



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs2306969 (-6951C>T) NA REGIÃO
REGULATÓRIA DO GENE CODIFICADOR DA α 1,3/4-FUCOSILTRANSFERASE
HUMANA ASSOCIADA AO CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

Recife

2019

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs2306969 (-6951C>T) NA REGIÃO
REGULATÓRIA DO GENE CODIFICADOR DA α 1,3/4-FUCOSILTRANSFERASE
HUMANA ASSOCIADA AO CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

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

Área de concentração: Biologia celular e molecular humana e animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Cíntia Renata Costa Rocha

Coorientador: Prof.^o. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Nascimento, Jessica Catarine Frutuoso do

Análise funcional do polimorfismo rs2306969 (-6951C>T) na região regulatória do gene codificador da α 1,3/4-Fucosiltransferase humana associada ao carcinoma invasivo de mama / Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento. – 2019.

120 f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cíntia Renata Costa Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Mamas – Câncer. 2. Polimorfismo. 3. Marcadores biológicos de tumor.
I. Rocha, Cíntia Renata Costa (orientador). II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (coorientador). III. Título.

614.99465

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 143

JESSICA CATARINE FRUTUOSO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO POLIMORFISMO rs2306969 (-6951C>T) NA REGIÃO
REGULATÓRIA DO GENE CODIFICADOR DA α 1,3/4-FUCOSILTRANSFERASE
HUMANA ASSOCIADA AO CARCINOMA INVASIVO DE MAMA**

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

Aprovada em: 22/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Renata Costa Rocha (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Carlos Henrique Madeiros Castelletti (Examinador Externo)

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Prof^ª. Dr^ª. Dayane Aparecida Gomes (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho foi fruto de uma grande rede de apoio formada durante estes 4 anos. Durante esta jornada consegui, com a ajuda destas pessoas e para muito além da aquisição de conhecimento científico, aprender sobre a importância do trabalho em grupo, do respeito e das relações interpessoais durante o processo educativo.

Aos meus queridos e eternos orientadores Prof^a. Cíntia Rocha e Prof^o. Eduardo Beltrão.

Aos meus colegas do grupo Biomarcadores no Câncer (BmC), em especial as minha amigas e companheiras de frustrações e alegrias cotidianas Rosilda Cintra e Maria Aparecida Seabra.

As pacientes do setor de Mastologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco que doaram voluntariamente suas informações e materiais biológicos para a realização deste trabalho.

A toda a equipe de Mastologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Dr. George Siqueira por demonstrar toda sua humanidade e entusiasmo científico durante nossos encontros.

Ao Prof^o. João Ricardo e Laboratório de Neuroimunogenética do LIKA, ao Prof^o Sergio Crovella, a Prof^a. Dayane Gomes e Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo e a Prof^a Adriana Fontes e Laboratório de Biofísica Química pelo fornecimento de reagentes e auxílio técnico durante a execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) e todo seu corpo técnico, em especial ao setor de Patologia e ao setor de Biologia Molecular, por fornecerem a estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

A minha família, meu companheiro e amigos por trazerem sentido a tudo que faço.

Muito Obrigada!

RESUMO

Glicanos fucosilados sintetizados pela α 1,3/4-fucosiltransferase (FUT3) desempenham papéis importantes nos processos de metástase e vigilância imunológica no câncer. Estudo realizado em pacientes com câncer de mama invasivo mostrou que FUT3 está reduzida em tumores mamários quando comparados a tecidos normais. A análise da região promotora do gene codificador da FUT3 revelou que o alelo minoritário T no polimorfismo rs2306969 (-6951C>T) está associado à presença da doença, mas a sua influência na expressão da proteína é desconhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do polimorfismo rs2306969 (-6951C>T) na transcrição e expressão proteica da α 1,3/4-fucosiltransferase em paciente com carcinomas invasivos de mama e investigar as possíveis consequências dos diferentes níveis desta enzima sobre características fenotípicas tumorais em diferentes populações. A possível influência dos diferentes genótipos do polimorfismo rs2306969 sobre a expressão proteica em células tumorais mamárias foi avaliada *in vitro* através do ensaio do gene repórter Luciferase e *ex vivo* pela análise das expressões gênica e proteica de FUT3 em 29 tumores mamários invasivos. Ambos os sistemas demonstraram que o polimorfismo rs2306969 não modifica significativamente a expressão de FUT3. Após a análise da relação entre a expressão tumoral desta enzima e as características histopatológicas da doença em 47 pacientes brasileiras, a expressão de FUT3 se mostrou maior em pacientes diagnosticados antes dos 50 anos e naqueles que não apresentaram invasão vascular. Adicionalmente, dados clínicos e de expressão gênica de duas coortes independentes de pacientes com câncer de mama (METABRIC, 1904 pacientes; TCGA, 816 pacientes) foram obtidos e esta mesma análise foi realizada. Para a coorte METABRIC, os níveis de *FUT3* se mostraram elevados em pacientes jovens (idade < 50 anos) e em tumores com maior grau histológico. Já para a coorte TCGA, a expressão de *FUT3* foi maior em pacientes com estágios tumorais I e II e que não apresentaram envolvimento linfonodal. Em ambas as coortes os tumores positivos para os receptores de estrógeno e progesterona apresentaram menores níveis de *FUT3*. Já os tumores positivos para HER-2 apresentaram maior expressão deste gene. Análises uni- e multivariadas mostraram que a expressão elevada do *FUT3* está consistentemente relacionada à menor sobrevida global dos pacientes quem compõem a coorte TCGA e o subgrupo de pacientes triplo-negativos da população METABRIC. Estes dados apontam para o uso potencial do *FUT3* como biomarcador prognóstico nesta doença.

Palavras-chave: Câncer de Mama. α 1,3/4-Fucosiltransferase. Rs2306969. Biomarcador.

ABSTRACT

Fucosylated glycans synthesized by α 1,3 4-fucosyltransferase (FUT3) play an important role in metastasis and in cancer immune surveillance. Study conducted in patients with invasive breast cancer showed that FUT3 is reduced in mammary tumors when compared to normal tissues. Analysis of FUT3-encoding gene's promoter region revealed that the minority allele T in the polymorphism rs2306969 (-6951C> T) is associated with the presence of the disease. This study aimed to evaluate the impact of the polymorphism rs2306969 (-6951C> T) in the transcription and protein expression of α 1,3/4-fucosyltransferase in patients with invasive breast carcinomas and to investigate the possible consequences of different enzyme levels on tumor phenotypic characteristics in different populations. The possible influence of different genotypes of rs2306969 polymorphism on protein expression in mammary tumor cells was evaluated *in vitro* by Luciferase reporter assay and *ex vivo* by the analysis of FUT3 gene and protein expression in 29 invasive mammary tumors. Both systems demonstrated that rs2306969 polymorphism does not significantly modify FUT3 expression. After analyzing the relationship between tumor expression of this enzyme and the disease histopathological characteristics in 47 Brazilian patients, FUT3 expression was higher in patients diagnosed before age 50 and in those who did not present vascular invasion. In addition, clinical and gene expression data from two independent cohorts of breast cancer patients (METABRIC, 1904 patients; TCGA, 816 patients) were obtained and the same analysis was performed. For METABRIC cohort, *FUT3* levels were elevated in young patients (age <50 years) and in tumors with high histological grade. For TCGA cohort, the expression of FUT3 was higher in patients with tumor stages I and II and who did not present lymph node involvement. In both cohorts, tumors positive to estrogen and progesterone receptors had lower *FUT3* levels. In contrary, HER-2 positive tumors showed higher expression of this gene. Uni- and multivariate analyses showed that elevated *FUT3* expression is consistently associated to reduced overall survival in the patients that compose the TCGA cohort and the triple-negative subgroup of the METABRIC population. These data point out to the potential use of *FUT3* as a prognostic biomarker in this disease.

Keywords: Breast Cancer. α 1,3/4-Fucosyltransferase. Rs2306969. Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 –	Carcinomas ductais <i>in situ</i> de mama.....	21
Figura 2 –	Modelos explicativos para a instabilidade genômica tumoral.....	25
Figura 3 –	(A) Estrutura da L-fucose (B) Processo exemplificado de síntese da GDP-Fucose pelas vias de novo e selvagem e posterior fucosilação.....	30
Figura 4 –	Representação da estrutura gênica, dos transcritos e proteica de FUT3.....	32
Figura 5 –	Estrutura dos antígenos de Lewis ligados as cadeias de carboidratos do tipo 1 (a esquerda) e 2 (a direita).....	34

Metodologia

Fluxograma 1 –	Fluxograma metodológico aplicado na elaboração dos artigos 1 e 2 desenvolvidos nesta tese.....	39
----------------	--	----

Artigo 1

Figure 1 –	Evaluation of the role of polymorphism rs2306969 (-6951 C> T, position related to the gene's translation start sites) in FUT3 expression in invasive breast tumors.....	54
------------	---	----

Artigo 2

Figure 1 –	Gene (A; treated, n = 10, not-treated, n = 33) and protein (B; treated, n = 14, not-treated, n = 29) expressions of α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT3) in Brazilian invasive breast cancer patients who were (yes) or were not (no) submitted to neoadjuvant chemotherapy.....	62
Figure 2 –	Kaplan Meier overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) curves of invasive breast cancer patients categorized according to <i>FUT3</i> levels.....	68

LISTA DE QUADROS

Revisão de literatura

Quadro 1 –	Principais características apresentadas pelas células tumorais.....	19
Quadro 2 –	Graduação histológica do carcinoma ductal <i>in situ</i> de mama e suas principais características.....	21
Quadro 3 –	Classificação molecular dos tumores mamários de acordo com a 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2013).....	23
Quadro 4 –	Lista de glicoproteínas comumente utilizadas como biomarcadores na prática clínica.....	29
Quadro 5 –	Alterações no padrão de fucosilação e expressão de fucosiltransferases e fucosidases em tumores sólidos.....	31

LISTA DE TABELAS

Metodologia

Tabela 1 –	Iniciadores para a reação de PCR em tempo real do gene-alvo e genes de referência utilizados no presente estudo.....	41
------------	--	----

Artigo 2

Table 1 –	FUT3 gene and protein expression in Brazilian invasive breast cancer patients according to their clinical and histopathological characteristics.....	63
Table 2 –	<i>FUT3</i> expression in invasive breast cancer patients from METABRIC and TCGA cohorts according to their clinical and histopathological characteristics.....	67
Table 3 –	Uni- and multivariate analyses of breast cancer patients' overall survival in METABRIC and TCGA cohorts according to FUT3 levels and clinical and histopathological characteristics.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampere
Apo2L/TRAIL	Ligante Apo2 ou Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
Asn	Asparagina
Bik	<i>BCL2 Interacting Killer</i>
BRCA1	Gene de susceptibilidade ao câncer de mama 1
BRCA2	Gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2
BSA	Albumina sérica bovina
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cDNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
cm ²	Centímetros quadrados
c-Myc	Myc proto-oncogene
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Dideoxynucleotídeo trifosfatado
DR4	Receptor de morte 4
DR5	Receptor de morte 5
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FUCA1	α -L-Fucosidase 1
FUT	Fucosiltransferase
FUT3	α 1,3/4-fucosiltransferase
FUT4	Fucosiltransferase 4
FUT6	Fucosiltransferase 6
FUT7	Fucosiltransferase 7
FUT8	Fucosiltransferase 8
FUT9	Fucosiltransferase 9
g	Força gravitacional
GalNAc	N-acetil-galactosamina
GHN	Grau histológico de Nottingham
Gal	Galactose
GDP	Guanosina difosfato
Glc	Glicose

GlcNAc	N-Acetil-glicosamina
h	Hora
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
Her-2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
HNF1 α	Fator Nuclear de Hepatócitos 1 α
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
LB	Meio Luria Bertani
LncRNA	RNA não-codificante longo
M	Molar
Man	Manose
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ms	Milisegundo
N ₂	Nitrogênio
NcRNA	RNA não-codificante
NF κ B	Fator nuclear κ B
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAPP-1	Papalisina 1
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppGalNAcT	Peptídeo-N-acetilgalactosaminiltransferase
p/v	peso/volume
qPCR	PCR em tempo real

RNA	Ácido Ribonucleico
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	Segundo
Ser	Serina
sLe ^a	Antígeno sialil Lewis A
sLe ^x	Antígeno sialil Lewis X
SnRNA	RNA não-codificante pequeno
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
Thr	Treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNM	Estadiamento Tumor, Nodo e Metástase
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
U	Unidades Internacionais
UDP-GalNAc	Uridina difosfato-N-acetil-galactosamina
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato-N-acetil-glicosamina
V	Volts
v/v	volume/volume
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
°C	Graus centígrados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	HIPÓTESE	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo Geral.....	18
1.2.2	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	O CÂNCER	19
2.2	CÂNCER DE MAMA	20
2.2.1	Classificação e graduação histológica	20
2.2.2	Estadiamento TNM e classificação molecular	22
2.3	A GENÉTICA DO CÂNCER	23
2.4	GLICOCONJUGADOS E O CÂNCER	26
2.4.1	Glicosilação	26
2.4.2	Alterações glicobiológicas no câncer.....	27
2.4.3	Fucosilação	28
2.4.4	α -1,3/4-Fucosiltransferase (FUT3)	29
2.4.5	FUT3 e o câncer	33
2.4.6	Variabilidade genética do <i>FUT3</i>	36
2.5	BIOINFORMÁTICA NA DESCOBERTA DE NOVOS BIOMARCADORES NO CÂNCER.....	37
3	METODOLOGIA.....	39
3.1	SELEÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	39
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM	40
3.3	EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR E qPCR.....	40
3.4	EXTRAÇÃO PROTEICA E <i>WESTERN BLOTTING</i>	41

3.5	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA EXPRESSÃO DE <i>FUT3</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES	42
3.6	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE GENE REPÓRTER LUCIFERASE CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>FUT3</i>	43
3.7	ENSAIO DE EXPRESSÃO DO GENE REPÓRTER LUCIFERASE	44
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4	RESULTADOS	46
4.1	ARTIGO 1 – “THE CHALLENGE OF DETERMINING THE IMPACT OF <i>FUT3</i> TUMOR-ASSOCIATED POLYMORPHISM RS2306969 (-6951 C> T) IN INVASIVE BREAST CANCER CELLS”.....	46
4.2	ARTIGO 2 – “ <i>FUT3</i> AS A BIOMARKER IN BREAST CANCER: RESEMBLANCE AND DIVERSENES AMONG DISTINCT HUMAN POPULATIONS.”	58
5	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – ARTIGO EXTRA DESENVOLVIDO DURANTE O PERÍDO DO DOUTORADO ENTITULADO “CHARACTERIZATION OF SIGLEC-7+ AND SIGLEC-9+ IMMUNE INFILTRATE IN INVASIVE BREAST TUMORS”	90
	APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS PELA AUTORA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO (2015-2019).....	103
	ANEXO A – PARECER COSUBISTÂNCIADO DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE	108
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	112
	ANEXO C – LAUDO DE AUTENTICAÇÃO CELULAR	116

1 INTRODUÇÃO

Homens e mulheres convivem diariamente com o risco de desenvolverem doenças, sejam elas de menor ou maior complexidade. Algumas delas apresentam altas probabilidades de ocorrerem, tais como um resfriado ou uma infecção bacteriana. Com o aumento da expectativa de vida da população doenças ligadas à idade estão se tornando cada vez mais comuns, e dentre elas está o câncer. Para as mulheres, o desenvolvimento do câncer de mama é uma preocupação constante devido aos seus altos índices de incidência mundial. No Brasil, o câncer de mama é o mais frequente entre mulheres e sua mortalidade vem crescendo ao longo dos anos.

Embora o câncer de mama se mantenha como o responsável pelo maior número de óbitos entre mulheres com câncer no Brasil, programas de *screening* populacional vêm se mostrando eficazes no diagnóstico precoce da doença e consequentemente na redução do número de óbitos em decorrência da mesma. Ademais, a implementação do uso de marcadores prognósticos e de resposta terapêutica tem tornado o direcionamento de pacientes mais eficaz. Diante deste cenário, a descoberta de novas moléculas que possam ser utilizadas no diagnóstico, prognóstico e/ou seleção/acompanhamento terapêutico do câncer de mama poderão contribuir para a melhoria do tratamento oncológico e consequentemente reduzir a mortalidade da doença.

A pesquisa por novos biomarcadores tumorais inclui a análise de diferentes tipos de biomoléculas, desde variações encontradas no DNA até metabólitos. A glicosilação é um processo complexo e altamente modulado por condições genético-ambientais, o que a torna uma fonte potencial de marcadores biológicos. O padrão de glicosilação é modificado durante a oncogênese e a progressão tumoral em decorrência, em partes, da alteração nas atividades de glicosiltransferases. A fucosilação, processo caracterizado pela transferência de resíduos de L-fucose para glicanos aceptores, representa um dos principais tipos de glicosilação alterados no câncer, incluindo o câncer de mama. Desta forma, analisar moléculas envolvidas nesta via pode trazer novas informações a respeito da fisiopatologia da doença e de como elas podem ser usadas como biomarcadores no câncer de mama.

O gene *FUT3* é responsável por codificar a $\alpha 1,3/4$ -fucosiltransferase. Esta enzima é responsável por sintetizar os antígenos de Lewis, sialil Lewis X (sLe^x) e sialil Lewis A (sLe^a), encontrados em altos níveis no câncer de mama. *FUT3* está envolvida em diversas vias relacionadas à progressão tumoral, ora atuando em mecanismos pró-tumorais tais como na migração e invasão celular e transição epitélio-mesenquimal, ora em mecanismos antitumorais relacionados à morte celular mediada pelo sistema imune inato. Estudo prévio realizado por nosso grupo demonstrou que tumores mamários apresentam níveis reduzidos de *FUT3* e maior

frequência do alelo minoritário T do polimorfismo rs2306969 (-6951C>T), localizado na região promotora de *FUT3*, em comparação com tecidos saudáveis. Estes dados em conjunto nos levaram a questionar qual o real impacto desta variação sobre a expressão de FUT3 em pacientes com câncer de mama e qual o valor da medição dos níveis tumorais desta glicosiltransferase como biomarcador prognóstico nesta doença. As respostas para estas perguntas constituem o tema central desta tese.

1.1 HIPÓTESE

As informações obtidas anteriormente por trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa sobre a associação do polimorfismo rs2306969 (-6951C>T) ao câncer de mama, assim como a baixa expressão de FUT3 em tumores mamários e a análise da literatura atual sobre o papel desta enzima em vias pró e antitumorais, baseiam a hipótese testada neste trabalho. Esta hipótese preconiza que a presença do alelo minoritário T, em detrimento do alelo majoritário C, no referido polimorfismo resultaria na perda de um ou mais sítios de ligação para importantes fatores de transcrição, resultando na redução da transcrição e consequentemente da síntese de FUT3. Níveis reduzidos desta enzima e de seus produtos em células mamárias em transformação preveniriam o reconhecimento pelo sistema imune inato das células modificadas, e as tornariam menos sensíveis ao processo de morte induzido por fatores externos. Esta cascata de eventos resultaria em evasão imunológica das células transformadas e permitiria o estabelecimento do tumor primário. Baixos níveis desta enzima durante a progressão tumoral manteriam as células tumorais invisíveis à ação imunológica durante todo o processo de metástase, facilitando-o, o que culminaria no risco de morte aumentado e consequentemente menor tempo de sobrevida em pacientes com câncer de mama.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do polimorfismo rs2306969 (-6951C>T, nomenclatura HGVS: NG_007482.1:g.4685T>C) do gene *FUT3* na transcrição e expressão proteica da enzima α 1,3/4-fucosiltransferase em pacientes com carcinomas invasivos de mama e investigar as possíveis consequências dos diferentes níveis de expressão desta enzima sobre características fenotípicas tumorais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar *in vitro* a capacidade promotora da região regulatória do gene *FUT3* com diferentes genótipos para o polimorfismo rs2306969 (-6951C>T); os genótipos a serem analisados serão FUT3_WT (-6951 CC) e FUT3_MT (-6951 TT);
- Comparar os níveis de mRNA e proteína codificados pelo gene *FUT3* expressos por indivíduos com diferentes genótipos para o polimorfismo rs2306969 (-6951C>T) em pacientes com carcinomas invasivos de mama;
- Avaliar a possível correlação entre os diferentes níveis de expressão do gene *FUT3* e as características clínicas e histopatológicas dos pacientes na população local;
- Avaliar por bioinformática a possível correlação entre os diferentes níveis de expressão do gene *FUT3* e as características clínicas e histopatológicas de outras populações, comparando os perfis encontrados com o da população local;
- Investigar por bioinformática a importância prognóstica da expressão do gene *FUT3* no carcinoma invasivo de mama em diferentes populações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CÂNCER

O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado, podendo invadir tecidos adjacentes e/ou sítios distantes. Mais do que apenas células em processo de divisão celular contínuo, hoje se sabe que os tumores são tecidos compostos por células tumorais e células normais associadas que interagem umas com as outras. A transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é um processo progressivo onde a mesma adquire características que a tornam tumoral e finalmente maligna, ou seja, permitem seu crescimento celular e disseminação metastática (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Estas características são conhecidas como *Hallmarks* do câncer e estão sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 1: Principais características apresentadas pelas células tumorais.

Característica tumoral	Definição
Instabilidade genômica	Aumento das taxas de mutação
Inflamação	Resposta inflamatória induzida pelo tumor
Sinalização proliferativa sustentada	Capacidade das células tumorais de entrarem e progredirem no ciclo celular de maneira desregulada e contínua
Evasão a supressores de crescimento	Capacidade das células tumorais de contornar os programas que regulam negativamente a proliferação celular
Resistência a morte celular	Capacidade das células tumorais de desenvolverem estratégias que limitam as vias de morte celular programada
Imortalidade replicativa	Capacidade das células tumorais de sofrer ilimitados ciclos de crescimento/divisão sem entrar em senescência ou crise
Indução da angiogênese	Capacidade das células tumorais de induzir a formação de novos vasos sanguíneos associados ao tumor
Invasão e metástase	Capacidade das células tumorais de alterar seu formato e ligação com outras células e/ou a matriz celular, favorecendo a invasão local e metástase
Reprogramação do metabolismo energético	Capacidade das células tumorais de ajustar seu metabolismo energético a fim de manter seu crescimento e divisão celular
Evasão a vigilância imunológica	Capacidade das células tumorais de evitar a detecção e/ou ação efetora das células do sistema imunológico

Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011)

Aproximadamente 18,1 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados no mundo em 2018. Além de altamente incidente, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, correspondendo a 9,6 milhões de mortes no mesmo ano (BRAY et al., 2018). Mais da metade dos casos incidentes dos óbitos relacionados ao câncer ocorrem em país em desenvolvimento, tais como o Brasil. Nesses países o câncer de pulmão e o de mama representam os tumores mais incidentes e os responsáveis pelo maior número de óbitos entre as populações masculina e feminina, respectivamente (TORRE et al., 2015). No Brasil, o câncer de mama é o mais incidente na população feminina, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, representando 29,5% dos novos casos anuais. Para os homens, os tumores de

próstata são os mais frequentes, representando 31,7% dos casos. Em Pernambuco, estimou-se 2680 novos casos de câncer de mama para o ano de 2018 e 3050 novos casos de câncer de próstata, onde aproximadamente 85% e 77% destes ocorreram na cidade do Recife, respectivamente (INCA, 2017).

2.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o câncer que se desenvolve primariamente a partir de células do tecido mamário. Devido à grande heterogeneidade dos tumores mamários, várias classificações vêm sendo propostas visando à precisão do prognóstico da doença e a determinação do seu manejo terapêutico (MALHOTRA et al., 2010).

2.2.1 Classificação e graduação histológica

A classificação histológica do câncer de mama baseia-se nas características celulares e teciduais da lesão. Nesta, o câncer de mama é subdividido em carcinomas in situ, que se restringem ao ducto ou lóbulo afetado, e em carcinomas invasivos, onde ocorre a infiltração dos tecidos adjacentes por células tumorais, apresentando este um maior poder metastático (LAKHANI et al., 2012).

As lesões mamárias in situ são subclassificadas em ductais e lobulares. O carcinoma ductal in situ (CDIS) é caracterizado por uma proliferação intraductal de células epiteliais neoplásicas, sem que ocorra invasão do estroma através da membrana basal. Embora pouco letal, o CDIS é considerado um precursor para o desenvolvimento de lesões invasivas de alto risco. O CDIS pode ainda ser subclassificado de acordo com a morfologia da lesão e graduado de acordo com o grau nuclear sozinho, ou em combinação com presença/ausência de necrose e/ou polarização celular (Quadro 2) (Figura 1) (MAKKI, 2015). O carcinoma lobular in situ se desenvolve nos lóbulos mamários mantendo sua arquitetura, sem invasão do estroma. Há ainda outras lesões não-invasivas menos frequentes, tais como a doença de Paget do mamilo, caracterizada por presença de células tumorais na epiderme do mamilo, e o carcinoma microinvasivo, definido por extensas lesões de CDIS que contêm um ou mais focos de infiltrações do estroma que não ultrapassem 1 mm de diâmetro (NHSBSP, 2005).

Dentre os tumores invasivos de mama, o carcinoma invasivo do tipo não especial, anteriormente conhecido como carcinoma ductal invasivo, é o tumor mais frequente e assim definido por ser grupo heterogêneo de tumores que não apresenta as características específicas que diferenciam outros tipos de tumores mamários (SINN e KREIPE, 2013). Pacientes com carcinoma invasivo do tipo não especial são normalmente diagnosticados com graus mais avançados da doença. Entretanto este subtipo apresenta menores taxas de envolvimento

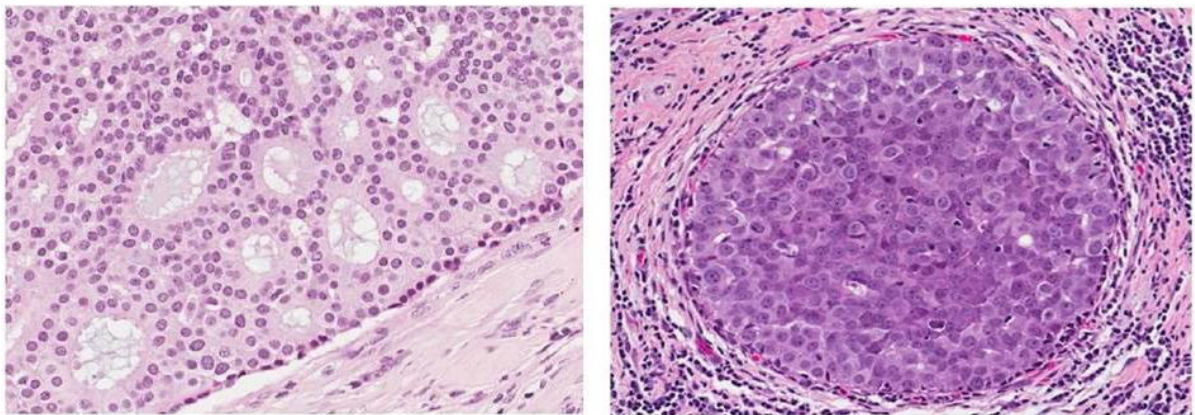
linfático e maior sobrevida global e livre da doença que aquele verificado em pacientes com carcinoma lobular, tipo menos frequente de carcinoma invasivo de mama (CHEN et al., 2017). Outros tipos menos comuns de lesões invasivas são o carcinoma lobular invasivo, tubular, cribiforme, mucinoso, com elementos medulares, metaplásico, apócrino, micropapilar invasivo e papilar invasivo (GOBBI, 2012).

Quadro 2: Graduação histológica do carcinoma ductal *in situ* de mama e suas principais características.

Grau	Características histológicas
Baixo	Células pequenas, arredondadas, de tamanho e núcleo uniformes, nucléolo discreto, cromatina regular e raras figuras de mitose.
Intermediário	Células morfológicamente semelhantes ao CDIS de baixo grau, entretanto apresentam necrose intraluminal e/ou cromatina densa.
Alto	Atipia celular, núcleo pleiomórfico com contornos irregulares e nucléolo proeminente, figuras de mitose frequentes.

Fonte: Adaptado de Makki (2015)

Figura 1: Carcinomas ductais *in situ* de mama. A esquerda: lesão classificada como baixo grau; a direita: lesão classificada como alto grau. Microscopia óptica de tumores corados com hematoxilina e eosina.



Fonte: Adaptado de Bane (2013)

Carcinomas invasivos de mama também são classificados de acordo com seu grau de diferenciação, assim com o CDIS. O grau histológico de Nottingham (GHN), revisado por Page, Ellis e Elston em 1995, reflete o quão próximo de um tecido epitelial normal está o tecido tumoral (RAKHA et al., 2010). Para tal, essa classificação leva em consideração o grau de formação de túbulos/glândulas, a atipia nuclear/pleomorfismo e o índice mitótico. Cada uma dessas características é graduada de 1 a 3 e a soma dos valores é utilizada para definir o grau histológico final. Totalizando valores de 3 a 5 o tumor recebe o grau histológico 1 ou bem diferenciado, apresentando, portanto, a maior homologia com o tecido normal. Valores de 6 a 7 caracterizam um tumor grau 2 ou moderadamente diferenciado e valores de 7 a 9 indicam um

tumor grau 3 ou pouco diferenciado (NHSBSP, 2005). O GHN apresenta um grande valor prognóstico, onde tumores bem diferenciados (grau 1) apresentam melhor prognóstico enquanto que tumores mal diferenciados (grau 3) são os de prognóstico reservado, apresentando alto risco de recorrência e metástase precoces. Tais informações são de fundamental importância para a definição do manejo terapêutico apropriado para diferentes pacientes com neoplasia mamária (EHINGER et al., 2016)

2.2.2 Estadiamento TNM e classificação molecular

Além da classificação histológica, o câncer de mama pode ser classificado de acordo com o seu estágio anatômico através do sistema TNM. Este sistema baseia-se na extensão do tumor primário (representado pela letra 'T' na sigla TNM), presença/ausência de metástase nos linfonodos regionais bem como sua extensão (representado pela letra 'N') e presença/ausência de metástase distante (representado pela letra 'M'). Números acompanhando as letras indicam a extensão de cada uma das características, a letra 'x' indica que aquela característica não pode ser avaliada e a expressão 'is' significa in situ. A combinação das três características determina o estágio global do paciente (GIULIANO et al., 2017). O valor preditivo do sistema TNM no câncer de mama ainda é questionável e essa classificação não deve ser utilizada sozinha e sim em conjunto com a graduação histológica e classificação molecular do tumor para definição de prognóstico e manejo terapêutico (PARK et al., 2011; GIULIANO et al., 2017).

