



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ANDERSON DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FUCOSILTRANSFERASES E PREDIÇÃO
DE MICRO RNAs RELACIONADOS À FUCOSILAÇÃO E HIPÓXIA NO CÂNCER
DE MAMA**

Recife

2020

ANDERSON DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FUCOSILTRANSFERASES E PREDIÇÃO
DE MICRO RNAs RELACIONADOS À FUCOSILAÇÃO E HIPÓXIA NO CÂNCER
DE MAMA**

Trabalho de Dissertação, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica

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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Cintia Renata Costa Rocha

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Vasconcelos, Anderson de Oliveira

Análise da expressão gênica de fucosiltransferases e predição de micro RNAs relacionados à fucosilação e hipóxia no câncer de mama / Anderson de Oliveira Vasconcelos - 2020.

68 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Coorientadora: Cintia Renata Costa Rocha

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Câncer de mama 2. Fucosiltransferases 3. Glicobiologia

I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (Orientador)

II. Rocha, Cintia Renata Costa (Coorientadora) III. Título

616.99449 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-185

ANDERSON DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FUCOSILTRANSFERASES E PREDIÇÃO
DE MICRO RNAs RELACIONADOS À FUCOSILAÇÃO E HIPÓXIA NO CÂNCER
DE MAMA**

Trabalho de Dissertação, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovado em: 12/02/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Deptº de Bioquímica/ LIKA – UFPE

Prof.^a Dra. Cintia Renata Costa Rocha

Deptº de Bioquímica/ LIKA – UFPE

Dr.^a Jéssica Catarine Frutuoso do Nascimento

Gr. de Pesq. Biomarcadores no Câncer - UFPE

Dr.^a Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque

Gr. de Pesq. Biomarcadores no Câncer-UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais, Arlindo e Neide, que foram sempre presentes em minha vida e me apoiaram em todas as minhas decisões até aqui, à Ir. Jaci e Ir. Nazaré que me incentivaram e me deram condições de chegar ao ensino superior, e à Amanda Liberal que esteve sempre do meu lado e me cedeu mão de obra e motivação para concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Arlindo e Neide, que sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar os caminhos que fazem da minha vida um pouco melhor a cada dia. Sou grato pelo zelo, e por toda a dedicação em mim investida. Sou grato por nunca negarem que eu perseguisse meus sonhos, pelo contrário, sou grato por sempre me apoiarem, mesmo quando meus objetivos parecem difíceis de ser alcançados, e especialmente nestes casos, lhes sou grato por todo o amor e paciência. Sem estas figuras eu acredito que jamais teria chegado onde estou, e o mais importante, seguindo meu caminho respeitando a todos e aprendendo com meus erros, construindo uma vida em que eu possa, no fim, certamente, orgulhar-me de mim e dos pais que tenho a sorte de ter.

Sou grato àqueles que me orientaram neste trabalho e na vida acadêmica, os professores Cintia e Eduardo. Cintia, que vêm me acompanhando desde 2016, me dando valiosas instruções e me moldando para ser um bom cientista. Eduardo, que aceitou fazer parte deste trabalho e contribuiu imensamente com meus aprendizados, seja nos conhecimentos específicos que desenvolvo como expertise, seja na minha formação para a ciência. Ambos são sujeitos de minha admiração e são a imagem do profissional no qual me espelho. Por tudo isso, lhes sou grato.

Agradeço à Amanda Liberal, mais do que justo, afinal, ela esteve comigo no laboratório, ajudou-me a preparar experimentos, ajudou-me a organizar centenas de dados, literalmente, e esteve comigo mais tempo do que eu mesmo, diga-se de passagem. Ela leu meus textos, opinou sobre eles, sempre de forma gentil, e foi por muitas vezes minha âncora, fixando-me em mim mesmo, para que eu não esquecesse quem sou e quem quero ser, especialmente nos momentos mais difíceis e perturbadores que precisei passar. Por todo o carinho, amor e dedicação, lhe sou imensamente grato.

Agradeço à Congregação de Santa Dorotéia, em especial às pessoas de Ir. Jaci e Ir. Nazaré, que me deram a oportunidade de acesso à uma educação de qualidade, e foram sempre gentis e atenciosas comigo, sendo, sem dúvida, meus anjos na terra.

Sou grato a todos os que contribuíram para minha formação cidadã, moral e intelectual, com destaque para os professores do Colégio de São José, que tão bem me educaram, levarei o que com eles aprendi para toda a vida.

Sou grato também à professora Dorinha, da FAFIRE, mais uma grande amiga que a vida me deu, seu entusiasmo contagiante me ajudou a adiantar meu mestrado e ainda a me dedicar a compreender o que é a educação inclusiva, na teoria e na prática.

Por fim, não posso deixar de agradecer aos amigos queridos, os antigos e os novos, os já citados e os não diretamente citados aqui. Pois a amizade é um fator fundamental para construção humana e social. Portanto, devo muito de minhas alegrias, motivações e aprendizagens, que fazem de mim a pessoa que sou, a essas incontáveis pessoas que passaram por minha vida, e deixaram em mim um pouco de si.

