cannot use *italics*, then use underlining.**
- **Authors:** use initials of first and second names with no spaces. Include up to **six** authors. If there are more than six, include the first **three**, followed by ***et al.*** If no author is given, start with the title.
- **Books:** include the edition statement (ex: **3rd ed.** or **Rev ed.**) between the **title** and **place** if it is not the first edition.
- **Place:** use abbreviations of states, **not** postal codes.
- **Journals:** abbreviate titles as shown in *Index Medicus*. If the journal does **not** paginate continuously through the volume, include the month (and day).
- **Websites:** include the name of the **webpage**, the name of the entire **website**, the full **date** of the page (if available), and the **date you looked at it**.
- The rules concerning a **title within a title** are **not** displayed here for purposes of clarity. See the printed version of the manual for details.
- For documents and situations not listed here, see the printed version of the manual. A similar styleguide is the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Examples of reference style used in the journal for specific types of citing:

Book

1. Okuda M, Okuda D. *Star Trek Chronology: The History of the Future*. New York: Pocket Books; 1993.

Journal or Magazine Article (with volume numbers)

2. Wilcox RV. Shifting roles and synthetic women in Star trek: the next generation. *Stud Pop Culture*. 1991;13:53-65.

Newspaper, Magazine or Journal Article (without volume numbers)

3. Di Rado A. Trekking through college: classes explore modern society using the world of Star trek. *Los Angeles Times*. March 15, 1995:A3.

Encyclopedia Article

4. Sturgeon T. Science fiction. In: Lorimer LT, editorial director; Cummings C, ed-in-chief; Leish KW, managing ed. *The Encyclopedia Americana*. Vol 24. International ed. Danbury, Conn: Grolier Incorporated; 1995:390-392.

Book Article or Chapter

5. James NE. Two sides of paradise: the Eden myth according to Kirk and Spock. In: Palumbo D, ed. *Spectrum of the Fantastic*. Westport, Conn: Greenwood; 1988:219-223.

ERIC Document

6. Fuss-Reineck M. *Sibling Communication in Star Trek: The Next Generation: Conflicts Between Brothers*. Miami, Fla: Annual Meeting of the Speech Communication Association; 1993. ERIC Document Reproduction Service ED364932.

Website

7. Lynch T. DSN trials and tribble-ations review. Psi Phi: Bradley's Science Fiction Club Web site. 1996. Available at: <http://www.bradley.edu/campusorg/psiphi/DS9/ep/503r.htm>. Accessed October 8, 1997.

Journal Article on the Internet

8. McCoy LH. Respiratory changes in Vulcans during pon farr. *J Extr Med* [serial online]. 1999;47:237-247. Available at: http://infotrac.galegroup.com/itweb/nysl_li_liu. Accessed April 7, 1999.

Technical requirements

Illustrations (line drawings and halftones) - either single or mounted in the form of plates, can be 85 mm, 125 mm, or 175 mm wide and cannot exceed the size of 175 x 250 mm. The authors are requested to plan their illustrations in such a way that the printed area is economically used. Numbers, inscriptions and abbreviations on the figures must be about 3 mm high. In case of micrographs, magnification (e.g. x 65 000) should be given in the legend. Calibration bars can also be used.

Tables should be numbered consecutively in arabic numerals and each table must be typed on a separate page.

Legends must begin on a new page and should be as concise as necessary for a self-sufficient explanation of the illustrations. The author is obligated to cover the cost of publication of color page of the manuscript.