Embora os carcinomas mamários sejam rotineiramente classificados de acordo com sua histologia e extensão anatômica, tumores agrupados em um mesmo subtipo patológico podem apresentar evoluções e respostas diferentes às terapias. Isso acontece porque tais sistemas de classificação não são capazes de cobrir toda a heterogeneidade biológica apresentada pelos tumores de mama. Com o objetivo de obter uma classificação eficiente na definição de prognóstico, a 12ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2011) adotou a classificação molecular de carcinomas mamários.

A classificação molecular do câncer de mama utiliza a técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) e do marcador nuclear de proliferação celular Ki-67. Os níveis de expressão desses marcadores diferenciam os tumores mamários em cinco classes: Luminal A, Luminal B HER-2 negativo, Luminal B HER-2 positivo, Superexpressão de HER-2 e Triplo-negativo (GOLDHIRSCH e WOOD, 2011). Após modificações realizadas pela 13ª edição desta mesma conferência ocorrida em 2013, a classificação molecular do câncer de mama passou a ser determinada de acordo com o Quadro

3 (SERRA et al., 2014). A expressão like foi adicionada a nomenclatura dos tumores dos subtipos luminal A e B devido às dificuldades encontradas na padronização do status de marcação do Ki-67 entre laboratórios (CURIGLIANO et al., 2017). Tumores classificados como Luminais A like apresentam o melhor prognóstico, com probabilidade de morte decorrente da doença inferior a 1% em dois anos e de 7,1% em 10 anos. O prognóstico mais reservado está relacionado a tumores triplo-negativos, com probabilidade de morte decorrente da doença de 17% em 10 anos (CAAN et al., 2014).

Quadro 3: Classificação molecular dos tumores mamários de acordo com a 13ª Conferência Internacional de Câncer de Mama em Saint Gallen (2013).

Subtipo molecular	Status por imunohistoquímica	Prognóstico
Luminal A like	HER-2 negativo RE positivo RP positivo ($\geq 20\%$) e Ki-67 baixo ($< 14\%$)	Bom
Luminal B like	HER-2 negativo RE positivo RP negativo ou positivo ($< 20\%$) ou Ki-67 alto ($> 14\%$)	Intermediário
Luminal B HER-2 positivo	HER-2 positivo RE positivo Qualquer valor de RP ou Ki-67	Reservado
Superexpressão de HER-2	HER-2 positivo RE negativo RP negativo	Reservado
Triplo-negativo	HER-2 negativo RE negativo RP negativo	Reservado

Fonte: Adaptado de Serra et al. (2014), Dai et al. (2015) e Curigliano et al (2017)

2.3 A GENÉTICA DO CÂNCER

Em 2001, Alfred G. Knudson caracterizou a carcinogênese com um processo dependente de um ou mais eventos mutacionais que afetam vias celulares envolvidas no seu crescimento e/ou morte. Para Knudson são necessárias em média duas mutações para desencadear a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, mutações estas provavelmente de caráter recessivo em dois alelos de um mesmo gene. Enquanto a primeira mutação poderia ser germinativa, em casos familiares de câncer, ou somática, a segunda mutação seria necessariamente somática. Esta teoria denominada de hipótese de Knudson também ressalva que alguns tumores podem necessitar de mais ou menos eventos genéticos para se desenvolverem e isso depende de fatores como a taxa mutacional e mitótica do tecido afetado, bem como as vantagens evolutivas conferidas pelas primeiras alterações (KNUDSON, 2001).

Os genes afetados pelos eventos mutacionais pontuados por Knudson em sua hipótese podem ser classificados como proto-oncogenes ou como genes supressores tumorais. Proto-

oncogenes são genes envolvidos no controle da proliferação celular que ao sofrerem mutações de ganho de função estimulam o crescimento, divisão e sobrevivência celular e são então chamados de oncogenes. Por sua vez, os genes supressores tumorais são genes relacionados ao reparo do DNA e/ou a ativação de pontos de checagem do ciclo celular que ao sofrerem mutações de perda de função permitem o crescimento celular ilimitado (LEE e MULLER, 2010).

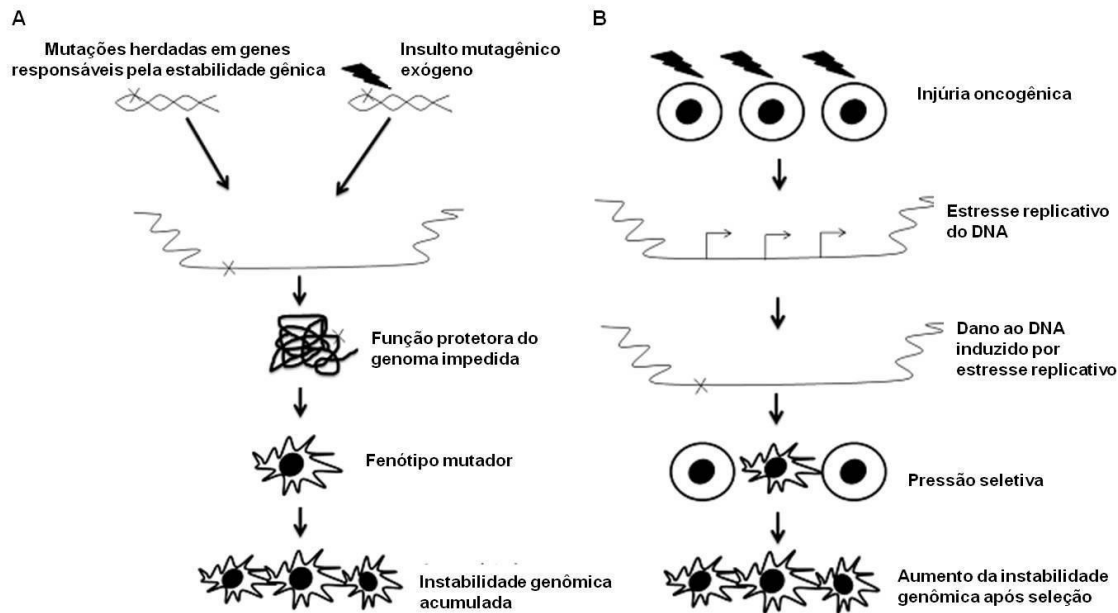
Durante a progressão tumoral as células transformadas adquirem instabilidade genômica, condição definida pelo aumento da frequência de alterações gênicas na célula tumoral, tais como mutações de base única, instabilidade de microssatélite, e alteração no número e estrutura dos cromossomos. Duas hipóteses foram levantadas a fim de explicar o desenvolvimento da instabilidade genômica nas células tumorais. A hipótese do fenótipo mutador afirma que mutações herdadas ou adquiridas em genes responsáveis pela manutenção gênica causariam a instabilidade genômica ainda em lesões pré-malignas e o aumento na taxa de mutações impulsionaria o desenvolvimento tumoral (Figura 2A). Já a hipótese do estresse replicativo induzido por oncogene defende que as lesões pré-malignas seriam fruto de mutações em oncogenes. Essas alterações levariam ao aumento na taxa proliferativa da célula que por sua vez geraria danos ao DNA devido ao estresse replicativo, resultando na instabilidade genômica. Tais células seriam então selecionadas devido suas vantagens proliferativas (Figura 2B) (YAO e DAI, 2014).

A instabilidade genômica gera o aumento no número de variações encontradas no genoma tumoral, entretanto nem todas elas são capazes de gerar vantagens proliferativas às células. As mutações capazes de gerar direta ou indiretamente vantagens proliferativas às células são chamadas de drivers, enquanto que as mutações geradas que não conferem tais vantagens são chamadas de passengers (VOGELSTEIN et al., 2013). De fato, a maioria das variações gênicas encontradas em tumores mamários é classificada como passenger (PEREIRA et al., 2016; NIK-ZAINAL et al. 2016).

Por muito tempo a busca por variações drivers que estivessem condicionando a carcinogênese em diversos tumores focou na análise das regiões exômicas, ou seja, regiões diretamente responsáveis pela codificação das proteínas, por acreditar-se que elas seriam funcionalmente mais relevantes. Essa abordagem também foi preferencialmente eleita devido aos menores custos das tecnologias de sequenciamento de exoma total em relação ao sequenciamento de genoma total. A popularização e redução nos custos do sequenciamento de genoma total juntamente com o conhecimento de que a maior parte do genoma humano é formado por regiões não codificantes impulsionou a pesquisa de variações nessas áreas. Assim como para regiões codificantes, as alterações em regiões não-codificantes podem ser do tipo

variações de nucleotídeo único, inserções e deleções e variações estruturais maiores, tais como as amplificações e rearranjos (KHURANA et al., 2016).

Figura 2: Modelos explicativos para a instabilidade genômica tumoral. (A) Modelo do genótipo mutador e (B) modelo do estresse replicativo induzido por oncogene.



Fonte: Adaptado de Yao e Dai (2014)

As regiões não-codificantes constituem geralmente regiões regulatórias do tipo *cis* ou expressam RNAs não codificantes (ncRNAs, do inglês *non-coding RNAs*). As regiões regulatórias do tipo *cis* são regiões que modulam a expressão de genes presentes numa mesma molécula de DNA, sejam eles subsequentes a essas regiões regulatórias ou distantes na estrutura primária, mas aproximados pelo dobramento tridimensional do DNA. Promotores e elementos distais (potenciadores, silenciadores e isoladores) exercem seu papel regulatório através dos fatores de transcrição, proteínas capazes de se ligarem a sequências específicas de DNA (motivos) e modular a expressão gênica (KHURANA et al., 2016).

Os ncRNAs por sua vez são moléculas de RNA transcritas, mas que não são traduzidas a proteínas. Os ncRNAs mais conhecidos são os RNAs ribossomais e transportadores, entretanto duas outras classes de ncRNAs que apresentam papel na regulação transcricional e pós-transcricional são os RNAs não-codificantes pequenos (sncRNAs, do inglês *small non-coding RNAs*) e grandes (lncRNAs, do inglês *long non-coding RNAs*) (FERREIRA e ESTELLER, 2018).

Deste modo, variações nas regiões não-codificantes do DNA são capazes de impactar diretamente na expressão dos seus genes-alvo, incluindo possivelmente genes envolvidos nos processos oncogênicos. No câncer de mama aproximadamente 98% das variações de

nucleotídeo único encontradas estão localizadas em regiões não-codificantes do DNA (KHURANA et al., 2016). Tais variações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, genes estes importantes para a carcinogênese mamária, já foram funcionalmente validadas mostrando seu impacto na expressão gênica (SANTOS et al., 2017).

2.4 GLICOCONJUGADOS E O CÂNCER

2.4.1 Glicosilação

Os carboidratos são moléculas orgânicas formadas pela união de unidades monossacarídicas através de ligações glicosídicas, formando oligo- ou polissacarídeos com tamanhos variados. Os carboidratos encontram-se muitas vezes ligados covalentemente a proteínas ou lipídios, na forma de glicoconjugados. Os carboidratos apresentam papel indispensável no metabolismo energético, são importantes componentes estruturais da célula e são intermediários na comunicação célula-célula e célula-matriz extracelular. Glicoconjugados localizados na superfície celular estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, diferenciação e crescimento celular, inibição por contato, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, interação hospedeiro-patógeno, resposta imunológica, tráfico intracelular, rigidez membranar, desdiferenciação e metástase (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011).

Os glicoconjugados localizados na superfície celular ou secretados por organismos eucarióticos são em sua maioria sintetizados e processados pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi em um processo denominado glicosilação. As reações de glicosilação utilizam formas ativadas de monossacarídeos, geralmente açúcares ligados a nucleotídeos, como doadores para a ação das glicosiltransferases, enzimas responsáveis pela inserção de açúcares nos glicoconjugados em formação. Esses doadores são, na grande maioria dos casos, sintetizados no citoplasma e transportados ativamente via bicamada lipídica para o lúmen do retículo endoplasmático. As glicosidases são enzimas que atuam inversamente a ação das glicosiltransferases removendo unidades monossacarídicas dos glicoconjugados. É a partir da ação sequencial de várias glicosiltransferases e/ou glicosidases que há a formação do glicano final (VARKI et al., 2017).

As glicoproteínas são os principais representantes celulares dos glicoconjugados. Nessas macromoléculas os oligossacarídeos podem se ligar covalentemente à porção não-glicana proteica de duas maneiras diferentes, formando N- ou O-glicanos. N-glicanos são oligossacarídeos que se ligam via N-acetilglicosamina (GlcNAc) a porção amida da cadeia lateral do resíduo de Asparagina (Asn), localizada no domínio Asn-X-Ser/Thr, sendo X

qualquer aminoácido, exceto Prolina (Ser: Serina, Thr: Treonina). Por sua vez os O-glicanos são estruturas formadas pela ligação do C1 de uma N-acetilgalactosamina (GalNAc) a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina na cadeia polipeptídica. Esses dois grupos de glicoproteínas são sintetizados por vias celulares diferentes e independentes (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011).

A síntese dos N-glicanos se inicia na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático, ancorada no precursor lipídico dolicol-fosfato. Inicialmente ocorre a transferência de uma N-acetilglicosamina-fosfato da UDP-GlcNAc para o dolicol-fosfato, originando o dolicol-pirofosfato-N-acetilglicosamina. A partir deste produto, outros monossacarídeos são adicionados ao precursor ainda na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático até a formação de um glicano contendo duas N-acetilglicosaminas e cinco manoses. Essa estrutura sofre então um “flip” sendo transferida da superfície citoplasmática para o lúmen do retículo endoplasmático onde continua a sofrer a ação de glicosiltransferases. À medida que o núcleo Glc3Man9GlcNAc2 é gerado (Glc: glicose), o glicano é transferido do dolicol para o resíduo de asparagina da sequência Asn-X-Ser/Thr da proteína pela enzima oligossacarídeotransferase. A glicoproteína em formação sofre ainda a ação de glicosiltransferases e glicosidases no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi nos chamados processamentos precoces e tardios e maturação, até originar o N-glicano final (VARKI et al., 2017).

Por sua vez o processo da O-glicosilação ocorre basicamente no complexo de Golgi (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011). A primeira etapa representa a transferência da N-acetilgalactosamina da UDP-GalNAc para a serina ou treonina aceptora, por ação da enzima peptídeo-N-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAcT) (VARKI et al., 2017). Após a adição do primeiro resíduo de GalNAc, a elongação das cadeias de O-glicanos podem ocorrer pela adição de outros carboidratos, tais como galactose, fucose, N-acetilglicosamina e ácido siálico, por ação de várias enzimas, formando diferentes núcleos (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011).

2.4.2 Alterações glicobiológicas no câncer

A síntese dos glicoconjugados é um processo complexo e altamente modulado por diferentes condições celulares. A sensibilidade a mudanças genéticas e ambientais fazem com que a alteração no padrão de glicosilação seja uma característica marcante do fenótipo tumoral, fato inicialmente demonstrado por Meezan e colaboradores em 1969 (DUBE e BERTOZZI, 2005). Hakamori e Kannagi ainda em 1983 definiram que as alterações glicobiológicas

associadas às células tumorais poderiam ser resultantes de uma síntese incompleta ou da neossíntese. A síntese incompleta é interrupção da síntese normal dos glicanos complexos, formando estruturas ditas truncadas. Já o processo de neossíntese é a indução na síntese dos genes envolvidos nos processos de glicosilação. De fato, vários fatores podem contribuir pra o fenótipo glicobiológico tumoral alterado, tais como modificações nos níveis de expressão ou na sublocalização celular das glicosiltransferases e glicosidases, alterações na conformação terciária ou nos níveis celulares dos peptídeos ou glicanos aceptores, mudanças na disponibilidade dos nucleotídeos-açúcares doadores, bem como o comprometimento do complexo de Golgi (ADAMCZYK, THARMALINGAM e RUDD, 2012; PINHO e REIS, 2015).

Alterações na diversidade de glicanos em um tecido ou soro de pacientes com diferentes neoplasias vêm sendo analisadas para identificação de novos marcadores tumorais. Biomarcadores são características biológicas objetivamente medidas e avaliadas que indicam processos biológicos normais ou patogênicos (CARDIFF, 2018). Os biomarcadores podem ser utilizados na determinação do risco de desenvolvimento de uma doença, no diagnóstico inicial, estadiamento, monitoramento da progressão da doença e na avaliação da resposta a uma intervenção terapêutica (ADAMCZYK, THARMALINGAM e RUDD, 2012). O estudo contínuo das alterações glicobiológicas em diferentes tipos tumorais levaram a descoberta de glicoconjugados que hoje são regularmente utilizados na prática clínica como biomarcadores diagnósticos e de acompanhamento da progressão tumoral (Quadro 4).

2.4.3 Fucosilação

A L-fucose, também denominada 6-desoxi-L-galactose, é um monossacarídeo da classe das hexoses que não possui a hidroxila do carbono C6 e apresenta configuração L (Figura 3A). O processo de adição da L-fucose a glicanos nascentes é denominado fucosilação. Este processo ocorre pela ação das fucosiltransferases (FUTs), enzimas responsáveis por transferir resíduos de L-fucose da sua forma ativa, GDP-fucose, para o glicano aceptor (Figura 3B). Enquanto a síntese da GDP-fucose ocorre no citosol das células, a ação das fucosiltransferases ocorre no interior do complexo de Golgi (MIYOSHI, MORIWAKI e NAKAGAWA, 2008). A fucosilação é uma modificação pós-traducional não-extensível que pode ocorrer na porção terminal dos glicanos ou ainda na porção inicial, sendo chamada de core-fucosilação (PINHO e REIS, 2015). Até o momento treze genes codificadores de fucosiltransferases foram identificados no genoma humano, denominados respectivamente *FUT1* a *FUT11*, *POFUT1* e

O-FUT2, onde apenas os genes *FUT10*, *FUT11* e *O-FUT2* não tiveram suas funções estabelecidas (BECKER e LOWE, 2003).

Quadro 4: Lista de glicoproteínas comumente utilizadas como biomarcadores na prática clínica. CA: Antígeno carboidrato (do inglês *carbohydrate antigen*); FDP: Proteína de degradação de fibrina (do inglês *fibrin degradation protein*).

Biomarcador	Fonte	Tumor	Uso clínico
Alfafetoproteína (AFP)	Soro/Plasma	Testicular	Manejo da doença
AFP-L3%	Soro	Hepatocelular	Avaliação de risco
Beta-2-microglobulina (B2M)	Soro, urina, fluido cerebroespinal	Células sanguíneas	Monitoramento de progressão e recorrência
CA 15-3	Soro/plasma	Mama	Monitoramento da doença; resposta a terapia
CA 19-9	Soro/plasma	Pâncreas	Monitoramento da doença
CA 27-29	Soro/plasma	Mama	Monitoramento da doença; resposta a terapia
CA 125	Soro/plasma	Ovário	Monitoramento da doença; resposta a terapia
Antígeno carcinoembrionico (CEA)	Soro/plasma	Cólon	Monitoramento da doença; resposta a terapia
c-Kit	Tecidos	Tumores estromais gastrointestinais	Deteção do tumor; seleção de pacientes
Antígeno prostático específico livre (PSA)	Soro	Próstata	<i>Screening</i>
Pro2PSA	Soro	Próstata	Descriminação entre câncer e doença benigna

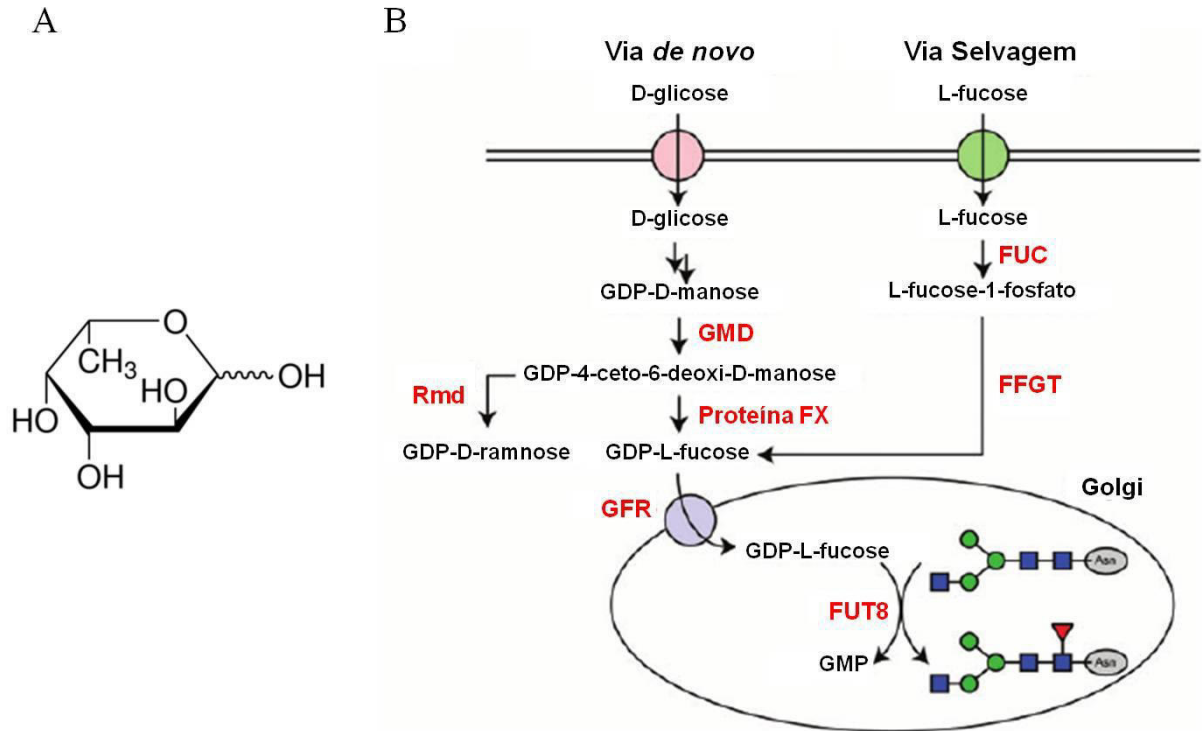
Fonte: Adaptado de Hashim, Jayapalan e Lee (2017)

A fucosilação representa um dos principais tipos de glicosilação alterados no câncer. Em 1979, Baumann e colaboradores relataram diferenças qualitativas e quantitativas no padrão de fucosilação dos glicolipídeos entre células de hepatoma e hepatócitos normais de ratos (BAUMANN et al., 1979). Alterações no padrão de fucosilação e na expressão de fucosiltransferases já foram demonstradas em diferentes tipos tumorais ao longo do tempo, afetando diferentes vias celulares (Quadro 5).

2.4.4 α -1,3/4-Fucosiltransferase (FUT3)

A enzima α -1,3/4-fucosiltransferase (FUT3) é uma glicoproteína transmembranar do tipo II localizada na membrana do complexo de Golgi que cataliza a reação de transferência de resíduos de fucose para glicanos em crescimento, formando ligações glicosídicas do tipo α 1,3 ou α 1,4 (COLOMB et al., 2014). Estruturalmente é constituída por uma pequena calda citoplasmática N-terminal, o domínio transmembranar, o domínio catalítico orientado para o lúmen do complexo de Golgi e uma haste ligando o domínio transmembranar ao domínio catalítico (Figura 4C) (VARKI et al., 2017).

Figura 3: (A) Estrutura da L-fucose (B) Processo exemplificado de síntese da GDP-Fucose pelas vias *de novo* e selvagem e posterior fucosilação. GMD: GDP-D-manose-4,6-desidratase; Proetina FX: GDP-4-ceto-6-deoxi-D-manose; Rmd: GDP-4-desidro-6-deoxi-D-manose redutase; GFR: Transportador GDP-L-fucose do Golgi; FUT8: α 1,6-fucosiltransferase 8; FUC: Fucocinase; FFGT: fucose-1-fosfato-guanililtransferase.



Fonte: Adaptado de Mabashi-Asazuma et al. (2014)

A FUT3 compartilha com outras enzimas de sua família, FUT4-FUT7 e FUT9, sua ação α 1,3-fucosiltransferase, mas não sua ação α 1,4 (BECKER e LOWE, 2003). As α 1,3FUTs apresentam grande homologia entre suas sequências de aminoácidos, estando a maior heterogeneidade localizada fora do domínio catalítico. São exatamente essas diferenças que conferem a FUT3 sua capacidade de catalisar a adição de resíduos de L-fucose à posição α -1,4 às cadeias oligossacarídicas do tipo I (Gal β 1,3GlcNAc). Diferenças encontradas na região N-terminal hipervariável localizada entre os resíduos 73 e 151 juntamente ao resíduo adicional Asp³³⁶ localizado próximo ao domínio catalítico conferem a FUT3 essa habilidade, a diferenciando das outras FUTs do seu grupo. A α -1,3/4-fucosiltransferase apresenta 361 aminoácidos, contendo 2 pontes dissulfeto interligando os resíduos C⁸¹-C³³⁸ e C⁹¹-C³⁴¹ e 2 sítios de N-glicosilação, cuja glicosilação é necessária para a atividade enzimática total (VRIES et al., 2001).

Quadro 5: Alterações no padrão de fucosilação e expressão de fucosiltransferases e fucosidases em tumores sólidos. ↑ Aumento; ↓ Diminuição.

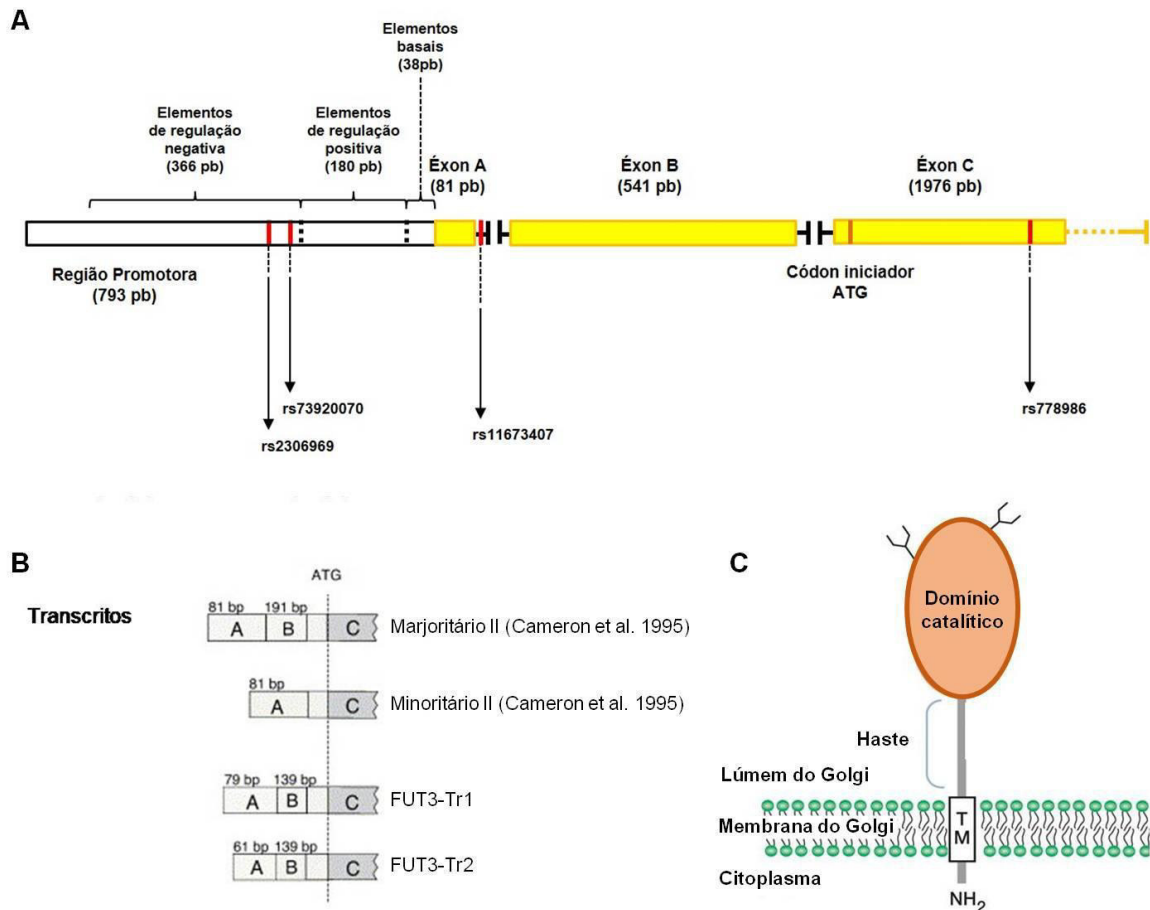
Tumor	Alteração	Consequência	Referência
Cabeça e pescoço	↑Fucosilação terminal ↑FUT3 e FUT6	Invasão e metástase das células tronco tumorais	Desiderio et al. (2015)
Pâncreas	↑Fucosilação α 1,2-, α 1,3- e α 1,4 ↑ FUT1-4	Marcador de células tronco tumorais resistentes a gencitabina	Terao et al. (2015)
Cólon	↑Fucosilação α 1,3-e α 1,6	Relacionado a estágio avançado da doença e presença de metástase	Osuga et al. (2016)
	↑FUT4	Envolvido com a proliferação e invasão tumoral <i>in vitro</i> ; menor sobrevida global	Li et al. (2017)
Próstata	↑FUT3, FUT6 e FUT7	Aumento da adesão celular e metástase	Barthel et al. (2009)
	↑FUT8	Aumento da motilidade celular	Wang et al. (2014)
	↑Fucosilação ↑FUT8 ↓FUCA1	Diferenciação entre linhagens celulares andrógeno-independentes das dependentes	Shah et al. (2015)
Ovário	↑ Core-fucosilação	Diferenciação do tecido normal do tecido tumoral	Abbott et al. (2010)
	↓Fucosilação	Diferenciação entre carcinomas serosos e mucinosos	Vitiazeva et al. (2015)
Mama	↑ FUT4	Estímulo ao processo de transição epitelial-mesenquimal	Yang, Liu e Yan (2013)
	↓ FUT3	Diferenciação de células tumorais e células normais	Nascimento et al. (2015)
	↑↓ FUCA1	Diferenciação de células tumorais e células normais; relacionado a sobrevida em tumores triplo-negativos	Cheng et al. (2015)
	↑ FUT8	Diferenciação entre tecido tumoral e normal; relacionado ao estágio tumoral, metástase e sobrevida	Yue et al. (2016)
	↑ FUT8	Estímulo ao processo de transição epitelial-mesenquimal	Tu et al. (2017)

Fonte: Presente trabalho

O gene homônimo *FUT3* é o responsável por codificar a α -1,3/4-fucosiltransferase, estando localizado no braço curto do cromossomo 19, juntamente com os genes *FUT5* e *FUT6*, formando um *cluster* de aproximadamente 35 quilobases (Kb) (NORDÉN, SAMUELSSON e NYSTRÖM, 2017). O gene é constituído pelos éxons A, B e C, que apresentam 81, 541 e 1976 pares de base (pb) respectivamente, estando a região codificadora totalmente inserida no éxon C (Figura 4A). Devido ao *splicing* alternativo, quatro diferentes transcritos do gene *FUT3* são encontrados em diferentes tecidos, todos iniciando no éxon A, onde o transcrito mais abundante apresenta 2,37 Kb (Figura 4B). A região promotora do gene *FUT3* apresenta três regiões definidas, a primeira porção que representa os elementos promotores basais, seguida de uma

região que possui elementos de potencialização da expressão e uma terceira região que apresenta elementos supressores (Figura 4A) (DABROWSKA et al., 2005).