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RESUMO

O processo de fucosilação, regulado pelas α -L-fucosiltransferases e α -L-fucosidases, demonstra variações em seu perfil no câncer de mama. Essas variações estão frequentemente associadas ao desenvolvimento tumoral. Os miRNAs desempenham um mecanismo biológico importante na regulação da expressão gênica no câncer. Nosso objetivo foi avaliar a expressão dos genes FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 e HIF1A no câncer de mama e prever os principais miRNAs reguladores das suas expressões, bem como prever as principais vias de sinalização associadas a estes miRNAs. A expressão gênica foi avaliada por dados públicos de microarray, obtidos do *Whithead Institute*. Foi utilizado o programa miRWalker 2.0, para predição de miRNAs com potencial de regulação dos genes alvos na posição 3'UTR do RNAm. Em seguida, feita seleção de miRNAs e anotação funcional dos genes alvos. Constatamos que FUT8 é mais expresso que as demais FUTs em tumores receptor de estrogênio e de progesterona positivo e negativo (RE/RP), no câncer de mama triplo negativo (CMTN) e no carcinoma ductal de mama (CD). A expressão de FUT1 é maior em CMTN do que em amostras RE/RP (+). FUT3 é mais expressa em CMTN e amostras RE/RP (-) do que RE/RP (+). A expressão do gene FUCA1 supera FUT1, FUT3 e FUT8 no CD, porém não é diferente de FUT8 no CMTN e nos tumores de mama RE/RP (+) e (-). A expressão de FUCA1 está aumentada em relação à FUT1 e FUT3 em todas as situações analisadas. A expressão do gene HIF1A está aumentado no CMTN, CD, nos tumores de mama RE/RP (+) e (-) quando comparado aos demais genes alvo. Nossos resultados revelam que os miRNAs has-miR-181b-5p e has-miR-181d-5p são potenciais reguladores da expressão de FUT1 e FUCA1; os miRNAs hsa-miR-449a e hsa-miR-34a-5p são potenciais reguladores da expressão de FUT1 e FUT8, respectivamente; e o hsa-miR-519b-5p é potencial regulador da expressão de FUT3, já o hsa-miR-519b-3p é candidato para regulação da expressão de HIF1A. A maioria dos genes alvos preditos para os miRNAs selecionados são potenciais reguladores, das vias de sinalização MAPK, HER2, TGF β , Wnt, p53 e Notch. Com base em nossos resultados, concluímos que os miRNAs selecionados são candidatos à regulação negativa da expressão de proteínas das vias de fucosilação e hipóxia no câncer de mama, bem como de importantes vias de sinalização associadas à carcinogênese e progressão tumoral.

Palavras-chave: Câncer de mama. Fucosiltransferases. Glicobiologia. Regulação gênica

ABSTRACT

The fucosylation process, regulated by α -L-fucosyltransferases and α -L-fucosidases, shows variations in its profile in breast cancer. These variations are often associated with tumor development. The miRNAs play an important biological mechanism in the regulation of gene expression in cancer. Our goal was to evaluate the expression of the FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 and HIF1A genes in breast cancer and to predict the main regulating miRNAs of their expressions, as well as to predict the main signaling pathways associated with these miRNAs. Gene expression was evaluated using public microarray data obtained from Whithead Institute. The miRWalker 2.0 program was used to predict miRNAs with potential to regulate target genes in the 3'UTR position of the mRNA. Then, miRNAs were selected and functional annotation of the target genes. We found that FUT8 is more expressed than other FUTs in Estrogen Receptor and positive and negative progesterone (ER / PR) tumors, in triple negative breast cancer (TNBC) and in ductal breast carcinoma (DC). FUT1 expression is higher in TNBC than ER / PR (+) samples. FUT3 is more expressed in TNBC and ER / PR (-) samples than ER / PR (+). The expression of the FUCA1 gene overcome FUT1, FUT3 and FUT8 in DC, however it is not different from FUT8 in TNBC and in ER / PR (+) and (-) breast tumors. The expression of FUCA1 is increased regarding to FUT1 and FUT3 in all situations analyzed. The expression of the HIF1A gene is increased in TNBC, DC, in breast tumors ER / PR (+) and (-) when compared to the other target genes. Our results reveal that the miRNAs has-miR-181b-5p and has-miR-181d-5p are potential regulators of FUT1 and FUCA1 expression; hsa-miR-449a and hsa-miR-34a-5p miRNAs are potential regulators of FUT1 and FUT8 expression, respectively; and hsa-miR-519b-5p is a potential regulator of FUT3 expression, while hsa-miR-519b-3p is a candidate for regulation of HIF1A expression. Most of the target genes predicted for the selected miRNAs are potential regulators of the MAPK, HER2, TGF β , Wnt, p53 and Notch signaling pathways. Based on our results, we conclude that the selected miRNAs are candidates for negative regulation of protein expression in the fucosylation and hypoxia pathways in breast cancer, as well as important signaling pathways associated with carcinogenesis and tumor progression.