Figura 4: Representação da estrutura gênica, dos transcritos e proteica de FUT3. (A) Estrutura do gene *FUT3*, pb: pares de base; (B) Composição dos diferentes transcritos produzidos a partir do gene *FUT3*; (C) Representação esquemática da enzima α 1,3/4-fucosiltransferase (FUT3).



Fonte: Adaptado de Dabrowska et al.(2005) e Varki et al (2017)

A expressão do gene *FUT3* é modulada em diferentes condições fisiopatológicas por diferentes mecanismos. Predição molecular sugere que o fator de transcrição AP-1 possa ser um dos envolvidos em sua regulação (DABROWSKA et al., 2005). Outros fatores de transcrição já demonstraram influência sobre a expressão do *FUT3*, tais como HNF1 α em células hepáticas e pancreáticas (LAUC et al., 2010), p53 em células de adenocarcinoma coloretal (KATKOORI et al., 2012), c-Myc em células de câncer de cólon (SAKUMA, AOKI e KANNAGI, 2012) e NF κ B em infecções de fibroblastos por vírus do herpes simplex tipo 1 (NORDÉN, SAMUELSSON e NYSTRÖM, 2017).

As citocinas pró-inflamatórias também exercem papel regulatório sobre a expressão gênica do *FUT3*, sendo, entretanto, sua ação citocina-específica e tecido-específica. A IL-8 e o TNF- α promovem o aumento da expressão do gene *FUT3* em células de mucosa brônquica

humana (GROUX-DEGROOTE et al., 2008) e em linhagem celular de carcinoma mucoepidermóide pulmonar (ISHIBASHI et al., 2005), respectivamente, enquanto a IL-1 β e a IL-6 promovem a redução da sua expressão em células humanas de câncer gástrico (PADRÓ, MEJÍAS-LUQUE e COBLER, 2011).

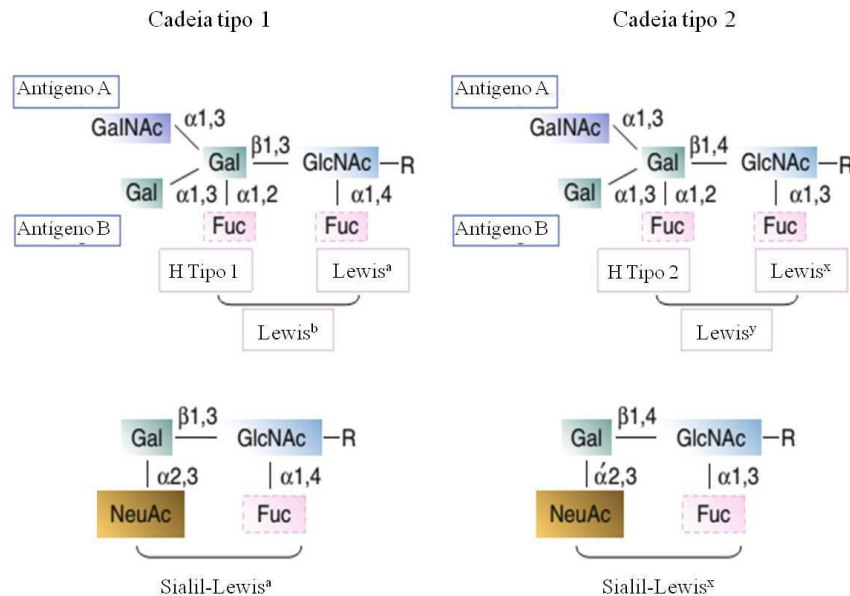
Fatores epigenéticos também já demonstraram influenciar os níveis de expressão da α 1,3/4-fucosiltransferase. A expressão do gene FUT3 e sua atividade α (1,4)fucosiltransferase em linhagens celulares de carcinoma gástrico é fortemente regulada pelo grau de metilação da sua região promotora. Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina, agente desmetilante, aumentou em 294,3 vezes os níveis do mRNA da *FUT3* na linhagem celular MKN45 e consequentemente a atividade enzimática α (1,4)fucosiltransferase, demonstrando que a expressão desse gene depende da hipometilação da sua região promotora (SERPA et al., 2006).

2.4.5 FUT3 e o câncer

As fucosiltransferases são as enzimas-chave na regulação da síntese de estruturas fucosiladas, onde a atividade da enzima FUT3 exerce fundamental importância na síntese dos antígenos de Lewis. Os antígenos de Lewis são carboidratos fucosilados que compõem a porção terminal de glicoconjugados. Eles podem estar ligados a cadeias oligossacarídicas do tipo I ou II e sua composição determina cada um dos membros da família (DAVID, 2011) (Figura 5). Os principais produtos da ação da enzima FUT3 são os tetrassacarídeos sialil Lewis X (sLe^x) e seu isômero sialil Lewis A (sLe^a), epítomos reconhecidos pelas E-selectinas que exercem papel fundamental na adesão inicial ao vaso e consequente extravazamento das células tumorais circulantes da corrente sanguínea, etapa fundamental no mecanismo de metástase hematogênea (BURDICK et al., 2012).

A expressão dos antígenos sLe^x e sLe^a está marcadamente elevada em tumores sólidos, tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CZERWINSKI et al., 2013), carcinomas de células renais (BORZYM-KLUCZYK, RADZIEJEWSKA e CECHOWSKA-PASKO, 2015); câncer de pulmão de células não-pequenas (KOMATSU et al., 2013), câncer de mama (JESCHKE et al., 2005), de cólon (MARE et al., 2013), gástrico (KIM et al., 2011), pancreático (BALLEHANINNA e CHAMBERLAIN, 2012), ducto biliar (KIKKAWA et al., 2012) e de próstata (DIMITROFF et al., 2004). Estudo de meta-análise avaliando o poder prognóstico do sLe^x em diferentes tumores confirmou que níveis elevados deste antígeno estão associados a metástase, recorrência e sobrevida global dos pacientes (LIANG, LIANG e GAO, 2016).

Figura 5: Estrutura dos antígenos de Lewis ligados as cadeias de carboidratos do tipo 1 (a esquerda) e 2 (a direita). GalNAc: N-acetil-galactosamina; Gal: Galactosamina; GlcNAc: N-acetil-glicosamina; Fuc: Fucose; NeuAc: Ácido neuroamínico.



Fonte: Adaptado de David (2011)

A atividade α -1,3/4-fucosiltransferase é fundamental para a síntese dos antígenos de Lewis. Células epiteliais intestinais humanas que superexpressam sLe^a apresentam níveis de FUT3 75x maior que outras células (BRAZIL, et al., 2013). Células pancreáticas tumorais com altos níveis de sLe^a apresentaram atividade enzimática α -1,4 100% a 350% maior que a atividade apresentada por células com baixa expressão desse antígeno (MAS et al., 1998). A transfecção da linhagem celular tumoral prostática com o gene *FUT3* foi capaz de induzir a síntese de sLe^x resultando em maior adesão celular às E-selectinas (BARTHEL et al., 2009). Através da utilização de RNAs de interferência quatro estudos independentes observaram a redução na expressão dos antígenos de Lewis após supressão do gene *FUT3* resultando em redução da adesão celular as E-selectinas (PADRÓ et al., 2011; YIN et al., 2010), inibição do crescimento celular, diminuição da habilidade de formar colônia (XIN et al., 2012) e redução da taxa de migração e invasão celular (SILSIRIVANIT et al., 2013) em linhagens celulares de câncer de próstata, gástrico e colangiocarcinoma.

O aumento na expressão da enzima α -1,3/4-fucosiltransferase está relacionado a um maior poder de metástase das células tumorais de próstata (BARTHEL et al., 2009) e pâncreas (AUBERT et al., 2000) e a uma menor sobrevida global em pacientes acometido por câncer oral (VAJARIA et al., 2014) e renal (MENG et al., 2017). Entretanto, mesmo que altos níveis da FUT3 estejam associados a um prognóstico reservado em diferentes tumores, a expressão desta enzima está reduzida em tumores mamários e orais quando comparados ao tecido mamário normal e ao tecido oral normal adjacente ao tumor, respectivamente (VAJARIA et al.,

2014; NASCIMENTO et al., 2015). Este mesmo padrão foi observado em tumores prostáticos quando comparados a tecidos de próstata acometidos por lesões benignas (VASCONCELOS et al., 2013).

A dualidade observada no perfil de expressão da FUT3 em diferentes momentos da progressão tumoral também pode ser identificada quando avaliados os mecanismos celulares nos quais ela já foi relacionada. No câncer colorretal foi evidenciado o envolvimento da FUT3 na ativação do processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) via TGF- β . A fucosilação dos receptores T β R I e T β R II se mostrou essencial para a ativação da cascata intracelular desencadeada pelo TGF- β (expressão dos intermediários da cascata Smad2, p38delta e HSP27) e consequente indução da EMT, resultando em maior migração celular e metástase (HIRAKAWA et al., 2014). Entretanto, estudos avaliando este mesmo processo em células tumorais mamárias mostraram que a submissão das células ao processo de transição epitelial-mesenquimal via TGF- β desencadeava a redução dos níveis de FUT3 nas células transformadas (BREIMAN et al., 2016).

A atividade da enzima FUT3 também já foi relacionada ao processo de morte celular imunomediada. Altos níveis de sLe^x resultantes da superexpressão do gene *FUT3* em células de melanoma e eritroleucemia resultou em disparo da citotoxicidade mediada por células NK e inibição da progressão tumoral através da interação desse antígeno com receptores lectina do tipo C (HIGAI, ICHIKAWA e MATSUMOTO, 2006; OHYAMA et al., 2002). Linhagens celulares de câncer de cólon sensíveis à via de apoptose extrínseca mediada pela Apo2L/TRAIL superexpressam o gene *FUT3* (WAGNER et al., 2007). A importância da enzima FUT3 neste mecanismo de morte celular em linhagens celulares de câncer de cólon foi recentemente confirmada. Células que superexpressam FUT3 apresentam maior sensibilidade à via de apoptose induzida por TRAIL ao aumentar a pré-complexação dos receptores DR4 e DR5, resultando em maior formação dos mediadores intracelulares DISC, caspase 8 e PARP-1 (ZHANG et al., 2018). Análise por bioinformática inseriu o gene *FUT3* na rede molecular ativada por BIK, molécula pertencente à família Bcl-2 indutora de apoptose (HUANG et al., 2016).

Diante do exposto, a FUT3 está envolvida não apenas no processo de metástase hematogênea via síntese dos antígenos de Lewis, como também no processo de transição epitelial-mesenquimal através da fucosilação de receptores para o TGF- β e no mecanismo de morte celular mediada pelas células NK. Diante deste cenário, onde a FUT3 apresenta importantes papéis tanto em vias celulares pró-tumorais quanto antitumorais, seu valor prognóstico deverá ser definido pela via celular em que esta enzima se encontra

majoritariamente comprometida, especificamente para cada tipo tumoral analisado e de acordo com seu estágio de progressão.

Ao estudar a expressão de moléculas de adesão em diferentes tipos de carcinoma mamário, Jeschke e colaboradores (2005) demonstraram que a expressão do sLe^a está relacionada ao estágio tumoral, e que os maiores níveis desse antígeno foram encontrados em tumores metastáticos (JESCHKE et al., 2005). A remoção dos resíduos de L-fucose α -ligados em linhagem celular de câncer de mama reduziu o poder de adesão dessas células a componentes da matriz extracelular e às células endoteliais em condições estáticas e sob fluxo, demonstrando a importância desse carboidrato nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, e consequentemente para o processo de metástase (YUAN et al., 2008). A inibição da fucosilação em linhagem celular mamária foi capaz de reduzir a ligação as E-selectinas sob fluxo, a migração e a proliferação celular (CARRASCAL et al., 2017). Aumento da fucosilação terminal é encontrado em células de câncer de mama quimiorresistentes à doxorrubicina comparadas a células não resistentes (MA et al., 2013). Todavia, diferentemente do que podem indicar os altos níveis de antígenos fucosilados, a expressão da FUT3 em tumores mamários é menor que em tecidos normais (NASCIMENTO et al., 2015). Altos níveis desta enzima foram associados a negatividade para o receptor de estrógeno (JULIEN et al., 2011) e a positividade para o HER-2 (NASCIMENTO et al., 2015).

2.4.6 Variabilidade genética do *FUT3*

Variações genéticas herdadas na região codificante do gene *FUT3* vem sendo extensivamente estudadas devido sua associação ao fenótipo Lewis negativo. O grupo sanguíneo de Lewis é definido pela presença ou ausência na superfície celular dos antígenos Lewis A e Lewis B, ambos α 1,4-fucosilados. A inatividade da enzima FUT3 determina a ausência destes antígenos e consequentemente o fenótipo Lewis negativo Le(a-b-) (CORVELO et al., 2013). Vários polimorfismos de base única (SNPs) presentes na região codificante do gene *FUT3* já foram identificados em indivíduos Le (a-b-) em diferentes grupos étnicos, todavia 90-95% destes indivíduos podem ser identificados através da análise de quatro SNPs: T59G, T202C, C314T e T1067A (SALOMAA et al., 2000). A presença destes SNPs em éxons do gene *FUT3* e, por conseguinte, o fenótipo Lewis negativo foram relacionados a susceptibilidade a doenças, tais como a colite ulcerativa (HU et al., 2016). Embora o impacto destas variações na atividade da enzima FUT3 esteja bem estabelecido na literatura, apenas 5,1% da população brasileira saudável apresenta fenótipo Lewis negativo em decorrência de tais alterações (TERESA et al., 2010).

Na região regulatória a montante (5'-*upstream*) do gene *FUT3* já foram mapeados até o momento 116 variações de base única, estando elas depositadas no banco de dados dbSNP *Short genetic variations* do NCBI. Embora o real impacto destas variações na expressão do gene ainda não tenha sido avaliado, dois destes polimorfismos já foram relacionados com condições patológicas (Figura 4A). O SNP rs2306969 (-6951C>T, posição gênica relativa ao sítio de início de tradução, nomenclatura HGVS: NG_007482.1:g.4685T>C) foi associado ao risco ao câncer de ovário em uma população caucasiana (SELLERS et al., 2008). Este mesmo SNP se mostrou fracamente relacionado à variante intestinal do câncer gástrico em uma população europeia e quando herdado juntamente com outras duas variações no mesmo gene, os SNPs rs778986 (NG_007482.1:g.11949C>T) e rs11673407(NG_007482.1:g.5150T>C), foi associado ao câncer gástrico difuso (DUELL et al., 2015). Este SNP ainda foi relacionado a altos níveis do antígeno carcinoembriônico no câncer colorretal (HE et al., 2014) e a altos níveis do antígeno CA 19-9 em pacientes com doenças neurodegenerativas (DEMING et al., 2016). No câncer de mama a presença do alelo minoritário T do SNP rs2306969 e do alelo majoritário C do SNP rs73920070 (NG_007482.1:g.4703C>T), também localizado na região promotora do gene *FUT3*, foram associados à doença na população brasileira. Análise de predição *in silico* sugere que esses dois polimorfismos possam afetar a expressão do gene *FUT3* através da formação ou perda de sítios para fatores de transcrição, entretanto essa relação ainda não foi testada *in vitro* ou *in vivo* (NASCIMENTO et al., 2015).

2.5 BIOINFORMÁTICA NA DESCOBERTA DE NOVOS BIOMARCADORES NO CÂNCER

A descoberta de novos biomarcadores com potencial clínico para ser utilizados no diagnóstico, prognóstico e/ou acompanhamento terapêutico de pacientes com câncer tem sido impulsionada pelo avanço tecnológico nas ciências ômicas (GOOSSENS et al., 2015). As assim chamadas metodologias de segunda geração são capazes de produzir um volume de dados muito maior que o gerado anteriormente, o que por um lado aumenta exponencialmente as informações obtidas sobre os processos biológicos, porém autolimita-se pela complexidade na análise dos dados obtidos (WEINSTEIN, 2016). Frente a este desafio, a bioinformática deve ser utilizada como ferramenta de facilitação das análises e como uma impulsionadora de novas investigações a partir de dados previamente obtidos.

A bioinformática é definida com o campo da ciência que utiliza a biologia, as ciências computacionais e a tecnologia de informação para organizar, analisar, interpretar e compartilhar dados biológicos (WEINSTEIN, 2016). A união da bioinformática com a crescente

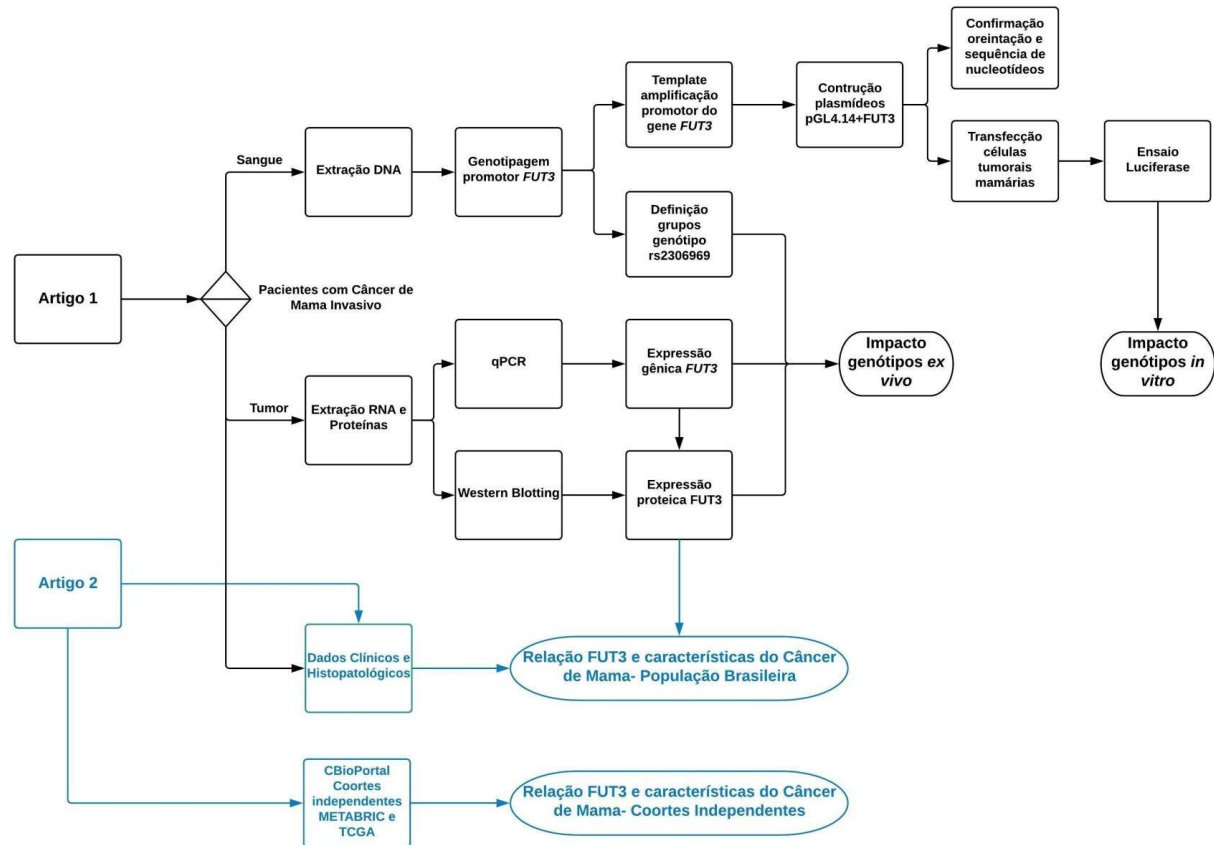
disponibilidade de grandes bancos de dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos permite que a informação presente nesses bancos seja minuciosamente e extensivamente investigada por diversos pesquisadores ao redor do mundo. Esse esforço multicêntrico reduz custos e acelera os processos de descoberta que dificilmente seriam alcançados por um único grupo.

Entre os bancos de dados que disponibilizam para a comunidade científica informações sobre tumores mamários estão às plataformas do *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA) e do *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium* (METABRIC) (CIRIELLO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Ambos os bancos de dados surgiram de esforços multicêntricos para catalogação das características clínicas e histopatológicas, dos perfis transcricionais e proteicos de tumores, bem como o *status* mutacional das lesões de pacientes com câncer de mama. As informações destas coortes estão parcialmente ou totalmente disponíveis para o acesso *online* e *download*, servindo de fonte primária de dados para diversos estudos. De fato, vários artigos vêm utilizando tais populações na descoberta de novos biomarcadores tumorais prognósticos, dentre eles genes/proteínas relacionados às vias de glicosilação (POTAPENKO et al., 2015; ASHKANI e NAIDOO, 2016; DONG et al., 2017).

3 METODOLOGIA

A metodologia aplicada neste trabalho está sumarizada no fluxograma apresentado na Figura 6 e apresentada em detalhes nesta sessão.

Fluxograma 1: Fluxograma metodológico aplicado na elaboração dos artigos 1 e 2 desenvolvidos nesta tese.



Fonte: Presente trabalho

3.1 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram selecionadas para participar do estudo mulheres com carcinomas invasivos de mama, submetidas à mastectomia ou quadrantectomia no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). Foram obtidas durante o procedimento cirúrgico amostras de tecido tumoral que foram seccionadas em dois fragmentos. Um dos fragmentos foi conservado em RNAlater (Qiagen, Hilden, Alemanha) e posteriormente armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA. O segundo fragmento foi diretamente congelado em N_2 líquido e armazenado a -80°C para posterior extração de proteínas. Também foram obtidas das mesmas pacientes alíquotas de 5 mL sangue periférico total coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. A integração ao estudo esteve condicionada ao consentimento prévio dado livremente pelas pacientes e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados clínicos e anatomopatológicos relevantes para o estudo foram obtidos a partir dos

registros das pacientes no Setor de Arquivo Médico e Estatística, dos laudos produzidos pelo Setor de Anatomia Patológica e questionário respondido pelas pacientes após consentimento. A obtenção das amostras biológicas utilizadas neste estudo é parte integrante do projeto intitulado “Identificação de Novos Biomarcadores de Uso Potencial no Diagnóstico e Prognóstico de Alterações Mamárias e Prostáticas Humanas”, aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CAAE 06586612.9.0000.5208 – Parecer No. 140.876 em 07/11/2012).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

O DNA genômico das pacientes foi extraído a partir de sangue periférico total utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A quantificação do DNA foi realizada no Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific, Massachusetts, EUA). A região promotora do gene *FUT3* foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores 5'-GTATCTTCTTAAGGGCTGGAGGGGGAG-3' e 5'-AGCAGTGGATGAGGACAGCTCACCAGG-3'. A PCR foi realizada utilizando a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Grand Island, Nova Iorque), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Cada reação de 20 µL continha 0,2 µM de cada iniciador, 0,1 mM de cada dNTP e 200 ng de DNA genômico. As condições de amplificação foram 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 69°C por 1 min e 72°C por 1 min, e uma etapa final a 72°C por 5 min. A amplificação foi confirmada através da visualização do fragmento de 892 pb após eletroforese em gel de agarose 1% a 100V, por 90 min e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os fragmentos foram sequenciados no sentido senso e anti-senso utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante e adaptado para o sistema MegaBACE 500 (General Electric, Fairfield, Connecticut). As sequências foram analisadas usando o software CLC Main Workbench v.6 (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR E qPCR

Os tecidos preservados em RNAlater a -80°C foram pulverizados em N₂ líquido e o RNA total foi extraído utilizando o TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O RNA foi tratado com TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies, Califórnia, EUA) para remoção de DNA contaminante. A quantificação e avaliação da pureza do RNA foi realizada no Nanodrop 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific, Massachusetts, EUA) e sua integridade foi analisada após eletroforese em

gel de agarose 1,2% a 80V por 30 min. Para a síntese do cDNA foram utilizados 1 µg de RNA total. A reação de transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada pela enzima ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Foram utilizados em cada reação 2,5 pmols dos iniciadores Oligo(dT) primer (5'-TTTTT-3') e Random primer (5'-NNNNNN-3'). A expressão do gene *FUT3* foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando para a detecção o fluorocromo SYBR Green. A reação de qPCR foi composta por 20 ng de cDNA, 4,5 pmols de cada iniciador (Tabela 1), 5 uL do PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) em um volume final de 10 uL. A amplificação foi realizada no ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e 40 ciclos a 95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 72°C por 1 min. A expressão relativa do *FUT3* foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *ACTB* e *HPRT1*. As diferenças relativas foram determinadas pelo método do delta CT (Δ CT) para a análise da expressão de acordo com as características clínico-histopatológicas, ou delta delta CT ($\Delta\Delta$ CT) para a análise da expressão de acordo com os genótipos, utilizando o genótipo CC como referência.

Tabela 1: Iniciadores para a reação de PCR em tempo real do gene-alvo e genes de referência utilizados no presente estudo.

Gene-alvo	Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento	Referência
<i>FUT3</i>	FW: 5'-CCTGCTGGAGTCCTTTGTGGCC-3' RV: 5'-GCAGGCAAGTCTTCTGGAGGGG-3'	102 pb	JULIEN et al. (2011)
<i>ACTB</i>	FW: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' RV: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'	205 pb	LIU et al. (2015)
<i>HPRT1</i>	FW: 5'-GGACCCACGAAGTGTTG-3' RV: 5'-GGCGATGTCAATAGGACTCC-3'	210 pb	Presente estudo

Fonte: Presente estudo

3.4 EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOTTING

O extrato proteico foi obtido a partir da maceração de 100 mg de tecido tumoral mamário em 500 µL de tampão de extração (Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4% p/v), na presença de esferas metálicas, através do equipamento TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemanha), a uma rotação de 13000 rpm, por 3 min. O extrato bruto foi centrifugado a 12000 rpm, por 15 min, a 4°C e o sobrenadante composto pelas proteínas solúveis foi acondicionado a -80°C. As proteínas foram purificadas através da precipitação por 10% v/v de ácido tricloroacético em acetona e ressolubilizadas em tampão de extração. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). 20 µg de proteínas totais foram misturadas ao tampão de amostra (concentração final: Tris-Cl pH 6,8 125mM, SDS 2% p/v,

glicerol 10% v/v, ditioneitol 100mM, azul de bromofenol 0,01% p/v), desnaturadas a 100°C por 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% contendo SDS (SDS-PAGE) no sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). A eletroforese foi realizada a 120V por aproximadamente 3h em tampão de corrida (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0,1% p/v SDS, pH 8,3). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) em sistema semi-seco Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). As condições de transferências foram 20V, 1,3A por 30 min em tampão de transferência Towbin com SDS (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0,1% p/v SDS, 20% v/v Metanol, pH 8,3). As membranas foram lavadas com tampão TBST (20 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20, pH 7,5) três vezes por 10 minutos, sob agitação constante. Em seguida as membranas foram bloqueadas e incubadas com o anticorpo primário apropriado diluído em TBST-BSA 1% a 4°C por 16-18h, sob agitação branda. Após serem lavadas três vezes com TBST, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em TBST-BSA 1% por 2h a temperatura ambiente, sob agitação branda. Por fim as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBST e reveladas utilizando o substrato quimioluminescente Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e a quimioluminescência foi detectada pelo ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários e secundários: anticorpo policlonal de coelho anti-FUT3 (diluição 1:1000, Num. Cat. SAB1401146, SigmaAldrich, Missouri, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-GAPDH clone FL-335 (diluição 1:1000, Num. Cat. sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) e anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (diluição 1:10000, Num. Cat. 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pensilvânia, EUA).