Keywords: Breast cancer. Fucosyltransferases. Glycobiology. Gene regulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Degradação do HIF-1- α na via dependente de oxigênio.....	21
Figura 2 -	Síntese do HIF-1- α na via independente de oxigênio.....	21
Figura 3 -	Tipos de sítio de ligação canônicos entre miRNA e RNAm.	24
Figura 4 -	Procedimento de predição de miRNAs pelo programa miRWalk 2.0	25
Figura 5 -	Procedimento para avaliação da interação RNAm – miRNA pelo programa RNAhybrid.....	30
Figura 6 -	Procedimento de anotação funcional dos genes pelo programa DAVID 6.8. ..	31
Figura 7 -	Diferença na expressão de FUT1 e FUT3 em CMTN e RE/RP (+)	32
Figura 8 -	Diferença na expressão de FUT3 em relação a expressão de RE/RP no câncer de mama.....	34
Figura 9 -	Expressão gênica de HIF1A e enzimas envolvidas no perfil de fucosilação em tumores de mama.	35
Figura 10 -	Rede de interação entre gene, miRNAs e vias de sinalização potencialmente envolvidas no perfil de fucosilação em tumores de mama.....	36
Figura 11 -	Processo de seleção de miRNAs com potencial para regulação de proteínas envolvidas nas vias de fucosilação e hipóxia no câncer de mama.....	38
Figura 12 -	Rede de interação entre gene, miRNAs e vias de sinalização potencialmente envolvidas no perfil de fucosilação em tumores de mama. Cada linha do esquema indica uma predição de interação entre gene e miRNA ou miRNA e via de sinalização celular. As cores das linhas combinam com as cores dos genes ou dos miRNAs, indicando a relação de predição entre cada variável do estudo.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de miRNAs preditos e pré-selecionados através do número mínimo de algoritmos considerados por análise.....	37
Tabela 2 -	Genes alvos e respectivos miRNAs selecionados com seus valores de <i>Energy Threshold</i> para interação miRNA-RNAm.....	37
Tabela 3 -	Quantidade de genes alvos preditos pelo programa miRWalk 2.0 para cada miRNA chave nas vias de fucosilação.....	39
Tabela 4 -	Principais vias afetadas pelos potenciais genes alvos dos miRNAs chave nas vias de fucosilação	39

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
Dvl	<i>Dishevelled segment polarity protein</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EMT	<i>Epithelial–Mesenchymal Transition</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FUCA1	Fucosidade 1
FUT	Fucosiltransferase
Fzd	<i>Frizzled protein</i>
GDP	Guanosina Difosfato
GLUT-1	<i>Glucose transporter 1</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
HIF1A	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LEF-1	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor 1</i>
MAML	<i>Mastermind-like protein</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
miRNA	<i>Micro RNA</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RBPJ	<i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>
RE/RP	Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona
ROR	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
LPR	<i>Leucine-responsive regulatory</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1	FUCOSILTRANSFERASES E FUCOSIDASES NO CÂNCER.....	18
2.2	O AMBIENTE TUMORAL HIPÓXICO E HIF-1A	20
2.3	OS MIRNAS NO CÂNCER	23
2.4	VIAS DE SINALIZAÇÃO NO CÂNCER	26
3	METODOLOGIA	29
3.1	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FUCOSILTRANSFERASES NO CÂNCER DE MAMA.....	29
3.2	PREDIÇÃO DOS MIRNAS	29
3.3	COLETA DE DADOS SOBRE MIRNAS E CORRELAÇÕES PATOLÓGICAS	30
3.4	AVALIAÇÃO DE INTERAÇÃO RNAM – MIRNA	30
3.5	ESCOLHA DE MIRNAS COM MAIOR POTENCIAL PARA REGULAÇÃO DE FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 E HIF1A EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA	31
3.6	ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES ALVO PREDITOS PARA OS MIRNAS SELECIONADOS	32
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4	RESULTADOS.....	34
4.1	EXPRESSÃO GÊNICA DAS FUCOSILTRANSFERASES FUT1, FUT3 E FUT8 E DO HIF1A NO CÂNCER DE MAMA.....	34
4.2	PREDIÇÕES DOS MIRNAS COM POTENCIAL REGULADOR DAS VIAS DE FUCOSILAÇÃO E HIPÓXIA.....	36
4.3	ESTUDO DE VIAS REGULADAS POR GENES ALVO DE MIRNAS.....	38
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48

APÊNDICE A - LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS DISÓNÍVEIS NO BANCO DE DADOS WHITEHEAD INSTITUTE	62
APÊNDICE B - MANUAL PARA PREDIÇÃO DE miRNAs E ANOTAÇÃO FUNCIONAL DE GENES ALVOS	63
APÊNCIDE C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA REALIZADA DURANTE O MESTRADO	68

1 INTRODUÇÃO

O perfil de glicosilação nas células neoplásicas demonstra variações na expressão de glicanos em diferentes linhagens celulares, bem como em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral, essas variações estão relacionadas ao aumento de características de malignidade e à carcinogênese (MEANY *et al.*, 2011). Neste trabalho destacamos o perfil de fucosilação no câncer de mama, onde a expressão das enzimas envolvidas na síntese e degradação de glicanos fucosilados sofrem significativas variações nas células neoplásicas (BLANAS *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2017). Compreender a regulação do perfil de expressão de glicanos fucosilados presentes nas células neoplásicas, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na malignidade tumoral.

O perfil de fucosilação celular é regulado principalmente pelas enzimas fucosiltransferases (FUT1-10 e POFUT1-2), que adicionam resíduos de fucose à glicanos, e pelas fucosidases (FUCA1-2) que removem resíduos de fucose de glicanos (BLANAS *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2001; VRIES *et al.*, 2001). Diversos estudos têm demonstrado que as fucosiltransferases e as fucosidases desempenham função em processos de migração, invasão, proliferação e desdiferenciação celular, estando também associadas ao desenvolvimento de metástases e prognósticos reservados em câncer de mama (KAWAI *et al.*, 2013; BREIMAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017). Aqui, destacamos às enzimas FUT1, FUT3, FUT8 e FUCA1, com atividades α 1,2-fucosiltransferase, α 1,3/4-fucosiltransferase, α 1,6-fucosiltransferase e α -L-fucosidase, respectivamente, capazes de influenciar o perfil de fucosilação celular no câncer de mama (ZHANG *et al.*, 2008; BREIMAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2015).

Tumores sólidos estão frequentemente submetidos à hipóxia e privação de nutrientes devido a uma irrigação vascular deficiente, especialmente nas regiões centrais do tumor (PARK *et al.*, 2017). Contudo, a hipóxia tem sido descrita como uma aliada no desenvolvimento de características de malignidade tumoral (JOSEPH *et al.*, 2018; GILKES *et al.*, 2014). Algumas destas características, como o aumento da multiplicação celular, invasão vascular, resistência à quimioterapia e radioterapia, são atribuídas a expressão alterada de glicanos, como consequência do aumento da expressão de HIF1A, uma subunidade do fator induzível de hipóxia, HIF (*Hypoxia-Inducible Factors*), que regula a expressão de diversos genes durante a hipóxia, ou até mesmo em alguns tumores em normóxia, como no câncer

cervical e neuroblastomas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018; JONES *et al.*, 2018; GREIJER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2015; CIMMINO *et al.*, 2019).

Os miRNAs são constituídos por curtas sequências de ácidos ribonucleicos, capazes de interagir com o RNAm e inibir sua tradução (IORIO *et al.*, 2018; BARTEL, 2004). Os miRNAs têm sido relacionados com a regulação de inúmeros genes envolvidos com os processos de carcinogênese e desenvolvimento tumoral, inclusive no câncer de mama (IORIO *et al.*, 2018; MCGUIRE *et al.*, 2015). Alguns miRNAs foram descritos como reguladores da expressão de FUTs, proporcionando aumento de adesão e migração celular e crescimento celular (LIU *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2017; BERNARDI *et al.*, 2013).

A oncogênese e a progressão tumoral são reguladas por alterações genéticas e epigenéticas que garantem às células neoplásicas vantagens adaptativas sobre mecanismos que controlam sua sobrevivência, favorecendo a proliferação celular exacerbada e evitando sua senescência e mortalidade. As alterações genéticas e epigenéticas mencionadas estão, na maioria das vezes, associadas a desvios em redes de sinalização que regulam processos que alimentam a progressão tumoral e a oncogênese (SEVER, BRUGGE, 2015). Há inúmeras vias de sinalização associadas ao câncer, neste trabalho, focaremos nas vias de sinalização relacionadas a MAPK, Wnt, p53, TGF β , Notch e HER2, por terem se destacado na anotação funcional dos genes alvos do miRNAs preditos neste trabalho.

À luz destes conhecimentos, concluímos que a investigação da função dos miRNAs, no tocante à regulação de proteínas relacionadas às vias de fucosilação e hipóxia no câncer de mama, desponta como uma abordagem para a compreensão da biologia tumoral e desenvolvimento de recursos que auxiliem no tratamento, diagnóstico e prognóstico de neoplasias mamárias. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das fucosiltransferases FUT1, FUT3 e FUT8, da fucosidase FUCA1 e do gene HIF1A, no câncer de mama, e prever os miRNAs com maior potencial para regular a expressão dos respectivos genes, além de prever as principais vias de sinalização celular reguladas por estes miRNAs.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 e HIF1A no câncer de mama e prever os miRNAs com maior potencial para regular a expressão dos respectivos genes, e prever também as principais vias de sinalização celular reguladas por estes miRNAs.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de expressão das fucosiltransferases, FUCA1 e HIF1A (genes alvo) em Carcinomas Ductais de mama (CD);
- Analisar a expressão das fucosiltransferases de acordo com o grau de desenvolvimento tumoral (1, 2 e 3) em CD;
- Analisar o perfil de expressão dos genes alvo de acordo com características moleculares (RE, RP e HER2) em linhagens tumorais de mama;
- Identificar, *in silico*, candidatos a miRNAs, relacionados à hipóxia, reguladores das vias de fucosilação no câncer de mama;
- Identificar as vias de sinalização celular afetadas pelos miRNAs selecionados como reguladores dos genes alvo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fucosiltransferases e Fucosidases no Câncer