3.5 ANÁLISE *IN SILICO* DA EXPRESSÃO DE *FUT3* EM DIFERENTES POPULAÇÕES

Os dados clínicos e de expressão gênica de duas coortes independentes de pacientes com câncer de mama (METABRIC, PEREIRA et al. 2016; TCGA, CIRIELLO et al., 2015) foram obtidos do site *cBioPortal for Cancer Genomics* (<http://www.cbioportal.org/>) e analisados para as variáveis avaliadas neste estudo. O software X-tile (CAMP, DOLLED-FILHART & RIMM, 2004) foi utilizado para identificar os valores de corte da expressão de *FUT3* ideais para

categorização da população em alta e baixa expressão para análise de sobrevida global e livre de doença.

3.6 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO DE GENE REPÓRTER LUCIFERASE CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE *FUT3*

A região promotora do gene *FUT3* foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico obtido do sangue periférico de pacientes acometidos pelo câncer de mama que possuíam os diferentes genótipos para o polimorfismo rs2306969 (-6951C>T). Foram utilizados para amplificação da região regulatória de *FUT3* os iniciadores 5'-ATATGGTACCGACGAGGGTATATTGTAC-3' e 5'-ATATGGTACCGAGAGGAGGAACAAGTACG-3', contendo o sítio de restrição da enzima *KpnI*. As amplificações foram realizadas utilizando a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Grand Island, Nova Iorque) de acordo com o protocolo do fabricante. Cada reação de 20 µL continha 0,2 µM de cada iniciador, 0,1 mM de cada dNTP e 200 ng de DNA genômico. As condições de amplificação foram 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 55,4°C por 30 seg e 72°C por 1 min, e uma etapa final a 72°C por 5 min. A amplificação foi confirmada através da visualização do fragmento de 749 pb após eletroforese em gel de agarose 1% a 100V, por 90 min e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Os fragmentos amplificados por PCR foram ligados ao plasmídeo pCR™4-TOPO® utilizando o kit TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, Grand Island, Nova Iorque) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação contendo 2 µL do fragmento amplificado por PCR se processou a 22°C por 15 min. 2 µL da reação de ligação foram utilizados para transformar 50 µL de células *E. coli* cepa DH10B competentes por eletroporação. O choque foi realizado a 2500V por 5 ms utilizando o Multiporator Eppendorf® (Módulo Bactéria e Fungo, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após o choque as células foram recuperadas em 500 µL de meio Luria Bertani (LB; 1% p/v caseína, 0,5% p/v extrato de levedura, 1% p/v NaCl, pH 7,5) a 37°C, 200 rpm, por aproximadamente 3 h. As células foram plaqueadas em meio LB sólido (2% p/v Agar) contendo 50 µg/mL do antibiótico de seleção canamicina e incubadas a 37°C por 16-18 h. As colônias contendo o plasmídeo pCR™4-TOPO/FUT3 foram inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina a 37°C, 200 rpm, por 16-18h e o plasmídeo foi purificado utilizando o kit QIAprep® Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Os plasmídeos foram sequenciados utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) de acordo com o protocolo

estabelecido pelo fabricante e adaptado para o sistema MegaBACE 500 (General Electric, Fairfield, Connecticut). Após precipitação com acetato de amônia/EDTA e etanol, o DNA foi ressuspensão em 10 µL de MegaBACE Loading Buffer (General Electric, Fairfield, Connecticut) e amostras foram injetadas para realização de eletroforese e seqüenciamento em MegaBace 500 (General Electric, Fairfield, Connecticut). As sequencias foram analisadas usando o software CLC Main Workbench v.6 (Quiagen, Venlo, Holanda) para confirmação da presença do genótipo específico para o polimorfismo rs2306969 (-6951C>T).

A região regulatória do gene *FUT3* foi retirada do plasmídeo pCRTM4-TOPO/*FUT3* utilizando a enzima de restrição *KpnI* (New England BioLabs, Massachusetts, EUA) e purificada a partir de gel de agarose utilizando e QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O fragmento foi então ligado ao vetor repórter pGL4.14 (Promega, Wisconsin, EUA), previamente digerido com a enzima *KpnI* e defosforilado, por ação da T4 DNA Ligase (New England BioLabs, Massachusetts, EUA). A reação de ligação foi composta por 100 ng do vetor, 36,7 ng do fragmento e 1 µL da enzima, representando uma relação de 1 molécula de vetor para 3 moléculas de inserto. Foi utilizada a técnica do *temperature cycle ligation* para aumento da eficiência de ligação, composta por 500 ciclos a 10°C por 10 seg e 37°C por 10 seg, seguido de uma etapa a 65°C por 15 min a fim de inativar a enzima. 15 µL da reação de ligação foram utilizados para transformação de células *E. coli* cepa DH10B de acordo com o protocolo descrito anteriormente, utilizando como antibiótico de seleção a ampicilina. As colônias contendo os plasmídeos pGL4.14/*FUT3*_wt ou pGL4.14/*FUT3*_mt foram pré-inoculadas em 2 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina 37°C, 200 rpm, por 8h. Foram transferidos 100 µL do pré-inóculo para 100 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina, que foi incubado a 37°C, 200 rpm, por 16-18h. Os plasmídeos foram então extraídos e purificados utilizando o EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Foram produzidos os plasmídeos pGL4.14+*FUT3*_wt (-6951 C) e pGL4.14+*FUT3*_mt (-6951 T).

3.7 ENSAIO DE EXPRESSÃO DO GENE REPÓRTER LUCIFERASE

Foram utilizadas neste trabalho as linhagens celulares tumorais mamárias MDA-MB-231 e T47D previamente autenticadas e testadas livres para micoplasma. Células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em meio F12/L15, composto por partes iguais de meio Ham's F12 (Gibco, Nova Iorque, EUA) e meio Lebovitz's L15 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Life Technologies, Califórnia, EUA), 100

U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies, Califórnia, EUA) a 37°C na ausência de CO₂. Células da linhagem T47D foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco, Nova Iorque, EUA) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Life Technologies, Califórnia, EUA), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies, Califórnia, EUA) a 37°C, em atmosfera contendo 5% v/v de CO₂.

Após crescimento até confluência de 70-90%, as células foram destacadas utilizando 0,25% p/v Tripsina suplementada com EDTA, centrifugadas a 500g por 5 min e resuspensas no seu respectivo meio de cultivo. Cem mil células (10⁵) foram cultivadas em poços de 1,9 cm² por 24h, atingindo confluência de 70-90%. O plasmídeo teste (pGL4.14+FUT3_wt, pGL4.14+FUT3_mt ou pGL4.14 empty) e o plasmídeo referência (pGL4.73) foram co-transfectados na proporção 50:1 nas respectivas linhagens celulares utilizando o Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Califórnia, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Após 24h as células foram avaliadas, lisadas e a expressão da luciferase mensurada utilizando o Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Wisconsin, EUA). A luminescência foi quantificada no luminômetro Modulus Single Tube (Turner Biosystems, Califórnia, EUA) em unidades padrão de fluorescência e posteriormente a fluorescência relativa ao plasmídeo teste (pGL4.14) foi normalizada em relação a fluorescência do plasmídeo referência (pGL4.73).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando os softwares GraphPad Prism v. 6 e SPSS v. 22. As variáveis não categóricas foram testadas quanto à distribuição normal pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os dados de expressão gênica e proteica em diferentes grupos foram avaliados utilizando o teste de Mann-Whitney (dois grupos) e o teste de Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn (mais de dois grupos). As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier foram criadas e os valores de *p* foram definidos pelo teste Log Rank para a análise univariada. Regressão logística e o modelo de regressão de Cox foram utilizados para a análise multivariada. As atividades relativas de luciferase entre os grupos em um mesmo tipo celular foram analisadas pelo teste *one-way* ANOVA seguido de comparação múltipla de Tukey. O teste *two-way* ANOVA seguido de comparação múltipla de Sidak foi usado quando as linhagens celulares foram comparadas entre si. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 – “THE CHALLENGE OF DETERMINING THE IMPACT OF *FUT3* TUMOR-ASSOCIATED POLYMORPHISM RS2306969 (-6951 C> T) IN INVASIVE BREAST CANCER CELLS”

Artigo submetido à revista *Molecular Biology Reports*

The challenge of determining the impact of *FUT3* tumor-associated polymorphism rs2306969 (-6951 C> T) in invasive breast cancer cells

Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento¹, Anderson de Oliveira Vasconcelos², Maria Aparecida Barreto Lopes Seabra¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2}, Cíntia Renata Costa Rocha^{1,2}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, 50670-901, Recife, Brazil;
2. Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, 50670-901, Recife, Brazil.

Corresponding author:

Cíntia Renata Costa Rocha

Telephone +55 81 2126 8540

Telefax +55 81 2126 8576

E-mail: cintiarcrocha@uol.com.br

ABSTRACT

Background: *FUT3* gene is responsible for encode an homonymous $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransferase involved in the synthesis of sialyl-Lewis antigens. FUT3-fucosylated glycoconjugates play key roles in pathways involved in tumor biology and metastasis, such as cellular ligation to E-selectins, TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition, NK cell-mediated tumor cytotoxicity and apoptosis. Tumor-associated *FUT3* promoter polymorphism rs2306969 (-6951 C>T, position related to the gene's translation start site) has been linked to breast, ovarian and intestinal gastric cancer. Although non-coding polymorphisms accounts for the majority of variations founded in breast cancer, their functional roles are still poorly understood. This study aimed to investigate the impact of different alleles for this variation in FUT3 expression of invasive breast tumors. Methods and Results: A luciferase reporter assay was performed using two breast tumor cell lines to evaluate respectively the impact of *FUT3* rs2306969 (-6951 CC) and (-6951 TT) on protein expression. Gene and protein expressions were also measured in twenty-nine fresh biopsies of invasive breast tumors. Rs2306969 did not significantly influence *FUT3* expression in both used systems. However, this study is defiant since the biological role of this polymorphism in breast cancer and other tumor types could be linked to *cis/trans* modulation of other genes, respond to different environmental stimuli or impact gene expression only in association with other variations. Conclusions: Rs2306969 did not modulate FUT3 expression in breast tumors under non-stimulated conditions. Nevertheless, our study contributes to the notably challenging task that is to understand how non-coding polymorphisms can drive the overall risk in cancer development.

KEY WORDS: $\alpha 1,3/4$ -fucosyltransferase; Breast Cancer; Non-Coding Single Nucleotide Polymorphism; SNP Functional Analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge Professor Dayane Gomes (*Universidade Federal de Pernambuco*) for the support during the execution of the Western blotting platform assays of this work and Professors João Ricardo Mendes and Sergio Crovella (*Universidade Federal de Pernambuco*) for provided us the Lipofectamine 3000 reagent and the pGL4 vectors, respectively. This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

INTRODUCTION

Breast cancer genomics is one of the most studied areas in oncology. Hundreds of polymorphisms have been associated to breast cancer development and progression during the years with different penetrance. While genomic variants in coding regions are substantially more investigated than non-coding variations, the last one accounts for the majority of polymorphisms founded in breast cancer patients [1]. The single nucleotide polymorphism rs2306969 (-6951 C> T, position related to the gene's translation start site) is a tumor-associated polymorphism localized in the promoter region of *FUT3* gene. The -6951 T allele has been linked to breast, ovarian and intestinal gastric cancers [2-4]. This polymorphism has also been associated with high levels of carcinoembryonic antigen, a colorectal cancer biomarker [5].

Other coding variation in *FUT3* gene was found in patients with chronic myeloid leukemia and its up-regulation was related to patients with chemoresistant osteosarcoma [6,7]. This could be due the role of its genetic product acting in different pathways related to tumor progression. FUT3 is an α 1,3/4-fucosyltransferase responsible for synthesize the sialyl-Lewis antigens, sialyl-Lewis A and sialyl-Lewis X. These two glycans are involved in tumor metastasis due their capacity to mediate interactions between circulating tumor cells and endothelial selectins, thus mediating tumor cell extravasation to secondary sites [8]. The knockdown of *FUT3* expression leaded to poor tumor cell adhesion to E-selectins gastric and pancreatic cancer [9,10]. High expression of sialyl-Lewis antigens induced by FUT3 could also mediate natural killer cell cytotoxicity against erythroleukemia cells [11]. FUT3 activity on other substrates is also involved in Apo2L/TRAIL-mediated extrinsic apoptosis in colon cancer and TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal and pancreatic cancers [12,13].

In breast cancer, reduction of global fucosylation resulted in low tumor cells ligation to E-selectin and decreased cell migration and proliferation [14]. Although these data indicate a potential role of fucosyltransferase activity in breast cancer malignancy, FUT3 seems to behave in a different way. In invasive breast tumors, *FUT3* expression is reduced when compared to normal tissues [2]. Concurrently, the same breast cancer population showed higher frequency of -6951>T allele than non-cancer subjects [2]. Therefore, the aim of this study was to investigate whether different alleles for the polymorphism rs2306969 (-6951 C> T) promote different FUT3 expression profiles in patients with invasive breast cancer. For that, we performed both *in vitro* and *ex vivo* analysis using, respectively, a luciferase reporter plasmid-based system and gene/protein expression assays in fresh tumors obtained from invasive breast cancer patients. These methodologies combined can indicate the impact of the studied

polymorphism in a controlled (cell line) and uncontrolled (tumor tissues) environment, bringing new information about the overall influence this SNP in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

HUMAN BREAST CANCER CELL LINES

Mycoplasma-free, STR-authenticated human breast invasive cancer cell lines were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). T47D cell line were maintained in Dulbecco's Modified Eagle medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Grand Island, NY) at 37°C, 5% CO₂. MDA-MB-231 cell line were cultivated in F12-L15 medium, composed of equal parts of Ham's F12 medium (Gibco, Grand Island, NY) and Lebovitz's L15 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Grand Island, NY), at 37°C.

pGL4 CLONING AND LUCIFERASE ASSAY

FUT3 promoter region (considered nucleotides -732 to -4 in relation to 5' transcriptional start site) was amplified by PCR using as template the genomic DNA respectively obtained from two different donors, which respective *FUT3* promoter differ only for the polymorphism rs2306969 (C/T). The primers used in this amplification had in their 5'-end sequences encoding *KpnI* enzyme restriction site and were *fut3-fw* (5'-ATATGGTACCGACGAGGGTATATTGTAC-3') and *fut3-rv* (5'-ATATGGTACCGAGAGGAGGAACAAGTACG-3'). The amplified fragments were digested with *KpnI* and cloned into pGL4.14 plasmid (Promega, Madison, WI) using T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, Mass). After, screening for right oriented cloned fragments and DNA sequence confirmation was made by Sanger modified method using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) adapted for the MegaBACE 500 system (GE Healthcare, Chicago, IL). The sequences were analyzed using CLC Main Workbench v.6 software (Qiagen, Hilden). Two plasmids were obtained and named pGL4.14+FUT3_wt (-6951 C) and pGL4.14+FUT3_mt (-6951 T). The constructs were co-transfected with the normalizer Renilla plasmid pGL4.73 at a 50:1 ratio respectively into T47D and MDA-MB-231 cell lines using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufactures' protocol. After, 24h cells were lysed and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) by Modulus Single Tube Luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA).

HUMAN SUBJECTS AND *FUT3* GENOTYPING

Twenty-nine invasive breast tumors were obtained from women diagnosed with breast cancer who underwent mastectomy or quadrantectomy prior any other therapeutic intervention. A tumor biopsy from each patient was collected and divided in two fragments, one being kept under RNAlater™ (Qiagen, Hilden) and preserved at -80°C and the other only preserved at -80°C, for posterior RNA and protein extraction, respectively. Peripheral blood was also collected from all patients and genomic DNA extraction was performed using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI). *FUT3* promoter region was amplified by PCR using the primers 5'-GTATCTTCTTAAGGGCTGGAGGGGGAG-3' e 5'-AGCAGTGGATGAGGACAGCTCACCAGG-3'. The fragments were sequenced and analyzed as described in the item "pGL4 CLONING AND LUCIFERASE ASSAY".

This study was approved by the *Comité de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco* (CAAE 06586612.9.0000.5208 — No. 140.876) and all participants signed the written informed consent.

RNA EXTRACTION, RT-PCR AND qPCR

RNAlater™ preserved tumors were pulverized in liquid nitrogen and total RNA was extracted by TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufactures' instructions. DNA contamination was removed using TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies, CA). One microgram of total RNA was taken as template in cDNA synthesis using ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). Real-time PCR was performed using 20 ng of cDNA and the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The amplification was carried out in the ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Gene expression was evaluated using the following primer pairs: *FUT3*- 5'-CCTGCTGGAGTCCTTTGTGGCC-3' and 5'-GCAGGCAAGTCTTCTGGAGGGG-3' [15]; *ACTB*- 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' and 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3' [16]; *HPRT1*- 5'-GGACCCACGAAGTGTTG-3' and 5'-GGCGATGTCAATAGGACTCC-3'. The relative *FUT3* expression was normalized by the geometric mean of *ACTB* and *HPRT1* gene expressions. Relative expression was determined by delta-delta C_T method ($\Delta\Delta C_T$).

PROTEIN EXTRACTION AND WESTERN BLOTTING

Protein extract was obtained from tumors through maceration in TissueLyser II (Qiagen, Hilden) in the presence of extraction buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% w/v CHAPS). The extract was purified by precipitation with 10% v/v trichloroacetic acid in acetone. Twenty micrograms of protein underwent electrophoretic separation in a 12.5% SDS-polyacrylamide

gel followed by protein transfer to a 0.2 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the semi-dry Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). FUT3 and GAPDH expressions were detected by Western blotting using the following primary and secondary antibodies: Rabbit polyclonal anti-FUT3 antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:10000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Signal detection was performed using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL) by ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). FUT3 relative expression was calculated using the formula $\frac{(FUT3signal/GAPDHsignal)_{sample}}{Mean (FUT3signal/GAPDHsignal)_{ref}}$, being the reference group the population with the CC genotype for rs2306969.

STATISTICAL ANALYSIS

Non-categorical variables were tested for normal distribution by D'Agostino and Pearson normality test. Relative luciferase activities between groups were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for each cell type. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was used when both cell types were compared. Dunn's multiple comparison test was used after Kruskal–Wallis test when FUT3 mRNA and protein expressions were evaluated among genotype groups. All statistical analyzes were performed in GraphPad Prism v. 6 software. P value minor than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Two reporter plasmids containing respectively the genotypes rs2306969 (-6951 CC) and (-6951 TT) of *FUT3* promoter region were successfully produced and transfected individually in the breast cancer cell lines T47D and MDA-MB-231. Firefly luciferase derived luminescence was normalized by Renilla luciferase derived luminescence obtained from the same cells. Then, data obtained from cells transfected with plasmids expressing luciferase controlled by each *FUT3* promoter were normalized by the data obtained from cells transfected with empty plasmid. In both cell lines, different genotypes for rs2306969 (-6951 C> T) did not affect promoter activity (Figure 1a and 1b). However, *FUT3* promoter was more active in luminal A cell line T47D than in triple-negative cell line MDA-MB-231 (-6951 C $p = 0.0068$; -6951 T $p = 0.0009$) (Figure 1c). This data was obtained from an unstimulated environment. To confirm the results obtained *in vitro*, we performed an *ex vivo* FUT3 expression analysis in tumors obtained from invasive breast cancer patients. As anticipated, different genotypes for rs2306969

(-6951 C> T) were not associated to differences in FUT3 mRNA and protein expressions (Figure 1d-f).

The absent impact of different rs2306969 genotypes on gene expression observed in this study does not abolish the perspective of its biological role as an expression quantitative trait locus (eQTL) on breast cancer. In fact, nucleotide variations on non-coding regions can affect not only the expression of vicinity genes, but also other genes, nearby (*cis*-eQTL) or distant (*trans*-eQTL) [17]. If the analysis were extended for genes that have this polymorphism as a potential *cis*-eQTL, up to 1Mb up or downstream of the SNP, other 52 genes would be investigated. Focusing on closer genes, possible candidates for testing this hypothesis are *FUT5* and *FUT6*, genes that form together with *FUT3* a cluster that is co-regulated in specific conditions [18]. Since a polymorphism in *FUT6* 5'UTR region was able to modulate *FUT3* expression, the contrary mechanism could also exist [19]. Another gene that could be modulated by this alteration is the one coding for the long non-coding RNA LOC101928844. This gene is neighbored to *FUT3* and they share part of their genomic region, having opposite coding strands. Rs2306969 polymorphism is localized in the intron between exons 1 and 2 of LOC101928844. As variations in promoter regions, SNPs localized in introns have also the potential to modulate gene expression with the additional capacity to influence alternative splicing and mRNA stability [20]. This lncRNA was recently founded to be downregulated in head and neck squamous cell carcinoma and linked to estrogen response after enrichment analysis, an also important pathway in breast cancer [21].

The mechanism regarding gene expression modulation by promoter variations involves the production or abolishment of recognition sites for transcription factors (TFs) or even enzymes responsible for epigenetic modifications [20]. *In silico* prediction showed that the presence of minor allele T instead allele C at rs2306969 leads to losing of TF binding sites for TFII-I, STAT-4, c-Ets-1, MAZ and GR- α [2]. It's important to emphasize that these transcription factors are expressed by both cells lines used in this work, MDA-MB-231 and T47D, as were reported by the transcriptional panel of the Cancer Cell Line Encyclopedia obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics website [22]. These TFs can be differentially expressed or nucleus translocated in response to intercellular or environmental signals, such as hormone stimulation [23]. Since our experimental data was obtained from an unstimulated and normoxic environment, it is possible that adding different cell stimuli to the model would bring new information about the biological role of the SNP rs2306969 in breast cancer.

Regarding other tissues, eQTLs could be shared or be tissue-specific [24]. Although the studied polymorphism was not confirmed as an eQTL for *FUT3* in breast tumors, this predicted function could still be present in other tissues where it has been linked to tumor development, such as ovarian, colorectal and gastric [3-5]. Even if the gene expression analysis is extended and new genes are identified as regulated by this variation in breast cancer, these results could not be the same for other tissues, implying the need for individual evaluation. Finally, the importance of this polymorphism in cancer development could be linked to SNP epistasis, phenomenon where the effect of a variation at one genetic locus depends on other variations at different loci [25]. Analysis of SNP-SNP interactions in genome-wide association studies could be a powerful tool to clarify this possibility in breast cancer and other tumors.

In summary, rs2306969 (-6951 C> T) did not significantly influence *FUT3* expression in invasive breast tumors. However, the biological role of this polymorphism in breast cancer and other tumor types needs to be continue investigated in order to evaluate its possible involvement in the modulation of other genes (*cis* and *trans*-eQTL), under different stimuli or in association with other SNPs (epistasis). The potential involvement of promoter polymorphisms in this wide range of cellular mechanisms makes this investigation notably challenging. Still, this effort would be important to bring new insights regarding not only the role of *FUT3* in cancer but also in how non-coding SNPs can impact the overall risk in disease development.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest with the contents of this work.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with international ethical standards and were approved by the *Comité de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco* (CAAE 06586612.9.0000.5208 — No. 140.876).

INFORMED CONSENT

Written informed consent was obtained from all participants included in this study.

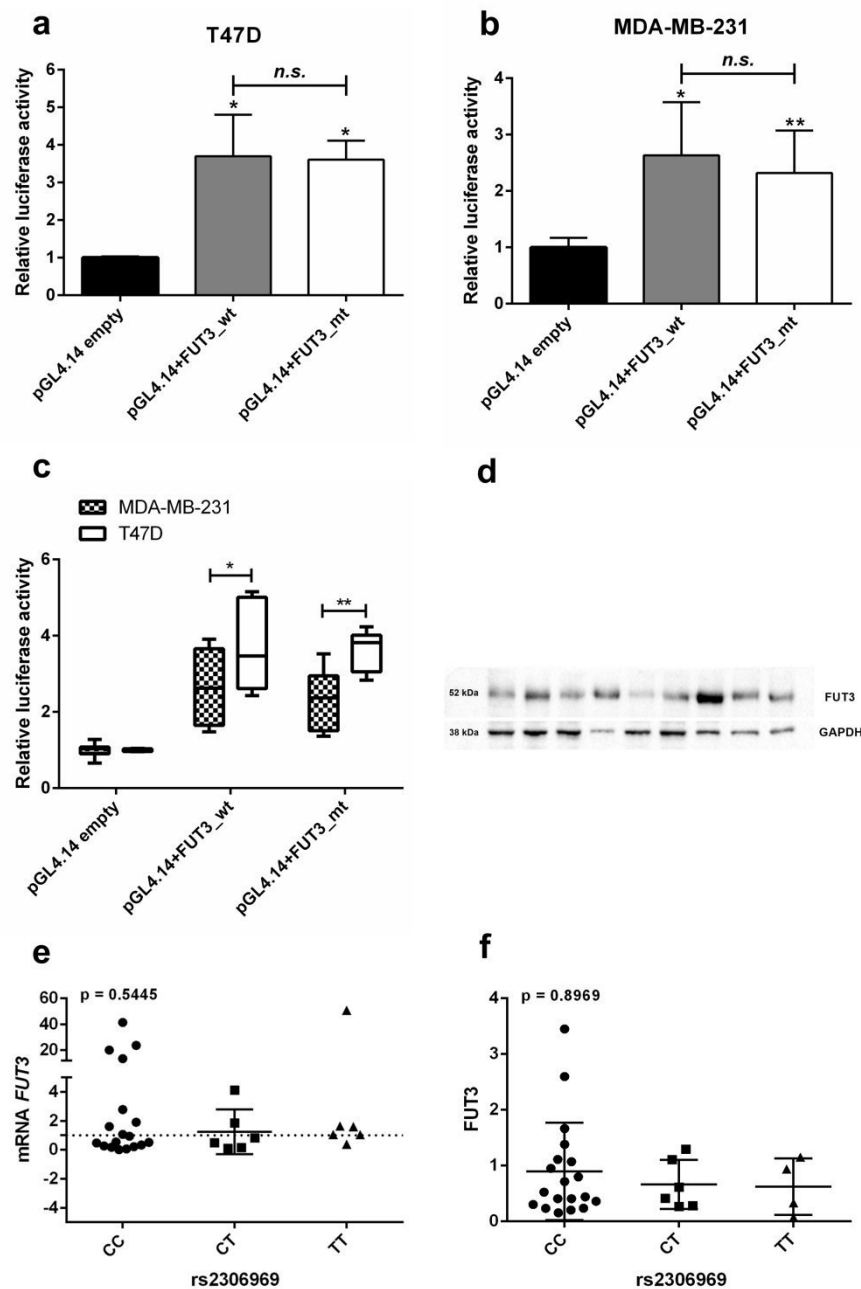


Fig. 1 Evaluation of the role of polymorphism rs2306969 (-6951 C> T, position related to the gene's translation start sites) in FUT3 expression in invasive breast tumors. (a-c) Reporter luciferase assay in invasive breast cancer cell lines T47D and MDA-MB-231 using plasmids with different rs2306969 genotypes: pGL4.14+FUT3_wt for -6951>C and pGL4.14+FUT3_mt for -6951>T. (a) Reporter luciferase assay in T47D cell line; * p value < 0.0001 when compared to pGL4.14 empty. (b) Reporter luciferase assay in MDA-MB-231 cell line; * p value = 0.0001, ** p value = 0.0016 when compared to pGL4.14 empty. (c) Promoter activity comparison between T47D and MDA-MB-231 cell line; * p value = 0.0068, ** p value = 0.009 when compared to pGL4.14 empty. (d) Western blotting for FUT3 in different tumor samples obtained from patients with invasive breast cancer. GAPDH was used as loading control. Each lane corresponds to protein from a different patient. (e-f) FUT3 mRNA and protein expressions (n = 29), respectively. Data obtained from tumors of patients with invasive breast cancer with different genotypes for rs2306969

REFERENCES

1. Khurana E, Fu Y, Chakravarty D, Demichelis F, Rubin MA, Gerstein M (2016) Role of non-coding sequence variants in cancer. *Nat Rev Genet* 17(2), 93-108. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.17>
2. Nascimento JCF, Ferreira SA, Vasconcelos JL, Barbosa BT, Bezerra MF, Rocha CR, Beltrão EI (2015) Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. *Exp Mol Pathol* 99(3):409-415. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.08.015>
3. Sellers TA, Huang Y, Cunningham J et al (2008) Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylation genes with risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(2):397-404. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0565>
4. Duell EJ, Bonet C, Muñoz X et al (2015) Variation at ABO histo-blood group and FUT loci and diffuse and intestinal gastric cancer risk in a European population. *Int J Cancer* 136(4):880-893. <https://doi.org/10.1002/ijc.29034>
5. He M, Wu C, Xu J et al (2014) A genome wide association study of genetic loci that influence tumour biomarkers cancer antigen 19-9, carcinoembryonic antigen and alpha fetoprotein and their associations with cancer risk. *Gut* 63(1):143-151. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303434>
6. Shokeen Y, Sharma NR, Vats A, Taneja V, Minhas S, Jauhri M, Sankaran S, Aggarwall S (2018) Identification of Prognostic and Susceptibility Markers in Chronic Myeloid Leukemia Using Next Generation Sequencing. *Ethiop J Health Sci* 28(2):135-146. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v28i2.5>
7. Xie B, Li Y, Zhao R, Xu Y, Wu Y, Wang J, Xia D, Han W, Chen D (2018) Identification of Key Genes and miRNAs in Osteosarcoma Patients with Chemoresistance by Bioinformatics Analysis. *BioMed Res Int* 2018:1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/4761064>
8. Burdick MM, Henson KA, Delgadillo LF, Choi YE, Goetz DJ, Tees DFJ, Benencia F (2012) Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? *Front Oncol* 2:103. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00103>
9. Padró M, Cobler L, Garrido M, Bolós C (2011) Down-regulation of FUT3 and FUT5 by shRNA alters Lewis antigens expression and reduces the adhesion capacities of

- gastric cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1810(12):1141-1149. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.011>
10. Zhan L, Chen L, Chen Z (2018) Knockdown of FUT3 disrupts the proliferation, migration, tumorigenesis and TGF- β induced EMT in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett* 16(1):924-930. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8738>
 11. Higai K, Ichikawa A, Matsumoto K (2006) Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1760(9):1355-1363. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.015>
 12. Zhang B, Van Roosmalen IAM, Reis CR, Setroikromo R, Quax WJ (2018) Death receptor 5 is activated by fucosylation in colon cancer cells. *FEBS J* 286:555-571. <https://doi.org/10.1111/febs.14742>
 13. Breiman A, Robles MDL, Trécesson SC, Echasserieau K, Bernardeau K, Drickamer K, Imberty A, Barillé-Nion S, Altare F, LePendou J (2016) Carcinoma-associated fucosylated antigens are markers of the epithelial state and can contribute to cell adhesion through CLEC17A (Prolectin). *Oncotarget* 7(12):14064-14082. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7476>
 14. Carrascal MA, Silva M, Ramalho JS et al (2018) Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation and ERK1/2 and p38 MAPK activation. *Mol Oncol* 12(5):579-593. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12163>
 15. Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A et al (2011) Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res* 71(24):7683-7693. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1139>
 16. Liu LL, Zhao H, Ma TF, Ge F, Chen C, Zhang Y (2015) Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection. *PLoS One* 10(1):e0117058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117058>
 17. Nica AC, Dermitzakis ET (2013) Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1620):20120362. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0362>
 18. Nordén R, Samuelsson E, Nyström K (2017) NF κ B-mediated activation of the cellular FUT3,5 and 6 gene cluster by herpes simplex virus type 1. *Glycobiology* 27(11):999-1005. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx079>

19. Lauc G, Essafi A, Huffman JE et al (2010) Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet* 6(12):e1001256. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001256>
20. Ramsuran V, Ewy R, Nguyen H, Kulkarni S (2018) Variation in the Untranslated Genome and Susceptibility to Infections. *Front Immunol* 9:2046. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02046>
21. Guo YZ, Sun HH, Wang XT, Wang MT (2018) Transcriptomic analysis reveals key lncRNAs associated with ribosomal biogenesis and epidermis differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 19(9):674-688. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700319>
22. Barretina J, Caponigro G, Stransky N et al (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391):603-607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>
23. Ramamoorthy S, Cidlowski JA (2016) Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 42(1):15-31. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002>
24. Fagny M, Paulson JN, Kuijjer ML, Sonawane AR, Chena C, Lopes-Ramos CM, Glassc K, Quackenbush J, Platiga J (2017) Exploring regulation in tissues with eQTL networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(37):E7841-E7850. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707375114>
25. Murk W, DeWan AT (2016) Exhaustive Genome-Wide Search for SNP-SNP Interactions Across 10 Human Diseases. *G3 (Bethesda)* 6(7):2043-2050. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028563>

4.2 ARTIGO 2 – “FUT3 AS A BIOMARKER IN BREAST CANCER: RESEMBLANCE AND DIVERSENESSE AMONG DISTINCT HUMAN POPULATIONS.”

FUT3 as a biomarker in breast cancer: resemblance and diverseness among distinct human populations.

Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento¹, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{1,2}, Cíntia Renata Costa Rocha^{1,2}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil;

² Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

INTRODUCTION

Breast cancer is a complex disease that accounts for the majority of tumor cases among women worldwide¹. Its mortality has been increasing during the past years and continues to be the leading cause of cancer death in the female population^{1,2}. The application of clinical and histopathological predictive factors is important to drive patients' management and treatment selection. Some of the traditional breast cancer biomarkers are histological grade, lymph node involvement, tumor size and molecular profiles³. However, the current breast cancer classification is not completely capable of differentiating breast cancer cases according to their prognostic, especially in triple-negative patients⁴. The research of new biomarkers in breast cancer may be useful to improve prognostic prediction and suggest new target molecules for therapy.

Biomarkers are characteristics that can be objectively measured indicating normal or pathogenic biological processes or response to clinical interventions⁵. Glycosylation is one of the most important cellular mechanisms capable of producing molecules with potential to be biomarkers. This is due to the process's complexity which is highly modulated by different cellular conditions⁶. Fucosylation represents one of the main glycosylation pathways altered in cancer. Fucosylated glycans are synthesized by transferring active L-fucose residues, GDP-fucose, to the acceptor glycan by the action of fucosyltransferases (FUTs)⁷.

The α -1,3/4-fucosyltransferase (FUT3) is a type II transmembrane glycoprotein located on the Golgi apparatus. This enzyme is responsible for catalyzing glycosidic bond formation in α 1,3 or α 1,4 positions⁸. The main products of FUT3 activity are the Sialyl Lewis antigens, glycans frequently found to be elevated in solid tumors, including breast cancer¹⁷. These structures are able to interact with endothelial E-selectins and drive circulating tumor cell adhesion to the vessel wall during the extravasation to secondary sites¹⁸. FUT3 role in tumor biology is also mediated by other glycosylated products. Fucosylation of the T β RI and T β RRII receptors by FUT3 is essential for TGF- β induction of epithelial-mesenchymal transition¹⁹. In addition, FUT3 activity is involved in triggering NK-cell mediated cytotoxicity against tumor cells²⁰. The fucosylation of DR4 and DR5 receptors by FUT3 is also important to the TRAIL-induced apoptosis of tumor cells²¹.

The wide range of important tumor pathways in which FUT3 is involved boosted the investigation of the value of this protein as a tumor biomarker. Initially, when comparing tumor biopsies to non-tumor tissues, FUT3 levels are decreased in oral, prostate and breast cancer²²⁻²⁴. However, despite this FUT3 depletion after oncogenesis, higher expression of this marker was

linked to a reduced overall survival in oral and renal cancer patients^{22,25}. Also, high FUT3 expression have been linked to metastasis in prostate and pancreatic tumor cells^{26,27}. In breast cancer, fucosylated glycans showed to be important to E-selectin ligation, migration and proliferation of tumor cells²⁸. Breast tumors resistant to Doxorubicin also have elevated levels of fucosylated structures²⁹. Facing these divergences, the present study aimed to analyze FUT3 gene and protein expression profiles in a Brazilian population of invasive breast cancer patients and compare the data with other two independent cohorts in order to estimate the potential use of FUT3 as a biomarker in breast cancer.

METHODOLOGY

HUMAN SUBJECTS

Fresh biopsies from forty-seven invasive breast tumors were obtained from women diagnosed with invasive breast cancer and each tissue sample was divided in two fragments. The first fragment was kept under RNeasyTM (Qiagen, Hilden) and preserved at -80°C for posterior RNA extraction. The second one was preserved only at -80°C and used for total protein extraction. Protein and/or RNA samples that did not achieve good quality were excluded from de analysis. Clinical and histopathological characteristics were obtained from patients' hospital records. This study was approved by the local Research Ethics Committee (CAAE 06586612.9.0000.5208 — No. 140.876) and all participants signed the written informed consent.

RNA PURIFICATION AND qPCR

One-hundred milligrams of tumor tissues were macerated in liquid nitrogen and total RNA was extracted by TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the manufactures' instructions. DNA contamination was removed using TURBO DNA-freeTM Kit (Life Technologies, CA). One microgram of total RNA was taken as template in cDNA synthesis using ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI). Twenty nanograms of cDNA were used in each real-time PCR. The reaction was performed using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in the ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Gene expression was evaluated using the following primer pairs: *FUT3*- 5'-CCTGCTGGAGTCCTTTGTGGCC-3' and 5'-GCAGGCAAGTCTTCTGGAGGGG-3'³⁰; *ACTB*- 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' and 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'³¹; *HPRT1*- 5'-GGACCCACGAAGTGTTG-3' and 5'-GGCGATGTCAATAGGACTCC-3'. The relative *FUT3* expression was normalized by the geometric mean of *ACTB* and *HPRT1* gene

expressions. Relative expression was determined by delta C_T method (ΔC_T). QPCR was performed in triplicate.

PROTEIN PURIFICATION AND WESTERN BLOTTING

Total protein extract was respectively obtained from one hundred milligrams tumors preserved at -80°C. Tissues were macerated in TissueLyser II (Qiagen, Hilden) in the presence of 500 μ L extraction buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 4% w/v CHAPS). Then, proteins were purified by precipitation with 10% trichloroacetic acid in acetone. For quantitative FUT3 western blotting, 20 μ g of protein extract underwent electrophoretic separation in a 12.5% SDS-polyacrylamide gel followed by protein transfer to a 0.2 μ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using the semi-dry Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). FUT3 and GAPDH expressions were detected by Western blotting using the following primary and secondary antibodies: Rabbit polyclonal anti-FUT3 antibody (1:1000, Cat. Num. SAB1401146, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody FL-335 (1:1000, Cat. Num. sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:10000, Cat. Num. 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Signal detection was performed using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, IL) by ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Each sample was blotted in triplicate and FUT3 relative expression was calculated using the formula $Mean \frac{FUT3signal}{GAPDHsignal}$.

IN SILICO ANALYSIS OF *FUT3* EXPRESSION IN DIFFERENT POPULATIONS

Clinical and FUT3 expression data from two independent cohorts of breast cancer patients, METABRIC and TCGA, were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics website (<http://www.cbioportal.org/>)^{32,33}. X-tile software (Camp, Dolled-Filhart & Rimm, 2004) was used to identify the ideal cutoff values of FUT3 expression for categorizing the population in high and low expressions for global and disease-free survival analyzes.

STATISTICAL ANALYSIS

Non-categorical variables were tested for normal distribution by D'Agostino and Pearson normality test. Mann-Whitney test (two groups) and Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test (more than two groups) were used for analyzing the relationship between FUT3 expression and clinical variables. Overall and disease-free survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and compared by the log rank test in the univariate analysis. Logistic

regression and Cox regression test were used for multivariate analysis. Spearman correlation test was used to investigate the relationship between mRNA and protein FUT3 levels. All statistical analyzes were performed in GraphPad Prism v. 6 and SPSS v.22 softwares. *P* value minor than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

FUT3 EXPRESSION UNDER INFLUENCE OF NEOADJUVANT TREATMENT

In order to evaluate if FUT3 expression was associated to any clinical-histopathological characteristic of Brazilian breast cancer patients, we first analyzed whether neoadjuvant chemotherapy, drug therapy performed before the surgical procedure, was linked to a significant variation in FUT3 levels. Among the forty-seven participants of this study, fourteen underwent neoadjuvant chemotherapy (gene expression data available for ten patients and protein expression data available for all patients) while thirty-three were submitted to surgery prior any other treatment (mRNA expression data available for all patients and protein expression data available for twenty-nine patients). Gene expression analysis revealed that patients submitted to neoadjuvant therapy showed a tendency to have higher *FUT3* levels than those non-treated. The same pattern was observed regarding FUT3 protein levels. However, these differences were not statistically significant (Figure 1). Therefore, further analyzes were performed only with patients who were not submitted to neoadjuvant chemotherapy (*n* = 33).

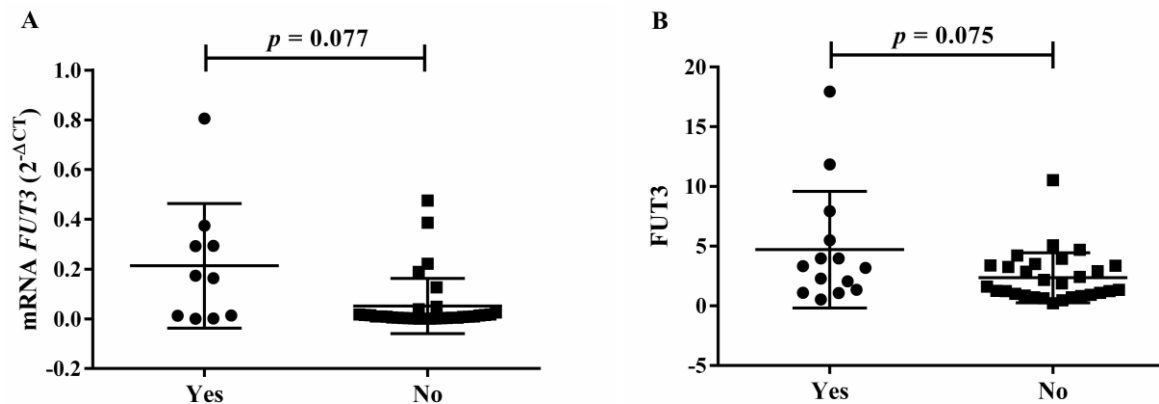


Figure 1: Gene (A; treated, *n* = 10, not-treated, *n* = 33) and protein (B; treated, *n* = 14, not-treated, *n* = 29) expressions of α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT3) in Brazilian invasive breast cancer patients who were (yes) or were not (no) submitted to neoadjuvant chemotherapy. *P* value calculated by Mann Whitney test in GraphPad Prism v. 6 software.

Table 1: FUT3 gene and protein expression in Brazilian invasive breast cancer patients according to their clinical and histopathological characteristics

Clinical-histopathological characteristics	No.	%	<i>FUT3</i> Gene expression	<i>P</i> - value*	No.	%	<i>FUT3</i> Protein expression	<i>P</i> - value*
Age at diagnosis (years)				0.8903				0.0357
< 50 years	15	45.5	0.009774		13	44.8	2.900	
≥ 50 years	18	54.5	0.009360		16	55.2	1.174	
Histological grade				0.7302				0.2767
1	6	18.8	0.012600		05	17.3	3.264	
2	16	50.0	0.006879		15	51.7	1.876	
3	10	31.2	0.009266		09	31.0	1.246	
Lymph node metastasis				0.7708				0.3156
Absente	15	51.7	0.009774		12	48.0	1.562	
Present	14	48.3	0.008754		13	52.0	2.429	
Necrosis				0.5967				0.0921
Absente	14	56.0	0.009324		12	54.5	3.133	
Present	11	44.0	0.007610		10	45.5	1.300	
Tumor-infiltrating lymphocytes				0.7443				0.5320
Absente	3	10.0	0.015300		03	11.1	3.264	
Present	27	90.0	0.008749		24	88.9	1.473	
Vascular invasion				0.2440				0.0393
Absente	18	60.0	0.012640		18	64.3	2.027	
Present	12	40.0	0.004639		10	35.7	0.918	

Legend: *P* value calculated by Mann Whitney test for two-groups categorical variables and by Kruskal-Wallis test for three-groups categorical variables, both using GraphPad Prism v. 6. Software. *P*-values in bold were considered statistically significant.

FUT3 EXPRESSION IS ASSOCIATED TO ABSENCE OF VASCULAR INVASION IN THE BRAZILIAN POPULATION

In Brazilian breast cancer population, *FUT3* mRNA expression was not linked to any clinical-histopathological characteristic evaluated in this study. On the other hand, high protein levels of this enzyme were associated to younger age at diagnosis (age <50 years, $p = 0.036$) and absence of vascular invasion ($p = 0.039$). *FUT3* expression was also higher among the 12 patients without tumor necrosis, although this difference was not statistically significant ($p = 0.092$). Histological grade, presence of lymph node metastasis or presence of tumor lymphocytic infiltrate did not show differences regarding *FUT3* expression (Table 1).

FUT3 EXPRESSION PROFILES DIFFER AMONG DISTINCT HUMAN POPULATIONS

Aiming to validate the results obtained for the Brazilian population analyzed in this work, the present study also evaluated *FUT3* profiles in other two populations affected by invasive breast

cancer. Clinical and gene expression data from two independent cohorts (METABRIC and TCGA) were obtained from the cBioPortal for Cancer Genomics database. Patients from United Kingdom and Canada compose METABRIC cohort, while the TCGA cohort has a more diverse composition with patients from the USA, Russia, Vietnam, Pakistan and Poland. Expression data were obtained by microarray in METABRIC and by RNASeq in TCGA, and both were normalized by z score.

The studied populations showed distinct *FUT3* expression profiles regarding age at diagnosis and tumor stage (Table 2). While METABRIC cohort showed higher gene levels in patients diagnosed before the age of 50 years ($p < 0.0001$), TCGA cohort showed a tendency of higher expression in patients diagnosed at age greater than or equal to 50 years ($p = 0.07$). Also, TCGA cohort showed a reduction in *FUT3* levels as tumor progresses from stage I to stage VI ($p = 0.047$), whereas METABRIC cohort did not present any statistically significant difference in gene expression between tumor stages. However, METABRIC cohort showed an increase in *FUT3* expression as tumor dedifferentiates from histological grade I to III ($p < 0.0001$). *FUT3* levels in TCGA cohort were higher in patients who did not present lymph node metastasis ($p = 0.024$). Unfortunately, information about the patients' histological grade and lymph node metastasis were not available for TCGA and METABRIC cohorts, respectively. Aiming to evaluate if the greater ethnic variability of TCGA cohort was responsible for these differences, it was performed the same previous analysis in TCGA ethnic subgroups, non-hispanic white and non-spanic black patients. We did not found any important differences between the overall and subgroups *FUT3* profiles (data not shown). The small number of individuals in the Hispanic group hampered its analysis.

FUT3 EXPRESSION IS LINKED TO DIFFERENT LEVELS OF TRADITIONAL MOLECULAR MARKERS OF BREAST CANCER

In both cohorts, elevated levels of *FUT3* mRNA were associated to absence of estrogen (METABRIC, $p < 0.0001$; TCGA, $p < 0.0001$) and progesterone receptors (METABRIC, $p < 0.0001$; TCGA, $p < 0.0001$). High levels of *FUT3* transcript were also associated to HER-2 overexpression (METABRIC, $p < 0.0001$; TCGA, $p = 0.0003$). This pattern was probably responsible for the differences in *FUT3* expression observed among breast cancer molecular subtypes in METABRIC cohort. *FUT3* expression was lower in luminal tumors, intermediate in triple-negative tumors, and higher in HER-2 overexpressing tumors ($p < 0.0001$).

FUT3 EXPRESSION AS A SURVIVAL BIOMARKER IN BREAST CANCER PATIENTS

In order to analyze patients' survival, they were categorized into low and high *FUT3* expressions. The cut-off values used were established by the minimal *p* value approach using the X-tile software. Kaplan-Meier curves were created for both cohorts and univariate analysis was performed by Log-rank test using SPSS v. 22 (Figure 2). In both cohorts, high *FUT3* expression patients presented lower overall survival when compared to patients with low *FUT3* expression (METABRIC, mean 183.4 months, 95% CI: 164.6-202.3 vs 236.8 months, 95% CI: 226.8-246.9, $p < 0.001$; TCGA, mean 154.5 months, 95% CI: 118-191 vs 163.2 months, 95% CI: 141-185.3, $p = 0.012$). Disease-free survival data was only available for TCGA cohort. In this population, *FUT3* levels were not related to tumor recurrence (high vs low: mean 219 months, 95% CI: 198.3-239.7 vs 155.1 months, 95% CI: 127.4-182.9, $p = 0.157$).

FUT3 expression has been related to clinical and histopathological factors which are also capable of affecting the overall survival of breast cancer patients. Thus, it was performed a multivariate analysis using Cox regression model to determine if the expression of this gene is an independent risk factor in these two populations. After multivariate analysis *FUT3* expression showed to be an independent risk factor only for TCGA cohort (Table 3). In this population, risk of death due the disease in patients with breast tumors is approximately 3 times higher in patients with high *FUT3* levels than those with low *FUT3* levels ($p < 0.001$). Menopausal status and tumor stage were also independently related to the patients' overall survival in this cohort. Postmenopausal women and patients with stage advanced tumors had an increased risk of death. In METABRIC population, the characteristics that remained associated with the overall survival of breast cancer patients after multivariate analysis were histological grade, expression of estrogen and progesterone receptors, and HER-2 expression. Patients with less differentiated tumors (histological grade 3), hormone receptor-negative and HER-2-positive tumors were at high risk.

Facing the lack of association between *FUT3* expression and patients' overall survival in METABRIC cohort after multivariate analysis, this analysis was then performed in different population subgroups defined by the expression pattern of traditional molecular markers. METABRIC cohort patients were thus divided: ER/PR+, those who expressed the estrogen receptor and/or the progesterone receptor; HER-2+, those overexpressing HER-2; and ER/PR/HER-2-, those who did not express any of the previous markers. Univariate analysis using Log rank test showed the association between *FUT3* expression and overall survival in the ER/PR+

group (high vs low: 212.8 months, 95% CI: 184.9-240.6 vs mean 242.2 months, 95% CI: 231.4-252.9, $p = 0.048$) and in the ER/PR/HER-2- group (high vs low: 173.9 months 95% CI: 145.8-201.9 vs 204.1 months, 95% CI: 186.8-221.4, $p = 0.01$) but not in the HER-2+ group (high vs low: 173.9 months, 95% CI: 145.1-202.6 vs 158.4 months, 95% CI: 137.1 -179.6, $p = 0.816$) (Figure 2). After multivariate analysis, only patients in ER/PR/HER-2- group maintained this relationship, in which FUT3 overexpression determined a 59.4% increase in the risk of death due the disease (Table 3).

Table 2: *FUT3* expression in invasive breast cancer patients from METABRIC and TCGA cohorts according to their clinical and histopathological characteristics.

Clinical-histopathological characteristics	TCGA n = 816			METABRIC n = 1904		
	n	<i>FUT3</i> z score	<i>p</i> value*	n	<i>FUT3</i> z score	<i>p</i> value*
Age at diagnosis (years)			0.07			<0.0001
< 50 years	220	1891		411	4322	
≥ 50 years	596	2446		1493	2920	
Menopausal Status			0.427			
Pre	165	2370		N/A	N/A	N/A
Post	538	2380				
Tumor Stage			0.047			0.4030
0	0	-		5	-2064	
IA/IB	140	2054		458	3195	
IIA/IIB	461	2751		761	3309	
IIIA/IIIB/IIIC	184	1523		106	2967	
VI	13	-0.134		9	5562	
Histological grade						<0.0001
1				163	278	
2	N/A	N/A	N/A	745	2100	
3				921	4762	
Lymph node metastasis			0.024			
Absent	339	3113		N/A	N/A	N/A
Present	347	1655				
Estrogen Receptor			<0.0001			<0.0001
Negative	175	6072		445	9302	
Positive	601	1235		1459	1369	
Progesteron Receptor			<0.0001			<0.0001
Negative	251	5111		897	5396	
Positive	522	999.6		1007	1287	
HER-2			0.0003			<0.0001
Negative	417	1997		1668	2244	
Positive	121	4469		236	10143	
Molecular Subtype						<0.0001
Luminal A				676	1159	
Luminal B				460	1049	
Normal-like	N/A	N/A	N/A	141	3110	
HER-2 overexpression				219	11163	
Basal-like				200	7333	
Claudin-low				202	2575	

Legend: *P* value calculated by Mann Whitney test for two-groups categorical variables and by Kruskal-Wallis test for three-groups categorical variables, both using GraphPad Prism v. 6. Software. *P*-values in bold were considered statistically significant. n: number of samples. N/A: Data not available.

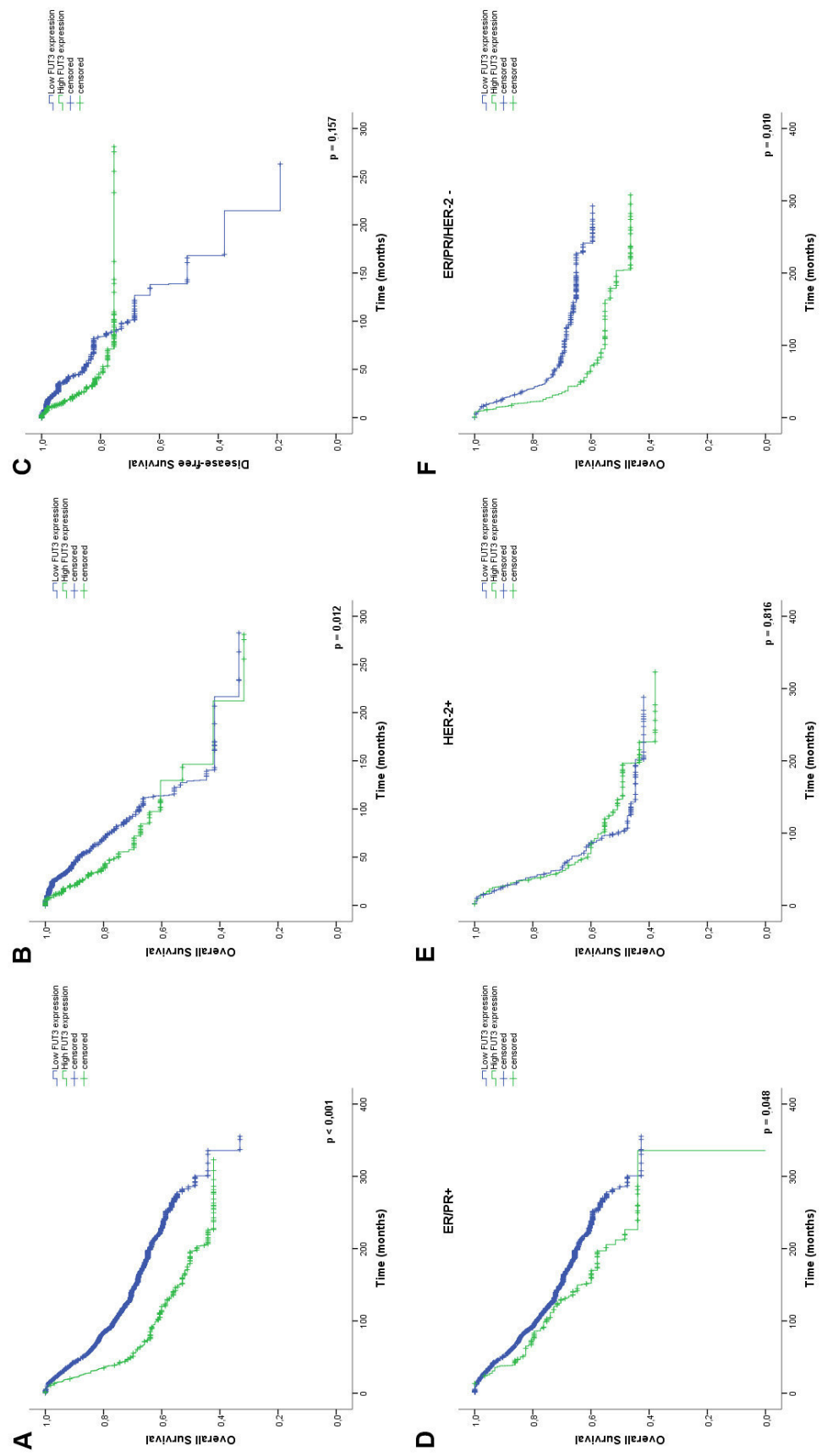


Figure 2: Kaplan Meier overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) curves of invasive breast cancer patients categorized according to *FUT3* levels. (A) METABRIC cohort OS curve; (B) TCGA cohort OS curve; (C) METABRIC ER/PR+ cohort OS curve; (D) METABRIC ER/PR/HER-2- cohort OS curve; (E) METABRIC ER/PR+ cohort DFS curve; (F) METABRIC ER/PR/HER-2- cohort DFS curve. *P* value calculated by Log rank test using SPSS software v. 22. Legend: ER- Estrogen Receptor; PR- Progesterone Receptor.

Table 3: Uni- and multivariate analyses of breast cancer patients' overall survival in METABRIC and TCGA cohorts according to *FUT3* levels and clinical and histopathological characteristics.