As fucosiltransferases (FUTs) são enzimas que catalisam a adição de um resíduo de L-fucose, através de uma molécula de GDP- β -L-fucose, a outros glicídios, e em alguns casos, como fazem as O-fucosiltransferases, catalisam a adição de fucose a um grupo hidroxil de uma serina ou treonina (MYOSHI, MORIWAKI, NAKAGAWA; 2008; WANG *et al.*, 2001; VRIES *et al.*, 2001). Existem um total de 12 fucosiltransferases humanas com atividades de fucosilação de resíduos de galactose ou N-acetilglicosamina nas posições α 1,2 (FUT1, FUT2), α 1,3 (FUT3 à FUT7 e FUT9 à FUT11), α 1,4 (FUT3, FUT5) e α 1,6 (FUT8), além disso a POFUT1, uma O-fucosiltransferase, catalisa a fucosilação de resíduos de grupos hidroxil serina (BLANAS *et al.*, 2018).

As fucosiltransferases demonstram exercer papel fundamental no desenvolvimento de características de malignidade no câncer, como aumento de invasão vascular, proliferação, migração e desdiferenciação celular (KAWAI *et al.*, 2013; BREIMAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017). Neste trabalho, iremos destacar a regulação da expressão de FUT1, FUT3 e FUT8 no câncer de mama.

No tocante à expressão das fucosiltransferases, foi constatado que a subexpressão de FUT1 no câncer de mama, inibe o crescimento do tumor (ZHANG *et al.*, 2008) e em linhagens celulares com superexpressão de HER2, diminui a proliferação celular (KAWAI *et al.*, 2013). O silenciamento do gene FUT1 nas células de câncer de mama está associado à diminuição da atividade do mTORC1, uma proteína quinase serina/treonina, associada ao crescimento, proliferação e sobrevivência celular, sendo também um conhecido supressor da autofagia (TAN *et al.*, 2016). Como consequência da diminuição da expressão de FUT1 e da atividade de mTORC1, observa-se um aumento na formação e degradação do autofagossomo, acompanhadas de um aumento na fusão autofagossomo-lisossomo (TAN *et al.*, 2016).

Em células de câncer de mama submetidas a tratamento com TGF β , a expressão de FUT3 é regulada negativamente durante a transição epitelial para mesenquimal (EMT), um evento relacionado à desdiferenciação celular, que promove aumento da invasão celular e potencial metastático do câncer, entretanto a expressão do FUT3 é parcialmente restaurada quando o tratamento com TGF β é descontinuado (BREIMAN *et al.*, 2016). Por outro lado, a expressão de FUT1 e FUT3 é ausente em células que superexpressam o protooncogene Kras

ou o fator de transcrição SNAIL, um importante indutor de EMT, com papel importante na sobrevivência celular, e também associado a metástases, recorrência tumoral e prognóstico reservado (BREIMAN *et al.*, 2016). Além disso, FUT3 induz a síntese de antígenos de Syalil Lewis X (sLe^x), resultando em maior adesão celular às E-selectinas, mecanismo pelo qual FUT3 e o antígeno mencionado estão associados à invasão vascular (BARTHEL *et al.*, 2009). No Carcinoma Ductal Invasivo da Mama (CDI) foi relatada uma baixa frequência de expressão de FUT3 (NASCIMENTO *et al.*, 2015), posteriormente corroborada por Carrascal e colaboradores que demonstraram que FUT3 e FUT7 não estão expressos no CDI (CARRASCAL *et al.*, 2018).

A α 1,6-fucosilação é realizada por uma fucosiltransferase única, a α 1-6FucT, codificada pelo gene FUT8, esse padrão de fucosilação mostrou ser importante para a progressão do tumor e está associado a características de malignidade e prognóstico reservado (WANG *et al.*, 2014; AGRAWAL *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). No câncer de mama, a regulação negativa ou o bloqueio da expressão de FUT8 reduz a *stemness*, uma característica das células-tronco associadas à auto-renovação, proliferação ilimitada e diferenciação celular, além disso, a subexpressão de FUT8 também reduz a EMT através da via de sinalização Wnt / β -catenina (YANG *et al.*, 2017). Foi demonstrado também que há um aumento da expressão de FUT8, induzida por TGF- β 1, durante a EMT, sugerindo que a expressão do FUT8 seja regulada por E-caderina, β -catenina e LEF-1, durante a EMT (CHEN *et al.*, 2013). Por conseguinte, concluímos que a expressão de FUT8, assim como de FUT1 e FUT3, estão associados a características que conferem às células neoplásica vantagens adaptativas, que por sua vez favorecem a progressão tumoral, conferindo ao câncer agressividade.

A respeito do mecanismo de equilíbrio na síntese de glicanos fucosilados, antagonicamente às fucosiltransferases temos as α -L-fucosidases que promovem a retirada da L-fucose dos glicanos fucosilados. Existem apenas duas isoenzimas com esta atividade, a α -L-fucosidase 1 (tecidual) e a α -L-fucosidase 2 (plasmática), codificadas, respectivamente, pelos genes FUCA1 e FUCA2 (EIBERG, MOHR, NIELSEN, 1984; TSUCHIDA *et al.*, 2017).

A α -L-fucosidase 1 é uma enzima lisossomal que remove resíduos de L-fucose terminal presentes nas cadeias de oligossacarídeos de glicoconjugados. As α -L-fucosidases, em mamíferos, são multímeros de subunidades glicoproteicas com atividade ideal em valores de pH ácidos (JOHNSON, ALHADEFF, 1991). A respeito de sua expressão no câncer de mama, foi demonstrado que se encontra diminuída em células de linhagem tumoral do tipo Triplo Negativo e do subtipo HER2+, RE-, RP- (BONIN *et al.*, 2018). Foi demonstrado ainda

que a expressão desta enzima aumenta a sobrevida de pacientes com câncer de mama do tipo Luminal B LN+, e sua baixa expressão está envolvida com o desenvolvimento de recidivas e acometimentos linfonodais (BONIN *et al.*, 2018).

A expressão de glicanos fucosilados, bem como das fucosiltransferases e fucosidases podem ser regulados por diversos fatores, como hipóxia, expressão de miRNAs, e distúrbios em redes de sinalização e transdução de sinal celular (BELO *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2014). Portanto, compreender os mecanismos de regulação que influenciam no perfil de fucosilação celular desponta como uma abordagem promissora na busca de biomarcadores e estratégias terapêuticas no câncer.

2.2 O Ambiente Tumoral Hipóxico e HIF-1 α

Na maioria dos tumores sólidos, é frequente a constatação de regiões com aporte sanguíneo deficiente, devido ao crescimento descontrolado de células e formação vascular desorganizada (HAYASHI *et al.*, 2019). Esta situação favorece condições de privação de nutrientes e oxigênio para as células neoplásicas, entretanto, apesar desta situação parecer desfavorável ao desenvolvimento celular, a hipóxia tem demonstrado estar associada a ganhos de características, como crescimento exacerbado e imortalização celular, que favorecem o desenvolvimento tumoral, demonstrando uma capacidade adaptativa do tumor a situações de estresse (HAYASHI *et al.*, 2019).

O HIF-1- α , é uma subunidade proteica que se associa a uma subunidade HIF-1- β para formar o fator de transcrição heterodimérico induzível por hipóxia 1 (HIF-1) (HOGENESCH *et al.*, 1997). Em condições de normóxia, o gene HIF1A é subexpresso na maioria das células humanas, no entanto, sob condições de hipóxia, a expressão de HIF1A é significativamente aumentada (MINET *et al.* 1999). O HIF1A é então o principal regulador da transcrição da resposta celular e de desenvolvimento à hipóxia. A degradação da proteína HIF-1- α é regulada pela via dependente de oxigênio (Fig.1), enquanto a sua expressão é regulada pela via independente de oxigênio (Fig.2), (SEMENZA, 2000, TORRES *et al.*, 2017). O dímero HIF-1 induz a transcrição de mais de 60 genes, incluindo VEGF e eritropoietina, envolvidos em processos biológicos como angiogênese e eritropoiese, que auxiliam na promoção e aumento da oferta de oxigênio para regiões hipóxicas, além disso, induz a expressão de GLUT-1 para aumentar o fluxo de glicose para a célula, a fim de fornecer energia via fermentação láctica (SEMENZA, 2003; MAH *et al.*, 2012, NDUBUIZU *et al.*, 2010).

Figura 1. Degradação do HIF-1- α na via dependente de oxigênio. Sob condições de normóxia, HIF-1- α é hidroxilado por prolil-hidroxilases dependentes de oxigênio (PHD), levando à formação de um complexo com o fator de von Hippel Lindau (VHL); por sua vez, esse complexo se liga à ubiquitina (Ub) e é subsequentemente degradado pelo proteossoma. Fonte: TORRES *et al.*, 2017.