	METABRIC						TCGA Cell					
	Univariate Analysis			Multivariate Analysis			Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
<i>FUT3</i> expression												
Low vs High	0.507	0.462-0.703	<0.001	0.800	0.635-1.008	0.058	0.611	0.414-0.902	0.013	0.328	0.197-0.545	<0.001
Age at diagnosis												
< 50 vs ≥ 50	1.094	0.911-1.315	0.336	0.974	0.807-1.174	0.779	0.591	0.384-0.910	0.017	0.838	0.352-1.995	0.690
Menopausal Status												
Pre vs Post	1.094	0.911-1.315	0.336	0.974	0.807-1.174	0.779	0.504	0.273-0.933	0.029	0.451	0.241-0.844	0.013
Tumor stage												
0 vs IV	0.000	0.00-3.51e ⁷²	0.915	0.000	0.000-3.43e ⁷⁷	0.924	-	-	-	-	-	-
IA/IB vs IV	0.554	0.177-1.739	0.312	0.672	0.214-2.111	0.496	0.086	0.037-0.200	<0.001	0.069	0.024-0.202	<0.001
IIA/IIB vs IV	0.576	0.185-1.800	0.343	0.701	0.224-2.194	0.541	0.159	0.081-0.315	<0.001	0.164	0.069-0.390	<0.001
IIIA/IIIB/IIIC vs IV	0.480	0.147-1.574	0.226	0.662	0.202-2.176	0.497	0.329	0.164-0.660	0.002	0.369	0.151-0.901	0.029
Histological grade												
1 vs 3	0.321	0.214-0.481	<0.001	0.355	0.236-0.534	<0.001						
2 vs 3	0.609	0.514-0.721	<0.001	0.655	0.552-0.779	<0.001	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Lymph node metastasis												
Negative vs positive	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.381	0.247-0.588	<0.001	0.773	0.401-1.490	0.442
Estrogen Receptor												
Negative vs positive	1.710	1.439-2.031	<0.001	1.236	1.019-1.501	0.032	1.311	0.860-1.997	0.208	1.547	0.949-2.610	0.079
Progesterone Receptor												
Negative vs positive	1.622	1.385-1.901	<0.001	1.267	1.066-1.505	0.007	1.313	0.894-1.928	0.166	1.546	0.970-2.464	0.067
HER-2												
Negative vs positive	0.484	0.396-0.593	<0.001	0.564	0.457-0.694	<0.001	0.586	0.337-1.019	0.058	0.758	0.374-1.536	0.442
ER/PR+ group												
<i>FUT3</i> expression												
Low vs High	0.731	0.535-0.999	0.049	0.830	0.605-1.139	0.248	na	na	na	na	na	na
HER-2+ group												
<i>FUT3</i> expression												
Low vs High	1.045	0.722-1.511	0.816	1.096	0.747-1.608	0.639	na	na	na	na	na	na
ER/PR/HER-2- group												
<i>FUT3</i> expression												
Low vs High	0.611	0.418-0.893	0.011	0.627	0.429-0.917	0.016	na	na	na	na	na	na

Legend: N/A – Data not available; na – Not accessed; HR – Harzad Ratio; 95% CI - 95% confidence interval; p value calculated by Cox regression test in SPSS v.22 software.

DISCUSSION

Biomarker establishment in human disease is a complex research field. After the discovery of a new potential biomarker, this molecule needs to be analytically and clinically validated. Specifically when high-throughput *omics* technologies are used, problems with overfitting need to be eliminated through external validation with different populations³⁴. Here, it was analyzed *FUT3* expression in three different and independent populations with growing sample sizes to establish the profile of this glycosyltransferase in tumors of patients with invasive breast cancer. However, since the assessment of *FUT3* expression in these cohorts was made by different analytical approaches, this work represents an initial effort to characterize its profiles among populations.

The first analyzed cohort was composed by Brazilian women diagnosed with invasive breast cancer (n = 43). In this population patients treated with neoadjuvant chemotherapy showed a tendency to have high *FUT3* gene and protein levels, although this different profile was not statistically significant. Expression modulation of this fucosyltransferase could explain in parts the change in serum levels of N-glycans observed after successful neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. In these patients, four cycles of preoperative treatment with fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide elevated the serum levels of α 1,3-fucosylated N-glycans³⁵. Future investigations regarding the role of neoadjuvant chemotherapy on the expression of glycosyltransferases, including *FUT3*, may be important for discovering new markers of therapeutic response to these drugs.

In Brazilian patients, high *FUT3* protein levels were associated with diagnosis under the age of 50 and absence of vascular invasion. *FUT3* high expression was also observed in patients who did not present tumor necrosis, but this difference was not statistically significant. Presence of vascular invasion and necrosis are factors classically associated with lower breast cancer patients' survival^{36,37}.

After assessing *FUT3* gene profiles in METABRIC and TCGA cohorts, a marked difference was observed between the patterns presented by the three populations. As it was found for protein levels in Brazilian population, METABRIC cohort showed higher *FUT3* expression in patients diagnosed at age before 50 years. In TCGA cohort, *FUT3* levels decreased in patients with more advanced tumor stages and in patients who presented lymph node metastasis. METABRIC cohort, on the other hand, presented higher *FUT3* mRNA expression levels in less differentiated tumors. Tumor stage and histological grade are independent factors for overall survival in the TCGA and METABRIC cohorts, respectively (Table 4). Lymph node involvement is also an independent prognostic factor in breast cancer³⁸.

Together, these data denote that *FUT3* expression is higher in patients from Brazilian and TCGA cohorts who presented features previously associated to a good prognosis. Contrarily, For METABRIC population, higher *FUT3* levels were founded in patients who presented characteristics linked to a poor prognosis.

Differences found in *FUT3* expression profiles among cohorts may come from different ethnic compositions of each unique population. METABRIC cohort consists of 1904 patients from the United Kingdom and Canada, while the TCGA cohort consists of a more diverse group of 816 patients from the USA, Russia, Vietnam, Pakistan and Poland. Genetic differences presented among ethnic groups and the diverse contributions of each group in highly mixed populations can influence gene expression patterns and their relationship with pathophysiological characteristics³⁹. In Brazil, this becomes even more relevant due to the elevated ethnic variability of its population generated by high rates of interethnic unions that occurred during its history⁴⁰.

Regarding the relationship between this glycosyltransferase and traditional breast cancer molecular markers, *FUT3* expression was consistently associated to hormone receptor negativity and to HER-2 overexpression in both populations in which this data was available. These data are in agreement with previous studies reporting theses associations in breast cancer patients from Brazil and United Kingdom and in gastric cancer cell models^{24,30,41}. Hormone receptors are able to modulate gene expression through different mechanisms, acting directly as transcription factors or indirectly through modifications in transcription factors and/or microRNAs levels^{42,43}. On the other hand, it is not well established how HER-2 regulates gene expression, even knowing that breast tumor cells stratified by HER-2 levels have different transcriptional profiles⁴⁴. Future elucidation of the mechanisms involved in the influence of theses markers on *FUT3* expression will be important for better understanding the interplay between these pathways during breast cancer progression.

Survival analysis showed that high *FUT3* expression is a marker of reserved prognosis in both TCGA and METABRIC populations. This relationship is maintained after multivariate analysis in patients from TCGA and in triple-negative patients from METABRIC. This relationship was found despite different *FUT3* profiles presented by the analyzed cohorts. The fact that *FUT3* is underexpressed in breast tumors when compared to normal tissues also goes against this finding²⁷. This apparent controversy has also been characterized in oral cancer. Oral tumors showed lower *FUT3* protein levels than adjacent normal tissues, although high *FUT3* mRNA expression was associated to reduced overall survival²². The glycosylase α -L-fucosidase 1 (FUCA1), responsible for catalyzing the removal of α -L-fucose residues, also

present an unique profile in breast cancer. *FUCA1* mRNA levels are elevated in breast tumors in comparison to adjacent normal breast tissue, nevertheless high levels of this enzyme is a marker of longer overall survival^{45,46}. FUT3 and FUCA1 present antagonistic roles during the synthesis of fucosylated glycans. High FUT3 together with low FUCA1 levels probably results in raised fucosylated glycans, suggesting its involvement in tumor progression.

FUT3 and FUCA1 levels change during tumor establishment from FUT3^{low}/FUCA1^{high} during breast cell transformation to FUT3^{high}/FUCA1^{low} during tumor progression to more lethal lesions. This alteration could be explained by regulatory processes temporally-dependent and to clone selection, events that occur during tumor switch from a localized lesion to metastasis. Reduced FUT3 activity during early stages of cell transformation could be important to avoid tumor recognition by immune cells and cell death^{20,21}. Thus, FUT3^{low} recent-transformed cells could evade immune surveillance and establish the primary tumor. After tumor progresses, FUT3 expression is important to provide proper fucosylation of TGF- β receptors, allowing TGF- β epithelial-mesenchymal transition. Mesenchymal phenotype leads to a higher cell mobility, which facilitates tumor vascular intravasation¹⁹. FUT3 activity is also involved in the synthesis of Lewis antigens, glycans recognized by endothelial selectins. This mechanism mediates tumor cell rolling through the vessel wall, leading to tumor vascular extravasation to secondary sites²⁸. Together, both FUT3-related pathways result in the establishment of distant metastasis and, consequently, the rise in death risk⁴⁷.

In summary, this work showed that FUT3 expression profile differs among populations, due its association to breast cancer characteristics previously linked to a good or poor prognosis, depending on the analyzed cohort. However, high *FUT3* levels were consistently associated to reduced overall survival. The duality presented by breast tumor cells regarding FUT3 levels during tumor progression could be explained by the involvement of this enzyme in pro-tumor and anti-tumor mechanisms. The evaluation of these pathways specifically in breast tumors would be important to determine the potential of FUT3 and related molecules as breast cancer biomarkers.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-E386.
3. Colomer R, Aranda-López I, Albanell J, et al. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol*. 2018;20(7):815-826.
4. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol*. 2015;6(6):252-263.
5. Califf, RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):213-221.
6. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(6):477-488.
7. Pinho SS, Reis AR. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(9):540-555.
8. Colomb F, Robbe-Masselot C, Groux-Degroote S, et al. Epithelial mucins and bacterial adhesion. *J Carbohydr Chem*. 2014;40:596–623.
9. Czerwinski MJ, Desiderio V, Shkeir O, et al. In vitro evaluation of sialyl Lewis X relationship with head and neck cancer stem cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;149(1):97-104.
10. Borzym-Kluczyk M, Radziejewska I, Cechowska-Pasko M. Increased expression of MUC1 and sialyl Lewis antigens in different areas of clear renal cell carcinoma. *Clin Exp Nephrol*. 2015;19(4):732-737.
11. Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, et al. Expression of Sialyl Lewis X , Sialyl Lewis a , E-Cadherin and Cathepsin-D in Human Breast Cancer : Immunohistochemical Analysis in Mammary Carcinoma In Situ. *Anticancer Res*. 2005;25(3A):1615-1622.
12. Mare L, Caretti A, Albertini R, Trinchera M. CA19.9 antigen circulating in the serum of colon cancer patients: Where is it from? *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(4):792-797.

13. Kim DH, Oh SJ, Oh CA, et al. The relationships between perioperative CEA, CA 19-9, and CA 72-4 and recurrence in gastric cancer patients after curative radical gastrectomy. *J Surg Oncol*. 2011;104(6):585-591.
14. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(2):105-119.
15. Kikkawa S, Sogawa K, Satoh M, et al. Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Int J Proteomics*. 2012;2012:108609.
16. Dimitroff CJ, Lechpammer M, Long-Woodward D, Kutok JL. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res*. 2004;64(15):5261-5269.
17. Komatsu H, Mizuguchi S, Izumi N, et al. Sialyl Lewis X as a predictor of skip N2 metastasis in clinical stage IA non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol*. 2013;11:309.
18. Burdick MM, Henson KA, Delgadillo LF, et al. Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? *Front Oncol*. 2012;2:103.
19. Hirakawa M, Takimoto R, Tamura F, et al. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2014;110(1):156-163.
20. Higai K, Ichikawa A, Matsumoto K. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(9):1355-1363.
21. Zhang B, Van Roosmalen IAM, Reis CR, et al. Death receptor 5 is activated by fucosylation in colon cancer cells. *FEBS J*. 2018.
22. Vajaria BN, Patel KR, Begum R, et al. Expression of Glycosyltransferases; ST3GAL1, FUT3, FUT5, and FUT6b Transcripts in Oral Cancer. *Glycobiol Insights*. 2014;4:7-14.
23. Vasconcelos JLA, Ferreira SA, Lima AL, et al. Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Acta Histochem Cytochem*. 2013;46(3):105-109.
24. Nascimento JCF, Ferreira SA, Vasconcelos JLA, et al. Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. *Exp Mol Pathol*. 2015;99(3):409-415.

25. Meng L, Xu L, Yang Y, et al. High expression of FUT3 is linked to poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(37):61036-61047.
26. Barthel SR, Wiese GK, Cho J, et al. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(46):19491-19496.
27. Aubert M, Panicot-Dubois L, Crotte C, et al. Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by antisense FUT3 sequence. *Int J Cancer*. 2000;88(4):558-565.
28. Carrascal MA, Silva M, Ramalho JS, et al. Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation and ERK1/2 and p38 MAPK activation. *Mol Oncol*. 2018;12(5):579-593.
29. Ma H, Miao X, Ma Q, et al. Functional roles of glycogene and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells. *IUBMB Life*. 2013;65(5):409-422.
30. Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A, et al. Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res*. 2011;71(24):7683-7693.
31. Liu LL, Zhao H, Ma TF, et al. Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection. *PLoS One*. 2015;10(1):e0117058.
32. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016;7:11479.
33. Ciriello G, Gatza ML, Beck AH, et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*. 2015;163(2):506-519.
34. Duffy MJ, Sturgeon CM, Sölétormos G, et al. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clin Chem*. 2015;61(6):809-820.
35. Saldoval R, Haakensen VD, Rødland E, et al. Serum N-glycome alterations in breast cancer during multimodal treatment and follow-up. *Mol Oncol*. 2017;11(10):1361-1379.
36. Fujii T, Yajima R, Hirakata T, et al. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. *Anticancer Res*. 2014;34(3):1255-1259.

37. Xu Z, Marko NF, Angelov L, et al. Impact of preexisting tumor necrosis on the efficacy of stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases in women with breast cancer. *Cancer*. 2012;118(5):1323-1333.
38. Tang C, Wang P, Li X, et al. Lymph node status have a prognostic impact in breast cancer patients with distant metastasis. *PLoS One*. 2017;12(8): e0182953.
39. Li Y, Steppi A, Zhou Y, et al. Tumoral expression of drug and xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer patients of different ethnicities with implications to personalized medicine. *Sci Rep*. 2017;7(1):4747.
40. Salzano FM, Sans M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol*. 2014;37(1):151-170.
41. Duarte HO, Balmaña M, Mereiter S, et al. Gastric Cancer Cell Glycosylation as a Modulator of the ErbB2 Oncogenic Receptor. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11): E2262.
42. Zheng Y, Shao X, Huang Y, et al. Role of estrogen receptor in breast cancer cell gene expression. *Mol Med Rep*. 2016;13(5):4046-4050.
43. Castellano L, Giamas G, Jacob J, et al. The estrogen receptor- α -induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15732-15737.
44. Rahmatpanah FB, Jia Z, Chen X, et al. A class of genes in the HER2 regulon that is poised for transcription in breast cancer cell lines and expressed in human breast tumors. *Oncotarget*. 2015;6(2):1286-1301.
45. Cheng T, Tu S, Chen L, et al. Down-regulation of α -L-fucosidase 1 expression confers inferior survival for triple-negative breast cancer patients by modulating the glycosylation status of the tumor cell surface. *Oncotarget*. 2015; 6(25): 21283–21300.
46. Milde-Langosch K, Karn T, Schmidt M, et al. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;145(2):295-305.
47. Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012;9(5):311-320.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho pode concluir que diferentes genótipos do polimorfismo rs2306969 (-6933 C>T) localizado na região promotora do gene *FUT3* não alteram a expressão proteica em células tumorais mamárias não estimuladas. Esta variação também não foi associada a diferentes níveis transcricionais e proteicos da α 1,3/4-fucosiltransferase em tumores obtidos de pacientes com câncer de mama invasivo. Contudo, diante da complexa rede de mecanismos nos quais variações não-codificantes podem estar envolvidas, o papel biológico desse polimorfismo no câncer não pode ser prematuramente rejeitado. A avaliação do seu impacto na modulação de outros genes, em outros tecidos, sob diferentes estímulos ou em associação com outros SNPs deve ser realizada a fim de trazer novas informações sobre a importância deste polimorfismo e demais SNPs não-codificantes na fisiopatologia do câncer.

A análise da expressão de *FUT3* em pacientes com câncer de mama provenientes de três coortes independentes revelou diferentes perfis de expressão de acordo com a população avaliada. Para a população brasileira, altos níveis proteicos foram associados ao diagnóstico em idade inferior aos 50 anos e ausência de invasão vascular. Para a coorte METABRIC, alta expressão do gene *FUT3* foi associada ao diagnóstico em idade inferior aos 50 anos e tumores menos diferenciados. Por fim, para a coorte TCGA, a expressão elevada de *FUT3* foi ligada a tumores em estágios mais precoces e ausência de invasão linfonodal.

Embora a expressão de *FUT3* tenha sido relacionada a características tumorais ligadas a valores prognósticos distintos nas coortes METABRIC e TCGA, a relação deste gene com a expressão dos receptores hormonais e HER-2 se comportou de maneira semelhante. Altos níveis de *FUT3* foram encontrados em tumores negativos para os receptores de estrogênio e progesterona e positivos para HER-2. A análise de sobrevida também se manteve consistente entre essas duas coortes, mostrando que alta expressão de *FUT3* está associada a menor sobrevida global dos pacientes da coorte TCGA e dos pacientes triplo-negativos da coorte METABRIC. Estes dados demonstram que mesmo diante de distintos perfis de expressão, *FUT3* apresenta potencial para ser utilizada com um marcador prognóstico em pacientes com câncer de mama invasivo de diferentes populações.

Por fim, analisando os dados obtidos neste trabalho com os presentes na literatura sobre a *FUT3* e o câncer de mama, observa-se uma disparidade entre a redução nos níveis desta enzima durante a transformação de uma célula mamária normal para uma célula tumoral e a associação dos seus altos níveis com a menor sobrevida global dos pacientes. Teorizamos, então que esta dinâmica encontrada em tumores mamários seja decorrente do processo de seleção clonal e mecanismos de regulação gênica posteriores, eventos que ocorrem durante a

carcinogênese e progressão tumoral de lesão localizada para metástase. Níveis reduzidos de FUT3 durante os estágios iniciais da transformação celular protegeriam as células tumorais do reconhecimento pelo sistema imune, enquanto que após o estabelecimento do tumor primário a expressão de FUT3 seria importante para permitir a transição epitélio-mesenquimal induzida pelo TGF- β e síntese dos antígenos de Lewis. Juntos, esses processos facilitariam a mobilidade celular e consequente entrada nos vasos sanguíneos e posterior extravasamento vascular para sítios secundários, respectivamente. Como resultados, altos níveis de FUT3 facilitariam o estabelecimento da metástase e, conseqüentemente, aumentariam o risco de morte dos pacientes. Assim, a investigação desses mecanismos especificamente em tumores mamários será fundamental estabelecer e compreender o papel da FUT3 e moléculas relacionadas como biomarcadores no câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, K. et al. Identification of candidate biomarkers with cancer-specific glycosylation in the tissue and serum of endometrioid ovarian cancer patients by glycoproteomic analysis. **Proteomics**, v. 10, n. 3, p. 470–481, 2010.
- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1347–1353, 2012.
- ASHKANI, J.; NAIDOO, K. J. Glycosyltransferase Gene Expression Profiles Classify Cancer Types and Propose Prognostic **Subtypes**. **Scientific Reportes**, v. 6, p. 26451, 2016.
- AUBERT, M. et al. Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by antisense FUT3 sequence. **International Journal of Cancer**, v. 88, p. 558–565, 2000.
- BALLEHANINNA, U. K.; CHAMBERLAIN, R. S. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. **Journal of gastrointestinal oncology**, v. 3, n. 2, p. 105–19, 2012.
- BANE, A. Ductal Carcinoma In Situ: What the Pathologist Needs to Know and Why. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2013, 2013.
- BARRETITA, J. et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. **Nature**, v. 483, n. 7391, p. 603–607, 2012.
- BARTHEL, S. R. et al. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 46, p. 19491–19496, 2009.
- BAUMANN, H. et al. Neutral fucolipids and fucogangliosides of rat hepatoma HTC and H35 cells, rat liver, and hepatocytes. **Cancer Research**, v. 39, p. 2637–2643, 1979.
- BECKER, D. J.; LOWE, J. B. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, v. 13, n. 7, p. 41R–53R, 2003.
- BORZYM-KLUCZYK, M., RADZIEJEWSKA, I., CECHOWSKA-PASKO, M. Increased expression of MUC1 and sialyl Lewis antigen in different areas of clear renal cell carcinoma. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 19, p. 732–737, 2015.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.
- BRAZIL, J. C. et al. Fut3-dependent synthesis of sLe^a on CD44v6 mediates PMN detachment from intestinal epithelium during transepithelial migration. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 9, p. 4804–4817, 2013.

- BREIMAN, A. et al. Carcinoma-associated fucosylated antigens are markers of the epithelial state and can contribute to cell adhesion through CLEC17A (Prolectin). **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14064-14082, 2016.
- BURDICK, M. M. et al. Expression of E-selectin ligands on circulating tumor cells: cross-regulation with cancer stem cell regulatory pathways? **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. August, p. 1–11, 2012.
- CAAN, B. J. et al. Intrinsic subtypes from the PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer survivor cohort: Prognostication of short- and long-term outcomes. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 23, n. 5, p. 725–734, 2014.
- CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213-221, 2018.
- CAMP, R. L.; DOLLED-FILHART, M.; RIMM, D. L. X-Tile: A New Bio-Informatics Tool for Biomarker Assessment and Outcome-Based Cut-Point Optimization. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7252–7259, 2004.
- CARDIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213-221, 2018.
- CARRASCAL, M. A. et al. Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation and ERK1/2 and p38 MAPK activation. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 5, p. 579-593, 2017.
- CASTELLANO, L., et al. The estrogen receptor- α -induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 37, p. 15732-15737, 2009.
- CHEN, Z. et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma. **Plos One**, v. 12, n. 9, p. 1-17, 2017.
- CHENG, T. et al. Down-regulation of α -L-fucosidase 1 expression confers inferior survival for triple-negative breast cancer patients by modulating the glycosylation status of the tumor cell surface. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21283-21300, 2015.
- CIRIELLO, G. et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 506–519, 2015.
- COLOMB, F. et al. Epithelial mucins and bacterial adhesion. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 40, p. 596–623, 2014.
- COLOMER, R., et al. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. **Clinical and Translational Oncology**, v. 20, n. 7, p. 815-826, 2018.
- CORVELO, T. C. O. et al. The Lewis Histo-Blood Group System: Molecular Analysis of the 59T.G, 508G.A, and 1067T.A Polymorphisms in an Amazonian Population. **Plos One**, v. 8, . 7, p. e69908, 2013.

CURIGLIANO, G. et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1700–1712, 2017.

CZERWINSKI, M. J. et al. In vitro evaluation of sialyl Lewis X relationship with head and neck cancer stem cells. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 149, n. 1, p. 97–104, 2013.

DABROWSKA, A. et al. Promoter analysis of the human alpha1,3/4-fucosyltransferase gene (FUT III). **Biochimica et biophysica acta**, v. 1731, n. 1, p. 66–73, 2005.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DAVID L. Lewis Antigens. In: Schwab M. (eds) **Encyclopedia of Cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011.

DEMING, Y. et al. Genetic studies of plasma analytes identify novel potential biomarkers for several complex traits. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–17, 2016.

DESIDERIO, V. et al. Increased fucosylation has a pivotal role in invasive and metastatic properties of head and neck cancer stem cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 1, p. 71–84, 2015.

DIMITROFF, C. et al. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. **Cancer Research**, v. 64, p. 5261–5269, 2004.

DONG, S. et al. Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 483, n. 1, p. 171–177, 2017.

DUARTE, H. O., et al. Gastric Cancer Cell Glycosylation as a Modulator of the ErbB2 Oncogenic Receptor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. E2262, 2017.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation- potential for therapeutics and diagnostics. **Nature reviews: Drug discovery**, v. 4, n. 6, p. 477–488, 2005.

DUELL, E. J. et al. Variation at ABO histo-blood group and FUT loci and diffuse and intestinal gastric cancer risk in a European population. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 4, p. 880–893, 2015.

DUFFY, M. J., et al. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 809–820, 2015.

EHINGER, A. et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. **Acta Oncologica**, v. 56, n. 1, p. 68–74, 2016.

FAGNY, M., et al. Exploring regulation in tissues with eQTL networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 37, p. E7841-E7850, 2017.

FERLAY, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **The International Journal of Cancer**, v.136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FERREIRA, H. J.; ESTELLER, M. Non-coding RNAs, epigenetics, and cancer: tying it all together. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 55-73, 2018.

FUJII, T., et al. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. **Anticancer Research**, v. 34, n. 3, p. 1255-1259, 2014.

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

GIULIANO, A. E. et al. Breast Cancer—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 4, p. 291-303, 2017.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. 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. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

GOOSSENS, N. et al. Cancer biomarker discovery and validation. **Translational Cancer Research**, v. 4, n. 3, p. 256-269, 2015.

GROUX-DEGROOTE, S. et al. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis X epitopes in the human bronchial mucosa. **The Biochemical Journal**, v. 410, n. 1, p. 213–223, 2008.

GUO, Y. Z., SUN, H. H., WANG, X. T., WANG, M. T. Transcriptomic analysis reveals key lncRNAs associated with ribosomal biogenesis and epidermis differentiation in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Zhejiang University**, v. 19, n. 9, p. 674-688, 2018.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASHIM, O. H., JAYAPALAN, J. J., LEE, C. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p. e3784, 2017.

HE M. et al. A genome wide association study of genetic loci that influence tumour biomarkers cancer antigen 19-9, carcinoembryonic antigen and alpha fetoprotein and their associations with cancer risk. **Gut**, v. 63, n. 1, p. 143-151, 2014.

HE, R. et al. High level of STAT4 expression is associated with the deterioration of breast cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 6, p.11612-11618, 2016.

HIGAI, K.; ICHIKAWA, A.; MATSUMOTO, K. Binding of sialyl Lewis X antigen to lectin-like receptors on NK cells induces cytotoxicity and tyrosine phosphorylation of a 17-kDa protein. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, p. 1355–1363, 2006.

HIRAKAWA, M. et al. Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 1, p. 156–63, 2014.

HU, D. et al. Association of Ulcerative Colitis with FUT2 and FUT3 Polymorphisms in Patients from Southeast China. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. e0146557, 2016.

HUANG, J. et al. Low BIK outside-inside-out interactive inflammation immune-induced transcription-dependent apoptosis through FUT3-PMM2-SQSTM1-SFN-ZNF384. **Immunologic Research**, v. 64, p. 461–469, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. [s.l: s.n.]. p. 1–126, 2017.

ISHIBASHI, Y. et al. Regulation of sialyl-Lewis x epitope expression by TNF- α and EGF in an airway carcinoma cell line. **Glycoconjugate Journal**, v. 22, n. 1-2, p. 53–62, 2005.

JAVAUD, C. et al. The fucosyltransferase gene family : an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. **Genetica**, v. 118, p. 157–170, 2003.

JESCHKE, U. D. O. et al. Expression of Sialyl Lewis X , Sialyl Lewis A , E-Cadherin and Cathepsin-D in Human Breast Cancer : Immunohistochemical Analysis in Mammary Carcinoma In Situ. **Anticancer Research**, v. 1622, p. 1615–1622, 2005.

JULIEN, S. et al. Selectin ligand sialyl-Lewis X antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. **Cancer Research**, v. 71, n. 24, p. 7683-7693, 2011.

KATKOORI, V. R. et al. Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. e30020, 2012.

KHURANA, E. et al. Role of non-coding sequence variants in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 2, p. 93-108, 2016.

KIKKAWA, S. et al. Identification of a Novel Biomarker for Biliary Tract Cancer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **International journal of proteomics**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

KIM, D. H. et al. The relationships between perioperative CEA, CA 19-9, and CA 72-4 and recurrence in gastric cancer patients after curative radical gastrectomy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 104, n. March, p. 585–591, 2011.

KNUDSON, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews**, v.1, p. 157-162, 2001.

KOMATSU, H. et al. Sialyl Lewis X as a predictor of skip N2 metastasis in clinical stage IA non-small cell lung cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, p. 309, 2013.

LAKHANI, S. R. et al. Tumors of the Breast. In: **WHO Classification of Tumours of the Breast**. 4. ed. [s.l.] IARC, 2012. p. 1–112.

LAUC, G. et al. Genomics meets glycomics-the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1 α as a master regulator of plasma protein fucosylation. **Plos Genetics**, v. 6, n. 12, p. e1001256, 2010.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 2, p. 1-18, 2010.

LI, Y., et al. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. **Cell Death and Disease**, v. 8, p. e2892, 2017.

LI, Y., et al. Tumoral expression of drug and xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer patients of different ethnicities with implications to personalized medicine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4747, 2017.

LIANG, J., LIANG, Y., GAO, W. Clinicopathological and prognostic significance of sialyl lewis X overexpression in patients with cancer: a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 3113-3125, 2016.

LIU, L. et al. Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection. **Plos One**, v. 10, n. 1, p. e0117058, 2015.

MA, H. et al. Functional roles of glycogene and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells. **IUBMB Life**, v. 65, n. 5, p. 409–22, 2013.

MABASHI-ASAZUMA, H. et al. A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells. **Glycobiology**, v. 24, n. 3, p. 325–340, 2014.