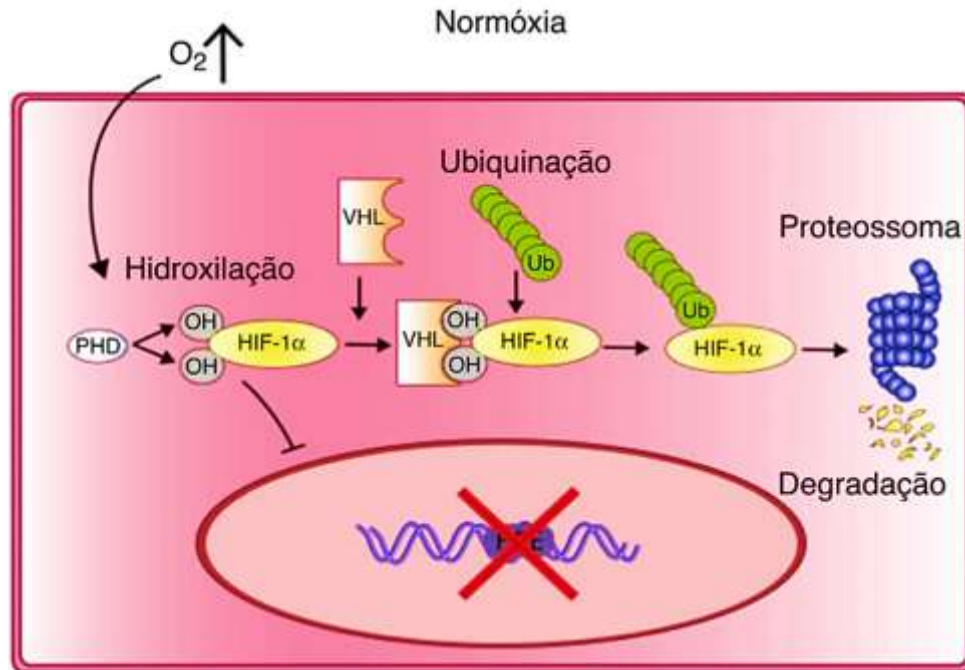
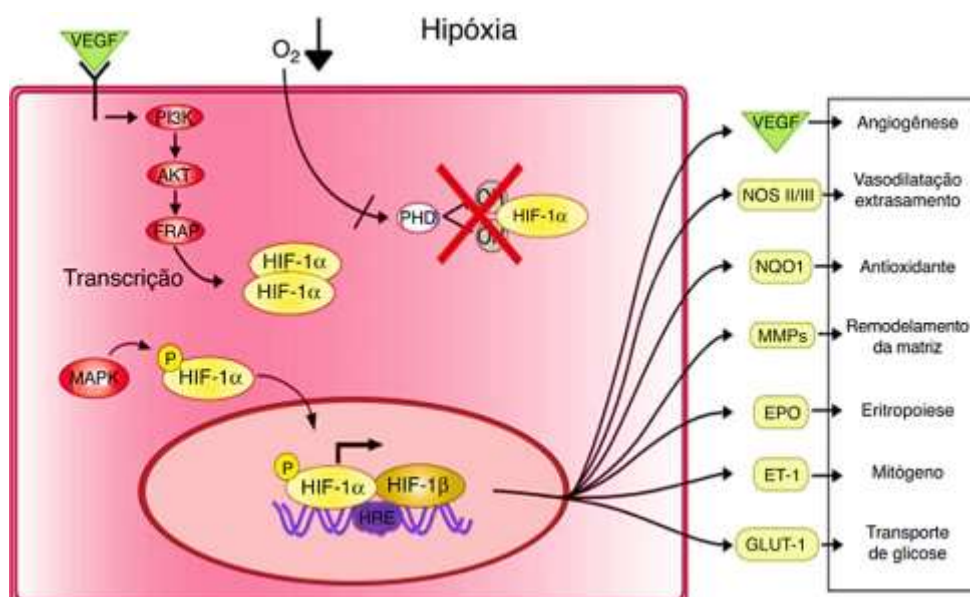


Figura 2. Síntese do HIF-1- α na via independente de oxigênio. Sob condições hipóxicas, a enzima PHD fica inativa e HIF-1 α é estabilizado e fosforilado pelo MAPK, em seguida, HIF-1 α se transloca para o núcleo e liga-se à subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1. Esse complexo, por meio do HRE (Hypoxia-Response Element), se liga à sequência de DNA específica 5'TAGCGTGH3' presente nas regiões promotoras dos vários genes para sua subsequente ativação. Fonte: TORRES *et al.*, 2017.



O HIF1A pode ser ativado de forma independente da hipóxia, e mesmo em estado de normóxia, a célula demonstra um mimetismo molecular da condição de hipóxia, este fenômeno é denominado de pseudo-hipóxia, e foi descrito pela primeira vez em estudos sobre diabetes (WILLIAMSON *et al.*, 1993), contudo esta situação tem se mostrado comum no câncer (HAYASHI *et al.*, 2019).

Diversos fatores estimulam a expressão e a sinalização de HIF1A, como a produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), produzidos em excesso em situações de hipóxia, porém foi demonstrado que mesmo em situações de normóxia as EROs podem estabilizar a proteína HIF-1 α (GUZY *et al.*, 2005; MOVAFAGH *et al.*, 2015). Foi proposto que a regulação de HIF-1 α frente a produção de EROs pode estar associada à oxidação do Fe²⁺, um cofator da PDH (Prolil-hidroxilases dependentes de oxigênio), responsável pela hidroxilação de HIF-1 α , iniciando o processo de degradação desta proteína (GERALD *et al.*, 2004).