MAS, E. et al. Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. **Glycobiology**, v. 8, n. 6, p. 605–613, 1998.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine insights: Pathology**, v. 2015, n.8, p. 23-31, 2015.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

- MARE, L. et al. CA19.9 antigen circulating in the serum of colon cancer patients: Where is it from? **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 4, p. 792–797, 2013.
- MENG, L. et al. High expression of FUT3 is linked to poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 37, p. 61036-61047, 2017.
- MILDE-LANGOSCH, K., et al. Prognostic relevance of glycosylation-associated genes in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 145, n. 2, p. 295-305, 2014.
- MIYOSHI, E.; MORIWAKI, K.; NAKAGAWA, T. Biological function of fucosylation in cancer biology. **Journal of biochemistry**, v. 143, n. 6, p. 725–729, 2008.
- MURK, W., DEWAN, A. T. Exhaustive Genome-Wide Search for SNP-SNP Interactions Across 10 Human Diseases. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 7, p. 2043-2050, 2016.
- NASCIMENTO, J. C. F. et al. Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 99, n. 3, p. 409-415, 2015.
- NHS Breast Screening Programme (NHSBSP). **Pathology Reporting of Breast Disease**. 3. ed. Wakefield: [s.n.], p. 1–134
- NICA, A. C., DERMITZAKIS, E. T. Expression quantitative trait loci: present and future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, n. 1620, p. 20120362, 2013.
- NIK-ZAINAL, S. et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. **Nature**, v. 534, n. 7605, p. 47-54, 2016.
- NORDÉN, R., SAMUELSSON, E., NYSTRÖM, K. NFκB-mediated activation of the cellular FUT3, 5 and 6 gene cluster by herpes simplex virustype 1. **Glycobiology**, v. 27, n. 11, p. 999–1005, 2017.
- OHYAMA, C. et al. Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis X oligosaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13789–94, 2002.
- OSUGA, T. et al. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 9, p. 1-8, 2016.
- PADRÓ, M. et al. Down-regulation of FUT3 and FUT5 by shRNA alters Lewis antigens expression and reduces the adhesion capacities of gastric cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 12, p. 1141–9, 2011.
- PADRÓ, M.; MEJÍAS-LUQUE, R.; COBLER, L. Regulation of glycosyltransferases and Lewis antigens expression by IL-1β and IL-6 in human gastric cancer cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 28, n. 2, p. 99–110, 2011.
- PARK, Y. et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1554–1560, 2011.

PEREIRA, B. et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breastcancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. **Nature Communications**, v.7, p. 1-15, 2016.

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

POTAPENKO, I. O. et al. Glycan-related gene expression signatures in breast cancer subtypes; relation to survival. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 4, p. 861–876, 2015.

RAHMATPANA, F. B., et al. A class of genes in the HER2 regulon that is poised for transcription in breast cancer cell lines and expressed in human breast tumors. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 1286-1301, 2015.

RAKHA, E. A et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research** , v. 12, n. 4, p. 207, 2010.

RAMAMOORTHY, S., CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids-Mechanisms of Action in Health and Disease. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 42, n. 1, p. 15-31, 2016.

RAMSURAN, V., EWY, R., NGUYEN, H., KULKARNI, S. Variation in the Untranslated Genome and Susceptibility to Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2046, 2018.

SAKUMA, K.; AOKI, M.; KANNAGI, R. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial–mesenchymal transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 1–6, 2012.

SALDOVA, R., et al. Serum N-glycome alterations in breast cancer during multimodal treatment and follow-up. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 10, p. 1361-1379, 2017.

SALOMAA, V. et al. Genetic background of Lewis negative blood group phenotype and its association with atherosclerotic disease in the NHLBI Family Heart Study. **Journal of Internal Medicine**, v. 247, p. 689-698, 2000.

SALZANO, F. M., SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 1, p. 151-170, 2014.

SANTOS, E. S. et al. Assessment of the functional impact of germline BRCA1/2 variants located in non-coding regions in families with breast and/or ovarian cancer predisposition. **Breast Cancer Research and Treatment**,p. 1-15, 2017.

SCULLY, O. J., BAY, B. H., YIP, G., YU, Y. Breast Cancer Metastasis. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 311-320, 2012.

SELLERS, T. A. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylation genes with risk of epithelial ovarian cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 2, p. 397-404, 2008.

SERPA, J. et al. Expression of Lea in gastric cancer cell lines depends on FUT3 expression regulated by promoter methylation. **Cancer letters**, v. 242, n. 2, p. 191–7, 2006.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 575–580, 2014.

SHAH, P. et al. Integrated Proteomic and Glycoproteomic Analyses of Prostate Cancer Cells Reveal Glycoprotein Alteration in Protein Abundance and Glycosylation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 10, p. 2753–2763, 2015.

SHOKEEN, Y., et al. Identification of Prognostic and Susceptibility Markers in Chronic Myeloid Leukemia Using Next Generation Sequencing. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, v. 28, n. 2, p. 135–146, 2018.

SILSIRIVANIT, A. et al. CA-S27: a novel Lewis a associated carbohydrate epitope is diagnostic and prognostic for cholangiocarcinoma. **Cancer Science**, v. 104, n. 10, p. 1278–1284, 2013.

SINN, H.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, n. 8, p. 149–154, 2013.

TANG, C., et al. Lymph node status have a prognostic impact in breast cancer patients with distant metastasis. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182953, 2017.

TERAO, N. et al. Fucosylation is a common glycosylation type in pancreatic cancer stem cell-like phenotypes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 13, p. 3876–3887, 2015.

TERESA, D. B. et al. Polymorphisms of Lewis and Secretor genes are related to breast cancer and metastasis in axillary lymph nodes. **Tumour Biology**, v. 31, n. 5, p. 401–409, 2010.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, p. 87–108, 2015.

TU, C. F. et al. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 111, 2017.

VAJARIA, B. N. et al. Expression of Glycosyltransferases; ST3GAL1, FUT3, FUT5, and FUT6 Transcripts in Oral Cancer. **Glycobiology Insights**, v. 4, p. 7–14, 2014.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

VASCONCELOS, J. L. A. et al. Comparing the Immunoexpression of FUT3 and FUT6 between Prostatic Adenocarcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 46, n. 3, p. 105–109, 2013.

VITIAZEVA, V. et al. The O-Linked Glycome and Blood Group Antigens ABO on Mucin-Type Glycoproteins in Mucinous and Serous Epithelial Ovarian Tumors. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0130197, 2015.

- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.
- VRIES, T. et al. Fucosyltransferases: structure/function studies. **Glycobiology**, v. 11, n. 10, p. 119R–128R, 2001.
- WAGNER, K. W. et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1070–1077, 2007.
- WANG, X. et al. Overexpression of $\alpha(1,6)$ fucosyltransferase associated with aggressive prostate cancer. **Glycobiology**, v. 24, n. 10, p. 935–944, 2014.
- WEINSTEIN, J.N. Cancer bioinformatics. **Holland-Frei Cancer Medicine**, 2016.
- XIE B., et al. Identification of Key Genes and miRNAs in Osteosarcoma Patients with Chemoresistance by Bioinformatics Analysis. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-10, 2018.
- XIN, Y. et al. Transfection of miRNAs targeting the FUT3 gene inhibits cell proliferation in human gastric cancer cell line KATO-III. **World Chinese Journal of Digestology**, v. 20, n. 25, p. 2341–2346, 2012.
- XU, Z., et al. Impact of preexisting tumor necrosis on the efficacy of stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases in women with breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1323-1333, 2012.
- YADAV, B. S., CHANANA, P., JHAMB, S.. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 6, p. 252-263, 2015.
- YANG, X., LIU, S., YAN, Q. Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 4, p. e735, 2013.
- YAO, Y.; DAI, W. Genomic Instability and Cancer. **Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 5, p. 1-17, 2014.
- YIN, X. et al. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 16, p. 2334–42, 2010.
- YUAN, K. et al. Alterations in human breast cancer adhesion-motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying alpha-L-fucose moieties. **International Journal of Oncology**, v. 32, p. 797–807, 2008.
- YUE, L. et al. Fucosyltransferase 8 expression in breast cancer patients: A high throughput tissue microarray analysis. **Histology and Histopathology**, v. 31, p. 547-555, 2016.
- ZHAN L., CHEN, L., CHEN, Z. Knockdown of FUT3 disrupts the proliferation, migration, tumorigenesis and TGF- β induced EMT in pancreatic cancer cells. **Oncology Letters**, v. 16, n. 1, p. 924-930, 2018

ZHANG, B. et al. Death receptor 5 is activated by fucosylation in colon cancer cells. **The FEBS Journal**, 2018.

ZHENG, Y., et al. Role of estrogen receptor in breast cancer cell gene expression. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 4046-4050, 2016.

**APÊNDICE A – ARTIGO EXTRA DESENVOLVIDO DURANTE O PERÍDO DO
DOUTORADO ENTITULADO “CHARACTERIZATION OF SIGLEC-7+ AND
SIGLEC-9+ IMMUNE INFILTRATE IN INVASIVE BREAST TUMORS”**

Characterization of Siglec-7+ and Siglec-9+ immune infiltrate in invasive breast tumors

Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento¹, Rosilda Cintra de Souza¹, Fabrício Oliveira Souto^{1,2}, Paul Crocker³, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão⁴, Cíntia Renata Costa Rocha^{1,4}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

² Nucleus of Life Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil

³ University of Dundee, Dundee, UK

⁴ Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy among women worldwide and occurs more frequently in the form of invasive carcinoma of no special type, previously known as invasive ductal carcinoma (IDC)¹. Despite the advances in IDC tumorigenesis, the factors involved in breast tumor evasion from immune surveillance is still poorly understood and therapeutically unexplored. Changes in protein glycosylation status have been reported as relevant mechanisms in the biology of various tumor types. Specifically, tumor sialylation has been linked to immune evasion in a broad of tumors, including breast cancer².

Sialic acid is a family of monosaccharides composed of 9 carbons and derived from neuraminic acid which are frequently found in the end of glycan chains³. Sialylated glycans are overexpressed in a variety of tumor cells and have been linked to immune evasion, including in breast cancer^{4,5}. These structures are recognized by the sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin family called Siglec. These molecules are members of the Ig superfamily found in plasma membrane of immune cells and are characterized by the presence of an N-terminal sialic-acid-binding V-set Ig domain and 1-16 C2-set domains. Among the 14 characterized members which compose the Siglec family in mammals, Siglec-7 and 9 have been prominently studied in cancer. These lectins are CD33-related Siglecs which share 80% of their amino acid sequence, presenting 3 C2-set extracellular domains and 1 intracellular immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif³.

Despite their similarity, Siglec-7 and Siglec-9 recognize sialic acids at different positions. Siglec-7 is mainly found in the surface of monocytes, granulocytes and NK cells and have the ability to recognize preferentially α 2,8-sialic acids⁶. The interaction between the Siglec-7 and their ligands triggers a pro-inflammatory effect on PBMCs⁷. However, the opposite effect is observed on NK cells, where the cytotoxic activity is diminished by sialyl ligands⁸ and pyroptosis is suppressed by protein ligands⁹.

As Siglec-7, Siglec-9 is expressed in monocytes, granulocytes and NK cells, but also by B and T cells³. This lectin recognizes α 1,3, α 2,3 and α 2,6-sialic acids^{6,10}. Siglec-9 activation results in neutrophils immunosuppression by reducing ROS production^{11,12}. Dendritic cells have a reduced antigen presentation and lower IL-12 production after Siglec-9 stimuli¹³. However, this pathway triggered by tumor derived ligands leads to secretion of pro-inflammatory cytokines by monocytes and induces a tumor-associated phenotype in

macrophages¹⁴. Also, the expression of Siglec-9 ligands by tumor cells was associated to higher NK cell-mediated cytotoxicity susceptibility and T cell activation^{15,16}.

In breast cancer, Siglec-7 ligands were not found to be expressed by the tumor mammary cell lines MCF-7 and MDA-MD-231. On the other hand, Siglec-9 ligands are expressed by these cells and also by patient-derived breast tumor cells^{11,15}. Even facing differences regarding the expression of their ligands, both Siglec-7 and -9 mRNAs were found in moderate levels in the tumor's pool of cells obtained from breast cancer patients from the Cancer Genome Atlas cohort¹⁷. However, the mentioned study was not able to identify which type of cell in the breast tumor microenvironment was responsible for express those lectins, since the tumor is composed not only by transformed cells, but also vascular cells, infiltrating immune cells and cancer-associated fibroblasts¹⁸. Thus, Siglec-7/9 expressions need to be characterized in breast tumor samples, aiming to completely evaluate the possible role of these two pathways in breast cancer immune evasion.

MATERIALS AND METHODS

HUMAN SAMPLES

Eighty formalin-fixed paraffin-embedded human tumor samples were obtained from female patients assisted in the Hospital das Clínicas – UFPE and Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (Recife, Brazil). These patients were diagnosed with breast invasive carcinoma of no special type and submitted to mastectomy or quadrantectomy previously any other treatment. Clinical and histopathological characteristics were obtained from patients' records. This study was approved by the Research Ethics Committee Involving Human Beings at the Health Sciences Center from Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 06586612.9.0000.5208—No. 140.876) and participants signed the written informed consent when necessary.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY ASSAY

Formalin-fixed paraffin-embedded samples were sliced in 4µm sections, placed on a glass slide and submitted to deparaffinization with xylene followed hydration with decreasing percentages of alcohol. Antigen retrieval was performed with 10 mM citrate buffer (pH 6.0) at 100°C in a humidified chamber for 30 min. Block of endogenous hydrogen peroxide followed by protein blocking were performed using Spring Bioscience buffers according to manufacturer's protocol. Antibodies against human Siglec-7 and Siglec-9 were kindly provided

by Dr. Paul Crocker (University of Dundee, Dundee, UK) and used at dilution 1:25. Tissues were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Immune complexes were detected using REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP and 3,3'-Diaminobenzidine (Spring Bioscience). Breast tumor tissues positive for each Siglec were used as positive controls in every conducted assay. Negative controls were prepared replacing the primary antibody for 1% PBS-BSA.

SIGLEC STAINING ANALYSIS

Three different areas in tumor microenvironment were assessed individually: Tumor parenchyma, tumor-host interface and perivascular area (Figure 1A-B). For each sublocation, five different fields were analyzed under 400x magnification and the percentage of positive cells in each field was determined. Then, the mean percentage of Siglec+ cells among fields was calculated. The immunohistochemical analysis was performed by two independent observers and the results were compared. Samples with Siglec staining in 0.5% or more cells were considered positive. Representative fields were micrographed by Axio Imager M2m (Zeiss).

STATISTICAL ANALYSIS

Cellular frequency was tested for normal distribution by D'Agostino and Pearson normality test. Mann Whitney test and Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test were used to compare the percentage of positive cells between two and three groups, respectively. Friedman test followed by Dunn's multiple comparisons test were used to compare the percentage of positivity among sublocations. Spearman correlation test was applied to evaluate the possible coexpression between Siglec-7 and Siglec-9. All statistical analyzes were performed in GraphPad Prism v. 6 software. *P* value minor than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

SIGLEC-7/9 STAINING PATTERN IN BREAST TUMORS

Anti-Siglec-7 staining was observed more frequently in rounded, cytoplasm-rich mononuclear cells (Figure 1C-D). Siglec-7 positivity was found in at least one area in 63.5% of all cases. Siglec-7+ cells were localized mainly in the tumor-host interface (% labeled cells: 0.994%, range 0-8.7%; 48.6% of the cases were considered positive for this area) and in the perivascular area (% labeled cells: 0.974%, range 0-18.28%; 43.2% of the cases were

considered positive for this area) followed by the tumor parenchyma (% labeled cells: 0.443%, range 0-5.2%; 17.6% of the cases were considered positive for this area) (Figure 2A). Anti-Siglec-9 staining was observed in mononuclear cells similar to that founded to be positive to Siglec-7. Siglec-9 positivity was found in at least one area in 49.2% of all cases, and its localization pattern was slightly different from Siglec-7. Siglec-9+ cells were localized mainly in the perivascular area (% labeled cells: 1.814%, range 0-16.5%; 39.7% of the cases were considered positive for this area), and in the tumor-host interface (% labeled cells: 1.542%, range 0-14.6%; 33.3% of the cases were considered positive for this area) followed by tumor parenchyma (% labeled cells: 0.418%, range 0-5%; 15.9% of the cases were considered positive for this area) (Figure 2B). Spearman correlation analysis showed that Siglec-7 and Siglec-9 expressions are directly correlated in breast tumor parenchyma ($\rho = 0.354$, $p = 0.0069$) and in tumor-host interface ($\rho = 0.437$, $p = 0.0008$), but no correlation was found in the perivascular area (Figure 2C-D).

RELATIONSHIP BETWEEN SIGLEC-7/9 EXPRESSIONS AND CLINICO-HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BREAST CANCER

Intending to better understand the Siglec-7/9 expression profiles in the breast cancer population we confront the frequency of Siglec positive cells with the patients' clinical-histopathological characteristics (Table 1). Higher frequencies of Siglec-7+ cells in the tumor-host interface and in the perivascular area were associated with presence of lymph node metastasis. For tumor parenchyma, this was also a tendency, but the difference was not statistically significant. Siglec-9 positivity was more frequent in histological grade II than grade III tumors, but this association was only statistically significant in the tumor-host interface. The same profile was found when comparing HER-2 negative *versus* positive tumors. HER-2 negative tumors had a higher frequency of Siglec-9+ cells than HER-2 positive ones, and this difference was only statistically significant in the tumor-host interface. Siglec-9+ cells in the perivascular area were more frequent in patients with 50 years or older. In summary, Siglec-7 positivity was associated with a marker of bad prognosis, lymph node involvement, while Siglec-9 positivity was linked to characteristics of good prognosis, lower histological grade, absence of HER-2 superexpression and advanced age.

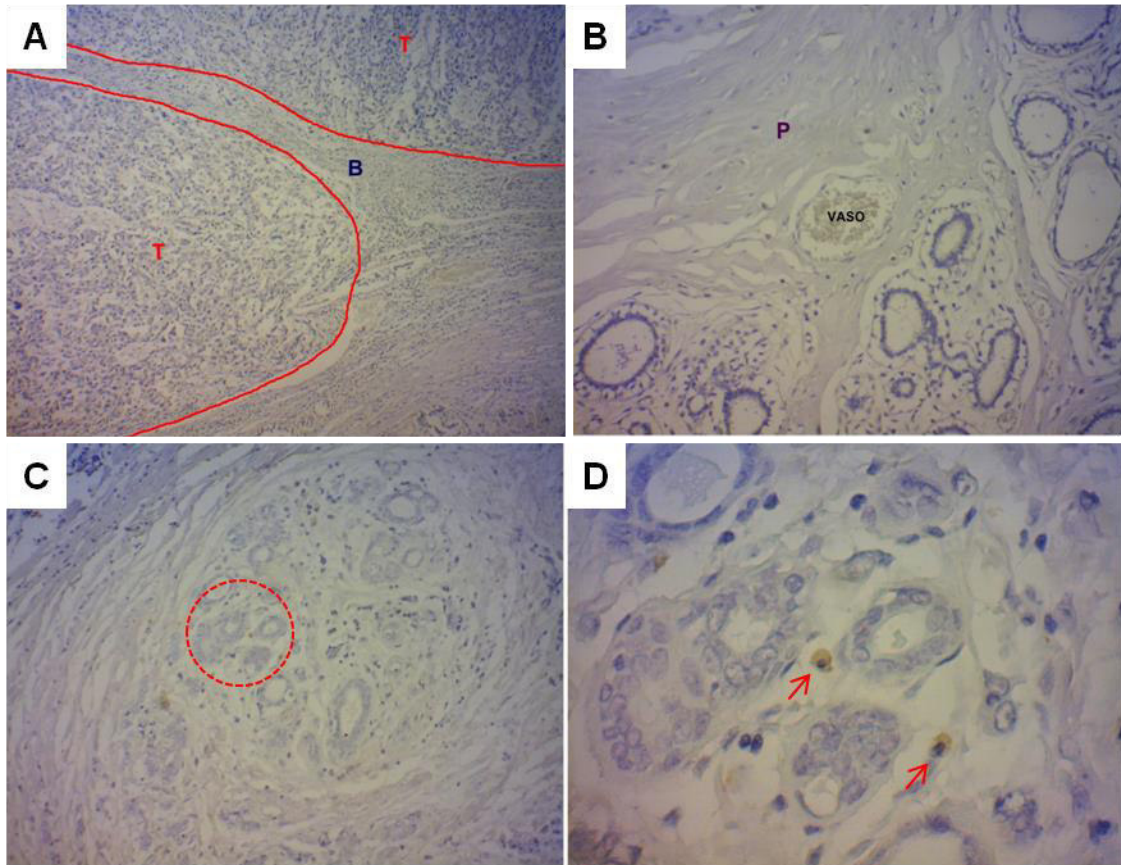


Figure 1: Immunohistochemistry analysis of Siglec-7 and Siglec-9 in invasive breast tumors. (A-B) Subareas of breast tumor microenvironment analyzed in this work. T: Tumor Parenchyma; B: Tumor-host Interface (base); P: Perivascular area. (C-D) Siglec-7 staining pattern at 100x and 400x magnification, respectively. In (C) red circle indicates the area amplified in (D). In (D) red arrows point to moderately positive cells. Siglec-7 and Siglec-9 have similar staining patterns.

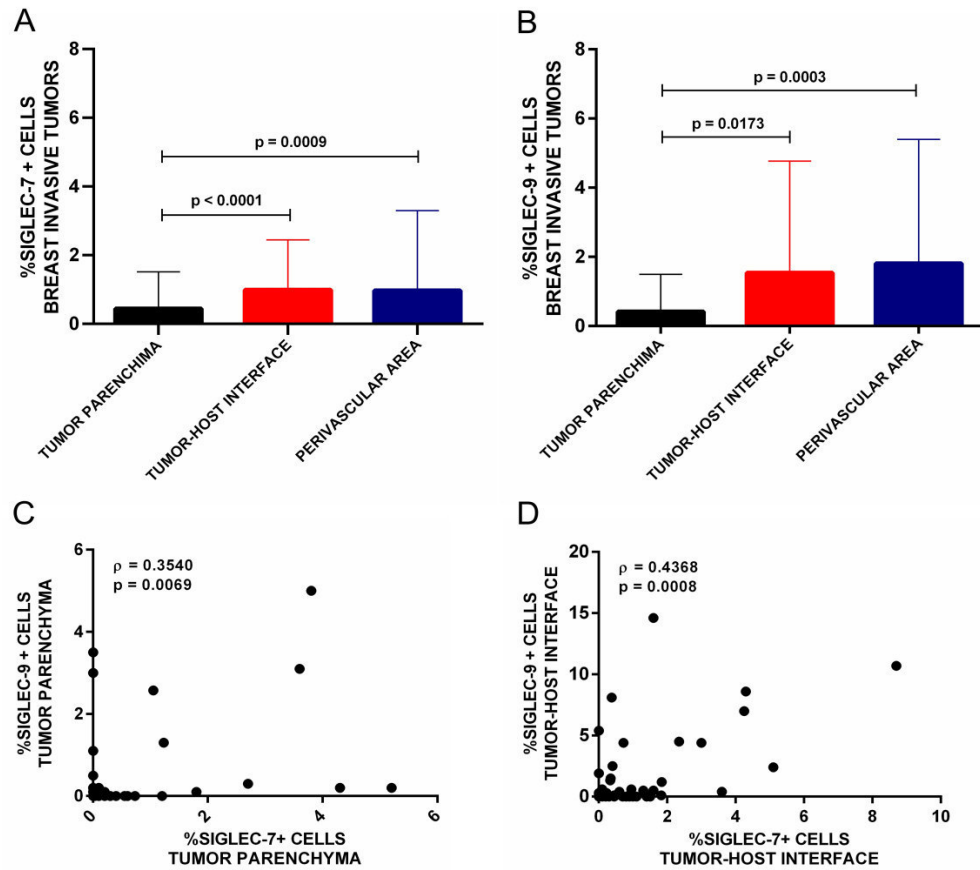


Figure 2: Siglec-7/9 positivity in different microenvironment localizations of breast tumors. (A-B) Differences in the frequency of Siglec-7+ ($n = 74$) and Siglec-9+ ($n = 63$) cells, respectively, according to their microenvironment localization. (C-D) Co-expression analysis of Siglec-7 and Siglec-9 ($n = 57$) in tumor parenchyma and tumor-host interface, respectively.

Table 1: Frequency of Siglec-7 and Siglec-9 positive cells in invasive breast cancer patients according to their clinical and histopathological characteristics.

Clinico-histopathological characteristics	Siglec-7			Siglec-9		
	Tumor parenchyma %	Tumor-host interface %	Perivascular area p value	Tumor parenchyma %	Tumor-host interface %	Perivascular area p value
Age						
≥50 years	0.489	0.987	0.285	0.511	1.595	0.137
< 50 years	0.438	1.026		0.224	1.405	0.011
Histological grade						
I	0.700	0.667	0.083	0.533	0.537	0.005
II	0.718	1.451		0.603	2.391	1.450
III	0.217	0.617		0.210	0.870	2.674
Lymph node involvement			0.018			1.123
Absent	0.230	0.434		0.215	1.062	0.134
Present	0.425	1.149		0.344	1.353	1.498
Estrogen receptor			0.550			1.888
Positive	0.642	0.906		0.259	1.122	0.530
Negative	0.280	0.861		0.366	2.222	1.522
Progesterone receptor			0.939			2.171
Positive	0.590	0.871		0.167	1.143	0.572
Negative	0.373	0.911		0.476	2.078	1.376
HER-2			0.361			2.303
Negative	0.381	1.230		0.597	2.412	0.139
Positive	0.556	0.670		0.165	0.489	2.652
Ki-67			0.641			0.779
Negative	0.540	1.007		0.426	1.675	0.850
Positive	0.725	0.847		0.511	1.477	1.755
						1.036

P values in bold point out differences considered statistically significant

s Comparison between histological grades II and III, further comparisons were not statistically significant.

DISCUSSION

Siglec-7 and 9 are immunoglobulin-like lectins capable of recognize sialylated-glycans and induce pro- or anti-inflammatory signaling in immune cells. These molecules have been investigated in infectious, auto-immune and tumor diseases due their potential to be used as therapeutic targets. However, for this purpose, it is fundamental to first evaluate if Siglec-7 and -9 pathways are being triggered in these pathologies. This study showed that Siglec-7 and Siglec-9 are respectively expressed by the immune infiltrate in 63.5% and 49.2% of invasive breast tumors. Siglec-7 ligands have not been directly evaluated in breast cancer biopsies, however some of them were identified in other tumors, such as 2-3, 2-6 disialyl Lewis A, disialosyl globopentaosylceramide and sMUC16 (CA-125)¹⁹⁻²¹. Among them, MUC16 is expressed by breast tumors²². Regarding Siglec-9 ligands, previous studies have shown their presence in breast cancer cell lines and breast cancer biopsies^{11,15}. In fact, some molecules identified as Siglec-9 ligands are expressed by breast tumors, including MUC1, MUC16 and lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein (LGALS3BP)^{14,22,23-26}. Interestingly, LGALS3BP is predominantly expressed in the breast tumor-host interface, one of the main areas occupied by Siglec-9+ cells²⁵. The presence of Siglec-7/9 and their ligands in breast tumors is an important indicator that their pathways are activated in breast cancer.

In addition to identify the presence of Siglec-7/9+ cells in breast tumors, it was possible to evaluate the disposition of these cells in the tumor microenvironment. Both Siglec-7/9+ cells were more frequent in the tumor-host interface and perivascular area than in tumor parenchyma. The constant absence of Siglec-7/9+ cells in the tumor core could indicate that these cells compose an infiltrated-excluded tumor immune microenvironment (I-E TIME). I-E TIME is characterized by the presence of lymphocytes in the tumor borders that do not reach the tumor parenchyma. This kind of immune microenvironment has reduced cell activation markers and its cytotoxic lymphocytes are usually excluded from tumor core, which is associated to an immunological ignorance²⁷. The presence of Siglec-7/9+ cells in an I-E TIME suggests their contribution to an immunosuppressive microenvironment. Siglec-7 and Siglec-9 are able to trigger anti-inflammatory signaling in NK cells and neutrofills, respectively^{8,12}. However, the opposite effect has also been reported in other cells types^{7,16}. Thus, the identification of the cells that express these markers will be essential to clarify their role in breast tumor immune infiltrate.

The identification of immune cells' location in combination with frequency analysis improves patients' survival prediction²⁸. In fact, the frequency analysis of Siglec-7/9+ cells specifically in the tumor-host interface provided a more significant association with prognosis-related characteristics in breast cancer patients. In this subarea, Siglec-7 positivity was associated to lymph node metastasis. The presence of tumor cells in secondary sites indicates that they were able to evade the immunesurveillance, progress and metastasize²⁹. Siglec-7 pathway could have a role in the first mentioned step of this process and should be investigated. For Siglec-9, positivity for this marker was associated to histological grade II tumors and HER-2 negativity. HER-2 has been recently linked to the activation of tumor infiltrating immune cells by inducing the production of CCL2 cytokine and PD-1 ligands by tumor cells³⁰. Since the presence of HER-2 was associated to lower frequency of Siglec-9+ cells, this immune cells could be absent in activated immune infiltrate, which would endorse the Siglec-9 involvement in immunosuppression.

After the proper identification of Siglec-7/9 carriers in breast tumors and the interpretation of their biological role in this disease, these lectins would potentially be used as therapeutic targets. Approaches using Siglec^{neg}-engineered NK cells or Siglec-blocking ligands have been successfully used against tumor cells, including from breast origin³¹⁻³³. In summary, this work showed for the first time the presence of Siglec-7 and Siglec-9 positive cells in breast tumor immune infiltrate. These cells were localized predominantly in the tumor-host interface and perivascular area, being rare in the tumor parenchyma. The presence of Siglec-7+ and Siglec-9+ cells were linked to clinical-histopathological characteristics from breast cancer patients. These data suggest the involvement of Siglec-7 and Siglec-9 in breast tumor immune modulation and point out to future efforts toward their use as targets for breast cancer immunotherapy.

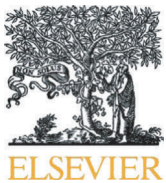
REFERÊNCIAS

1. SCHNITT, S. J., LAKHANI, S. R. Breast Cancer. In: STEWART, B.W., WILD, C.P. World Cancer Report 2014. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. P. 362-373.
2. BÜLL, C., BROK, M. H. D., ADEMA, G. J. Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1846, p. 238-246, 2014.
3. FRASCHILLA, I., PILLAI, S. Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunological Reviews*, v. 276, p. 178–191, 2017.
4. DONIN, N. et al. Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 131, p. 254–263, 2003.
5. RODRIGUES, E., MACAULEY, M. S. Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities. *Cancers*, v. 10, n. 6, p. 207, 2018.
6. YAMAJI, T. et al. A Small Region of the Natural Killer Cell Receptor, Siglec-7, Is Responsible for Its Preferred Binding to α 2,8-Disialyl and Branched α 2,6-Sialyl Residues: A comparison with Siglec-9. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 8, p. 6324-6332, 2002.
7. VARCHETTA, S. et al. Engagement of Siglec-7 Receptor Induces a Pro-Inflammatory Response Selectively in Monocytes. *PLOS One*, v. 7, n. 9, e45821, 2012.
8. HUDAK, J. E., CANHAM, S. M., BERTOZZI, C. Glycocalyx engineering reveals a siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nature Chemical Biology*, v. 10, p. 69-77, 2014.
9. FONG, J. J. et al. Siglec-7 engagement by GBS β -protein suppresses pyroptotic cell death of natural killer cells. *PNAS*, v. 115, n. 41, p. 10410-10415, 2018.
10. YU, H. et al. Siglec-8 and Siglec-9 binding specificities and endogenous airway ligand distributions and properties. *Glycobiology*, v. 27, n. 7, p. 657–668, 2017.
11. LÄUBLI, H. et al. Engagement of myelomonocytic Siglecs by tumor-associated ligands modulates the innate immune response to cancer. *PNAS*, v. 111, n. 39, p. 14211–14216, 2014.
12. PATRAS, K. A. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein engages human Siglec-9 to modulate neutrophil activation in the urinary tract. *Immunology & Cell Biology*, v. 95, n. 10, p. 960–965, 2017.

13. OHTA, M. et al. Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 402, p. 663–669, 2010.
14. BEATSON, R. et al. The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9. *Nature Immunology*, v. 17, n. 11, p. 1273-1281, 2016.
15. JANDUS, C. et al. Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 4, p. 1810-1820, 2014.
16. STANCZAK, M. A. et al. Self-associated molecular patterns mediate cancer immune evasion by engaging Siglecs on T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 11, p. 4912-4923, 2018.
17. HAAS, Q., SIMILLION, C., VON GUTEN, S. A cartography of siglecs and sialyltransferases in Gynecologic Malignancies: is there a road towards a sweet Future? *Frontiers in Oncology*, v. 8, p. 68, 2018.
18. HANAHAN, D., COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, v. 21, p. 309-322, 2012.
19. MIYAZAKI, K. et al. Loss of Disialyl Lewis a, the Ligand for Lymphocyte Inhibitory Receptor Sialic Acid Binding Immunoglobulin-Like Lectin-7 (Siglec-7) Associated with Increased Sialyl Lewis a Expression on Human Colon Cancers. *Cancer Research*, v. 64, p. 4498 – 4505, 2004.
20. KAWASAKI, Y. et al. Ganglioside DSGb5, preferred ligand for Siglec-7, inhibits NK cell cytotoxicity against renal cell carcinoma cells. *Glycobiology*, v. 20, n. 11, p. 1373–1379, 2010.
21. MITIC, N., MILUTINOVIC, B., JANKOVIC, M. et al. Assessment of sialic acid diversity in cancer and non-cancer related CA125 antigen using sialic acid-binding Ig-like lectins (Siglecs). *Disease Markers*, v. 32, p. 187–194, 2012.
22. LAKSHMANAN, I. et al. MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, v. 31, n. 7, p. 805–817, 2012.
23. BELISLE, J. A. et al. Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Molecular Cancer*, v. 9, p. 118, 2010.

24. LÄUBLI, H. et al. Lectin Galactoside-binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-associated Immunomodulatory Ligand for CD33-related Siglecs*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 48, p. 33481–33491, 2014.
25. WHITE, M. J. V., ROIFE, D., GOMER, R. H. Galectin-3 Binding Protein Secreted by Breast Cancer Cells Inhibits Monocyte-Derived Fibrocyte Differentiation. *The Journal of Immunology*, v. 195, p. 1858-1867, 2015.
26. WU, G. et al. A Mucin1 C-terminal Subunit-directed Monoclonal Antibody Targets Overexpressed Mucin1 in Breast Cancer. *Theranostics*, v. 8, n. 1, p. 78-91, 2018.
27. BINNEWIES, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, v. 24, n. 5, p. 541–550, 2018.
28. KATHER, J. N. et al. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *ELife*, v. 7, p. e36967, 2018.
29. VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. S185–S198, 2015.
30. TRIULZI, T. et al. HER2 signaling regulates the tumor immune microenvironment and trastuzumab efficacy, *OncoImmunology*, v. 8, n. 1, p. e1512942, 2019.
31. TOMIOKA, Y. et al. A soluble form of Siglec-9 provides an antitumor benefit against mammary tumor cells expressing MUC1 in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 450, n. 1, p. 532-537, 2014.
32. PRESCHER, H. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Small, High-Affinity Siglec-7 Ligands: Toward Novel Inhibitors of Cancer Immune Evasion. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, n. 3, p. 941-956, 2017.
33. HUANG, C. H. et al. A Developed NK-92MI Cell Line with Siglec-7^{neg} Phenotype Exhibits High and Sustainable Cytotoxicity against Leukemia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, n. 19, v. 4, p. E1073, 2018.

**APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS PELA AUTORA DURANTE O PERÍODO
DO DOUTORADO (2015-2019)**



Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression



Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento^{a,b,*}, Steffany de Almeida Ferreira^b,
Juliana Lúcia de Albuquerque Vasconcelos^b, João Luiz Quirino da Silva-Filho^b, Bruno Trajano Barbosa^b,
Matheus Filgueira Bezerra^b, Cíntia Renata Costa Rocha^{a,b}, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão^{a,b}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2015

Received in revised form 7 August 2015

Accepted 24 August 2015

Available online 29 August 2015

Keywords:

FucT-III

Human mammary carcinoma

Protein expression

Single nucleotide polymorphism

Regulatory region

ABSTRACT

Fucosylated glycans synthesized by α 1,3/4-fucosyltransferase (FUT3) enzyme play an important role in breast cancer prognosis and metastasis, being involved in the binding of circulating tumor cells to the endothelium and being related to tumor stage, metastatic potential and chemoresistance. Despite the pro-tumor action of this enzyme, studies have demonstrated its role in natural killer-induced cytotoxicity through the recognition of sialyl Lewis X by C-type lectin receptors and through extrinsic apoptosis pathway triggered by Apo2L-TRAIL. This study aimed to investigate the expression pattern of FUT3 in invasive breast carcinoma (IDC) from patients of Pernambuco state, Northeast of Brazil, and genotype FUT3 promoter region to identify possible SNPs that could be associated with variations in FUT3 expression. Immunohistochemistry assay was used to access the FUT3 expression in normal ($n = 11$) and tumor tissues ($n = 85$). DNA sequencing was performed to genotype the FUT3 promoter region in patients with IDC ($n = 109$) and healthy controls ($n = 110$). Our results demonstrated that the absence of FUT3 enzyme is related to breast's IDC. The non-expression of FUT3 was more frequent in larger lesions and also in HER2 negative IDC tumors. Genomic analysis showed that two variations localized in FUT3 promoter region are possibly associated with IDC. Our results suggest that minor allele T of SNP rs73920070 (–6933 C > T) confers protection whereas minor allele T of SNP rs2306969 (–6951 C > T) triggers susceptibility to IDC in the population of Pernambuco state, Northeast of Brazil.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Breast cancer is the most incident tumor among women worldwide, having affected 1.67 million women in 2012 (Ferlay et al., 2014). Although early diagnosis associated with new therapies had been giving the chance of cure for many breast cancer patients, oncology field is still far away to comprehend all factors that trigger and rule the disease development.

Fucosylated glycans play an important role in breast cancer prognosis and metastasis, being involved in the binding of circulating tumor cells to the endothelium (Yuan et al., 2008; Zen et al., 2008) and also related to tumor stage, metastatic potential (Jeschke et al., 2005) and chemoresistance (Ma et al., 2013).

Fucosyltransferases are a family of enzymes that catalyzes the L-fucose transfer from GDP-L-fucose to a nascent glycan (Miyoshi et al., 2008). There are 13 genes encoding fucosyltransferases in human genome which are called FUT1 to FUT11, POFUT1 and O-FUT2 (Becker and Lowe, 2003). FUT3 gene encodes a fucosyltransferase with α 1,3 and α 1,4 L-fucose bonding activity. This gene is localized in the short

arm of chromosome 19 and is formed by three exons, A, B and C (Kukowska-Latallo et al., 1990). The expression of FUT3 is dependent on its hypomethylation (Serpa et al., 2006) and is regulated by transcription factors, such as HNF1 α (Lau et al., 2010), p53 (Katkoori et al., 2012) and c-Myc (Sakuma et al., 2012), and interleukins IL-8, TNF- α (Groux-Degroote et al., 2008), IL-1 β and IL-10 (Padró et al., 2011b).

The mainly products of FUT3 enzyme are the Lewis antigens. Sialyl Lewis X (sLe^x) and its isomer sialyl Lewis A (sLe^a) are glycans, recognized by the E-selectins, involved in adhesion of tumor cells to the endothelium and consequent escape of these cells from blood stream, a crucial step in hematogenous metastasis (Burdick et al., 2012). Although the mechanism mediated by Lewis antigens and E-selectin represents an important aspect in tumor biology, FUT3 is also related to other pathways in neoplastic cells. In colorectal cancer, the fucosylation by FUT3 of T β R I and T β R II receptors is essential for epithelial–mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β (Hirakawa et al., 2014). However, tumor death pathways are also dependent on fucosylation. Overexpression of sLe^x in melanoma and erythroleukemia cell lines by FUT3 gene transfection leads to cytotoxicity mediated by natural killer cells through ligation to C type lectin receptors, such as CD94 (Higai et al., 2006;

* Corresponding author at: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, CDU, Recife, PE 50670-901, Brazil.

Association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and clinical outcomes in acute myeloid leukemia

by Matheus F. Bezerra, Juan L. Coelho-Silva, Jessica C. Nascimento, Mariana T. Benicio, Cintia R. Rocha, Cintia G. Machado, Eduardo M. Rego, Marcos A. Bezerra, Antonio R. Lucena-Araujo, and Eduardo I. Beltrão

Haematologica 2016 [Epub ahead of print]

*Citation: Bezerra MF, Coelho-Silva JL, Nascimento JC, Benicio MT, Rocha CR, Machado CG, Rego EM, Bezerra MA, Lucena-Araujo AR, and Beltrão EI. Association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and clinical outcomes in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2016; 101:xxx
doi:10.3324/haematol.2016.155069*

Publisher's Disclaimer.

E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

Full Length Research Paper Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita

Activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug-resistant bacteria

Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita¹, Cintia Renata Rocha Costa², Jessica Frutuoso², Irapuan Oliveira Pinheiro³, Amanda Mota³, Adelisa Anne Franchitti⁴ and Eulália Azevedo Ximenes^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco- Brasil.

²Departamento de Bioquímica Universidade Federal de Pernambuco - Recife, Pernambuco- Brasil.

³Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco - Recife, Pernambuco- Brasil.

⁴Department of Comparative Biomedical Sciences – Louisiana State University – Baton Rouge, Louisiana- USA.

Received 7 January, 2017; Accepted 14 February, 2017

The emergence of nearly untreatable infections caused by multidrug-resistant bacteria has led to a new public health concern in which a need for development of alternative non-antibiotic strategies has become urgent. The activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* against multidrug-resistant bacteria was investigated. The objective of this work was to isolate and identify lactobacilli from artisanal kefir by 16S rRNA gene sequencing as well as to evaluate the effect of the growth of *Lactobacillus* species in the Man Rogosa and Sharpe broth, supplemented with Tween 80 at concentrations of 0.6, 0.4, and 0.2 %. Cell Free Supernatants (CFSs) were obtained from these lactobacilli cultures and with them, organic acids (lactic acid and acetic acid) and ethanol were quantified by HPLC followed by the determination of their antimicrobial activities against eight strains of *Staphylococcus aureus*-MRSA and *Klebsiella pneumonia* KPC strains. The GenBank BLAST analysis revealed that, the isolated lactobacilli belonged to *Lactobacillus paracasei* (n=4) and *Lactobacillus plantarum* (n=5) strains. Increasing concentrations of Tween 80 did not affect the growth of *Lactobacillus* species—significantly when compared to their controls (MRS broth). HPLC analysis of CFSs showed concentrations greater than 18.0, 4.0 and 1.0 g/L for lactic acid, acetic acid and ethanol, respectively. All CFSs were able to inhibit all pathogenic microorganisms evaluated. The percentage of inhibition was on average greater than 88% for MRSA and KPC strains. The antimicrobial activity was dependent on the CFSs tested. Based on these experimental conditions, organic acids and ethanol are likely to be responsible for this antimicrobial activity.

Key words: Antibacterial activity, lactobacilli, cell free supernatants, Tween 80.

INTRODUCTION

The nosocomial infections caused by multidrug-resistant microorganisms (MDR) are among the most serious problems of clinical medicine and pose a major public

health concern (Cecchini et al., 2015). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* are

Research paper

Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein

Vanir Reis Pinto-Junior^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Mayara Queiroz Santiago^a, Claudia Figueiredo Lossio^a, Celso Shiniti Nagano^a, Cintia Renata Costa Rocha^b, Jessica Catarine Frutuoso Nascimento^b, Francisco Lucas Faustino Nascimento^c, Ivanice Bezerra Silva^a, Antonia Simoni Oliveira^a, Jorge Luis Almeida Correia^a, Rodrigo Bairy Leal^d, Ana Maria Sampaio Assreuy^c, Benildo Sousa Cavada^{a,*}, Kyria Santiago Nascimento^{a,**}

^a Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

^c Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2017

Accepted 9 February 2017

Available online 11 February 2017

Keywords:

DlyL

Structure

Molecular dynamics

Inflammatory

Hypernociceptive

ABSTRACT

Lectins are proteins, or glycoproteins, capable of reversibly binding to specific mono- or oligosaccharides via a noncatalytic domain. The Diocleinae subtribe presents lectins with high structural similarity, but different effects based on biological activity assays. This variability results from small structural differences. Therefore, in this context, the present study aimed to perform a structural analysis of the lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth seeds (DlyL) and evaluate its inflammatory effect. To accomplish this, DlyL was purified in a single step by affinity chromatography on Sephadex® G-50 matrix. DlyL primary structure was determined through a combination of tandem mass spectrometry and DNA sequencing. DlyL showed high similarity with other species from the same genus. Its theoretical three-dimensional structure was predicted by homology modelling, and the protein was subjected to ligand screening with monosaccharides, oligosaccharides and complex N-glycans by molecular docking. Stability and binding of the lectin with α -methyl-D-mannoside were assessed by molecular dynamics. DlyL showed acute inflammatory response with hypernociceptive effect in the paw edema model, possibly by interaction with glycans present at the cell surface.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Protein function is directly correlated with its structural and internal dynamics and fine-tuned by interactions with other molecules. Bioinformatics studies on protein-carbohydrate interactions have amply characterized lectins, and several works have demonstrated that the structures of these molecules interact with different carbohydrates [1–3]. In this context, molecular docking offers a starting model of the molecular interactions between

lectins and glycosyl ligands, supporting various hypothesis related to molecular recognition in the context of different biological activities [4,5].

Lectins are proteins, or glycoproteins, that reversibly interact with carbohydrates in a specific manner, but without changing their structure [6]. Legume lectins have a simple purification protocol [7], and their activities, such as insecticidal [8], antifungal [9], antibacterial [10], antiviral [11] and antitumor [12] have been extensively studied. Lectins from the Diocleinae subtribe show high structural similarity, but have different biological effects [13,14], such as aortic relaxation [15], anti- [16] and pro-inflammatory [17–19] activities. However, small structural differences influence the conformation of the carbohydrate recognition site of these

* Corresponding author.

** Corresponding author.

**ANEXO A – PARECER COSUBISTÂNCIADO DO COMITÉ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS.

Pesquisador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 06586612.9.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 930.671

Data da Relatoria: 15/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de nova emenda ao projeto de pesquisa em epígrafe na qual o pesquisador responsável solicitar a prorrogação do prazo de execução da referida pesquisa com o intuito de alcançar de forma satisfatória os objetivos propostos. Os motivos que justificam tal alteração, segundo o pesquisador, foram baseados nas necessidades de aprofundar o conhecimento oriundo dos objetivos estabelecidos originalmente bem como as novas perguntas oriundas dos resultados parciais apresentados no relatório parcial (anexo à Plataforma Brasil). Solicita ainda:

- 1) ampliar o tamanho da amostra inicialmente proposto com a finalidade de que as análises de correlação com os dados clínico-histopatológicos dos pacientes tenham força estatística, baseando-se nas atuais exigências das revistas científicas de interesse na área (arquivo Doc. Projeto_reformulado_emenda_11.12.14, Item 3.1, p. 08);
- 2) ampliar o repertório de anticorpos, lectinas e sondas fluorescentes que possam melhor caracterizar o perfil de carboidratos expressos na superfície celular e nas estruturas intracelulares em tecidos normais e transformados de mama e próstata (arquivo Doc. Projeto_reformulado_emenda_11.12.14, Item 3.3; 3.4; 3.6, p. 08-09);
- 3) empregar metodologias complementares de análise molecular e ampliar a caracterização dos dados com análises in vitro para corroborar a associação existente entre as alterações no perfil de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Continuação do Parecer: 930.671

glicosilação e a expressão das glicosiltransferases envolvidas no processo de progressão tumoral, assim como, investigar a amplificação diferenciada dos genes referentes a estas enzimas (Doc. Projeto_reformulado_emenda_11.12.14, Item 3.6; 3.8; 3.10- 3.14, p. 09-13).

Diante de tais modificações, o orçamento financeiro e o cronograma de execução sofreram as alterações necessárias e foram anexadas à Plataforma Brasil para atender a presente solicitação.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo geral identificar novos biomarcadores de uso potencial no diagnóstico e prognóstico de alterações mamárias e prostáticas humanas utilizando sondas tradicionais e inovadoras e, por objetivos específicos: 1) Obter amostras clínicas (tecido e sangue) de pacientes submetidos a cirurgias e a biópsias realizadas nos setores de Urologia e Mastologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco - UFPE; 2) Obter blocos de tecidos mamários e prostáticos embebidos em parafina pertencentes ao setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Pernambuco - UFPE; 3) Aplicar questionário aos mesmos pacientes, doadores das amostras clínicas, a fim de obter informações adicionais sobre qualidade de vida e dados socioeconômico; 4) Avaliar a expressão de glicoconjugados nas amostras obtidas e o valor diagnóstico, prognóstico e preditivo de recidiva dos resultados obtidos; 5) Empregar lectinas como sondas histoquímicas diferenciadoras dos padrões de expressão de carboidratos em glicoconjugados de superfície celular nos diferentes tumores mamários e prostáticos; 6) Comparar a expressão de marcadores moleculares de rotina no diagnóstico (receptor de estrógeno, receptor de progesterona, p53, HER2 e Ki67e o perfil de carboidratos expressos na superfície celular e estruturas intracelulares mediante o emprego de anticorpos (antigalectinas 1 e 3) e lectinas (Con A, DBA, HPA, L-PHA, MMA, PNA, SNA, UEA-I, VVA e WGA) em tecidos transformados e normais de mama e próstata; 7) Investigar a expressão das enzimas glicosiltransferases e glicosidades (ST3GAL1, ST6GAL1, Fucosidase) nos tecidos mamários e prostáticos, assim como a amplificação diferenciada dos genes referentes a estas enzimas envolvidos na progressão tumoral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo avaliado anteriormente pelo CEP e considerado aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa já avaliado, reinserido na Plataforma Brasil em 23.03.2013, com a finalização após Upload de Documentos, como emenda. Neste projeto se analisará amostras sanguíneas de pacientes e biópsias de voluntários, sendo portadores de câncer de mama e de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Continuação do Parecer: 930.671

câncer de próstata, obtidos no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e no Hospital das Clínicas de Pernambuco (UFPE), as quais serão processadas por técnicas de biologia molecular e imunohistoquímicas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, visando a identificação de novos biomarcadores de uso potencial no diagnóstico e prognóstico de alterações mamárias e prostáticas humanas utilizando sondas tradicionais e inovadoras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conteúdo avaliado anteriormente pelo CEP e considerado aprovado.

Recomendações:

Informar, através de notificação, o tamanho da amostra ampliada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conteúdo analisado anteriormente pelo CEP e considerado aprovado. Cabe ressaltar que o projeto com as modificações solicitadas foram anexadas à Plataforma Brasil.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 09 de Janeiro de 2015

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MAIORES DE 18 ANOS)

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS, que está sob a responsabilidade e orientação do pesquisador **Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, pesquisador do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, localizado na Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Cidade Universitária, Recife-PE CEP: 50.670-901/Tel. 2126-8484 E-mail: ebeltrao@hotmail.com. Também participam dessa pesquisa os pesquisadores: **Juliana Vasconcelos** (e-mail: juli6296@yahoo.com.br/ Fone: (81) 87689282), **Steffany Ferreira** (steffany.ferreira@gmail.com/ Fone: (81)86663668), **Luiza Lima** (luizarayanna@gmail.com/ Fone: (81) 98313976), **Bruno Trajano** (brunotrajano Barbosa@hotmail.com/Fone:(81) 99813928), **Juliana Brandão** (juliana.mbrandao@ig.com.br/Fone: 91835554).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- ♦ Esta pesquisa consiste no estudo de biomarcadores moleculares associados ao câncer, visando à melhoria futura da qualidade de vida dos pacientes com câncer, através de novas propostas para diagnóstico e/ou prognóstico desta doença. A coleta do material para pesquisa se dará em duas coletas de sangue venoso (10mL), constando de uma coleta pré-cirúrgica e uma pós-cirúrgica. Também será realizada a coleta de fragmento do tumor, que ocorrerá durante o procedimento cirúrgico realizado por **recomendação médica e que faça parte do seu tratamento**. Será incluso um grupo controle de indivíduos saudáveis que irão se submeter a cirurgias plásticas e/ou reparadora, **por recomendação médica**. A coleta sanguínea e a captação da amostra cirúrgica serão realizadas respeitando todos os critérios de biossegurança vigentes e com profissionais habilitados Para todos estes, será aplicando um questionário socioeconômico em ambiente privado, evitando assim qualquer tipo de constrangimento.
- ♦ Os riscos á saúde proporcionados aos participantes desta pesquisa são: **no momento da coleta sanguínea** você poderá sentir um leve mal-estar, principalmente em estado de jejum e por alteração emocional, também possível incômodo no momento da penetração da agulha utilizada para este procedimento, além disso, poderão aparecer manchas arroxeadas em seu braço após algumas horas da coleta sanguínea. Como risco a saúde psíquica, você poderá sentir constrangimento no momento da aplicação do questionário socioeconômico.
- ♦ Você como participante da pesquisa, terá como benefícios indiretos, beneficiar as suas novas gerações contribuindo para a busca de novos alvos para diagnóstico e tratamento do câncer, doença que hoje tem uma grande relação com a genética familiar. Deixamos claro que essa pesquisa não irá proporcionar benefício direito através da mudança nos procedimentos médicos adotados atualmente e não serão aplicados novos tipos de tratamento e testes diagnóstico nos pacientes e indivíduos envolvidos.
- ♦ O tempo de sua participação na pesquisa será durante o seu tratamento. **Não** haverá necessidade de visitas domiciliares e reuniões futuras. Todos os dados fornecidos através do questionário serão mantidos em absoluto sigilo. Deixamos claro que você tem a liberdade de cancelar sua participação em qualquer estágio da pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo e/ou cobranças.

♦ Todos os dados coletados e os materiais biológicos (sangue e fragmentos cirúrgicos) serão armazenados no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estando eles sob-responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, no tempo mínimo de 5 anos.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600 Tel.: (81) 2126.8588 – email:cepccs@ufpe.br).**

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Recife, ____ de _____ de _____

Nome e Assinatura do participante ou responsável



Impressão Digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

testemunha 1

testemunha 2

ANEXO C – LAUDO DE AUTENTICAÇÃO CELULAR

Rede PREMIUM FMUSP

Av. Dr. Arnaldo, 455
Cerqueira César
CEP: 01246-903
São Paulo - SP
Fone: (55.11) 3061-7412
Fax: (55.11) 3061-8279

Consultar laudos

Imprimir laudo da linhagem: T47D



DTAPEP
Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS
Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Michel Satya Naslavsky
Instituição / Institution	Instituto de Biociências
Departamento / Department	Genética e Biologia Evolutiva
Telefone / Phone	1130917563
E-mail	mnaslavsky@gmail.com

Nome da Linhagem / Cell line name	T47D
--	------

Amostra recebida em / Samples received in	00-00-0000
--	------------

Data do laudo / Report date:	19-12-2018
-------------------------------------	------------

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile			
	Perfil da Amostra / Query Profile T47D				Perfil da referência / Database Profile ATCC: HTB-133			
TH01	6				6			
TPOX	11				11			
vWA	14				14			
CSF1PO	11	12	13		11	13		
D16S539	10				10			
D7S820	11				11			
D13S317	12				12			
D5S818	12				12			
D21S11								
Amelogenin	x				x			
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:								10
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:								10
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:								100

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- ☐ A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / *The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database*
- ☒ A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / *The submitted profile is an exact match for the following human cell lines*:
T-47D Breast Cancer Human (ATCC: HTB-133)
- ☐ O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) / *The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s)*:

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br

Rede PREMIUM FMUSP

Av. Dr. Arnaldo, 455
 Cerqueira César
 CEP: 01246-903
 São Paulo - SP
 Fone: (55.11) 3061-7412
 Fax: (55.11) 3061-8279

Consultar laudos

Imprimir laudo da linhagem: MDA-MB-231



DTAPEP
 Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa



AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS
 Laudo do Perfil de STR's / STR Profile Report

INFORMAÇÃO DO CLIENTE / CUSTOMER INFORMATION

Nome / Name	Michel Satya Naslavsky
Instituição / Institution	Instituto de Biociências
Departamento / Department	Genética e Biologia Evolutiva
Telefone / Phone	1130917563
E-mail	mnaslavsky@gmail.com

Nome da Linhagem / Cell line name	MDA-MB-231
--	------------

Amostra recebida em / Samples received in	00-00-0000
--	------------

Data do laudo / Report date:	19-12-2018
-------------------------------------	------------

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Perfil da referência no Banco de Dados / Reference Database Profile				
	Perfil da Amostra / Query Profile MDA-MB-231				Perfil da referência / Database Profile ATCC: HTB-26				
TH01	7	9.3			7	9.3			
TPOX	8	9			8	9			
vWA	15				15	18			
CSF1PO	12	13			12	13			
D16S539	12				12				
D7S820	8				8	9			
D13S317	13				13				
D5S818	12				12				
D21S11									
Amelogenin	x				x				
Número de alelos iguais entre a amostra e referência / Number of shared alleles between query sample and database profile:									12
Total de alelos na amostra referência / Total number of alleles in the database profile:									14
Porcentagem de correspondência entre alelos da amostra e da referência / Percent match between the submitted sample and the database profile:									86

RESULTADO / RESULT

Linhagens celulares com uma porcentagem de correspondência $\geq 80\%$ são consideradas relacionadas, ou seja, derivada de um ancestral comum. Linhagens com porcentagem de correspondência entre 55% e 80% necessitam de novos testes (maior número de marcadores) para confirmar sua autenticidade. / Cell lines with $\geq 80\%$ match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry. Cell lines with between a 55% to 80% match require further profiling for authentication of relatedness. (ATCC - STR Profile Report)

INTERPRETAÇÃO DOS DADOS / INTERPRETATION OF DATA

Os resultados foram interpretados segundo as diretrizes do ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization) / Results were interpreted as described in ANSI Standards 2011 (ASN-0002 / ATCC Standards Development Organization / ATCC STR Profile Report)

- ☐ **A linhagem enviada para análise é de origem humana, mas o seu perfil não corresponde a nenhuma linhagem padrão presente nos bancos de dados analisados / The submitted sample profile is of human origin, but not a match for any profile in the STR database**
- ☐ **A linhagem enviada para análise corresponde exatamente à seguinte linhagem celular humana / The submitted profile is an exact match for the following human cell line(s):**
- ☒ **O perfil de marcadores da linhagem enviada é similar à(s) seguinte(s) linhagem(s) celular(es) humana(s) / The submitted profile is similar to the following ATCC human cell line(s):**
- MDA-MB-231 Breast Adenocarcinoma Human (ATCC:HTB-26)**

Responsável Técnico: Christian Albert Merkel

Email: c.merkel@fm.usp.br

DTAPEP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - São Paulo - CEP 01246-903
Fone 11 55 3061-7412
www.bioterio.fm.usp.br