Alguns oncometabólitos gerados pelo Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT) também estão associados à expressão e sinalização de HIF1A (POLLARD *et al.*, 2005). O acúmulo de succinato e fumarato, devido a mutações nos genes codificadores da succinato-desidrogenase (SDH) e da fumarato-hidratase (FH), respectivamente, estão associados com a diminuição de níveis de α -cetoglutarato, um metabólito que funciona como cofator da enzima PHD e FIH1 (Fator Inibidor de HIF-1 α), que participam da degradação de HIF1A (PAN *et al.*, 2005). Mutações em SDH e FH foram descritas em feocromocitoma, carcinoma de células renais e paraganglioma, e a função alterada destas enzimas estão relacionadas com o aumento da expressão de HIF1A, devido ao aumento de succinato e fumarato, que resulta em diminuição de α -cetoglutarato, resultando em menor atividade das enzimas PHD e FIH1 (BAYSAL *et al.*, 2000; RUSTIN *et al.*, 2003; TOMLINSON *et al.*, 2002; POLLARD *et al.*, 2003). O acúmulo de 2-hidroxioglutarato, também produzido no CAT, associado a mutações na isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH), diminui a atividade de PHD e FIH1 devido à competição com o α -cetoglutarato pelo sítio catalítico dessas enzimas, favorecendo então o aumento na expressão de HIF1A (XU *et al.*, 2011; KOIVUNEN *et al.*, 2012).

Além dos oncometabólitos gerados no CAT, o lactato, gerado a partir da fermentação láctica, estimulada pela hipóxia e / ou pelo efeito Warburg, nas células neoplásicas, pode induzir a inibição da ativação de HIF1A por PHD (LU *et al.*, 2002; SONVEAUX *et al.*, 2012). Também foi relatado que o piruvato induz condições pseudo-hipóxicas (JUNG *et al.*, 2011).

Fatores epigenéticos como perfil de metilação de DNA, acetilação de histonas e níveis de zinco e a expressão de alguns miRNAs também interferem na expressão da proteína HIF-1 α ou podem ser afetados por ela (NIU *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018; CRUEZIRO *et al.*, 2018). Wang e colaboradores (2014) propuseram uma regulação via retroalimentação negativa entre o miRNA-210 e o HIF-1 α , uma vez que este miRNA é diretamente regulado pelo HIF-1 α , ao mesmo tempo que o gene HIF1A foi identificado com alvo do miR-210. Além disso, foi descrito que HIF1A reprime a expressão do miRNA-34a, enquanto a proteína p53 aumenta, este estudo revela que expressão desse miRNA no câncer colorretal impede a ativação da proteína STAT3 pela inibição da expressão de PPP1R11, prevenindo o EMT e metástases (LI *et al.*, 2017). Também foi revelado que o miRNA-199a-5p tem como alvo o gene HIF1A, e sua expressão em hemangioma induz apoptose e inibe proliferação celular, através da regulação de HIF1A (WANG *et al.*, 2018).

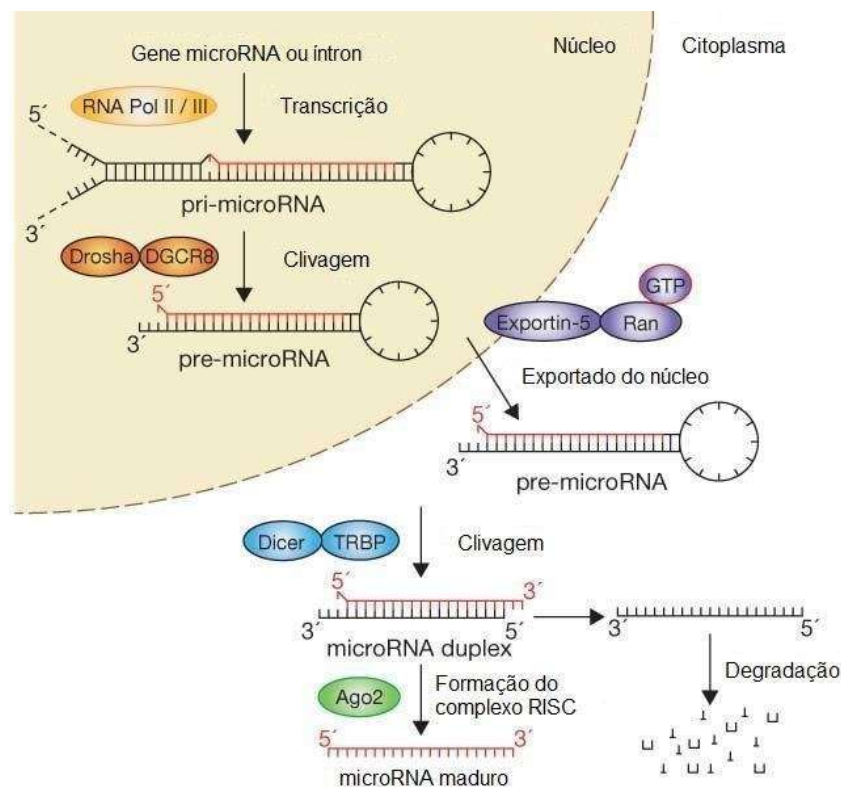
É notável que a proteína HIF-1 α seja um fator importante na regulação da expressão de diversos genes associados ao desenvolvimento de características tumorais agressivas, incluindo a influência no perfil de glicosilação celular (PEIXOTO *et al.*, 2016). A superexpressão de HIF-1 α em células de câncer pancreático, suprimiu a expressão dos genes FUT1 e FUT2, regulando negativamente a expressão de glicanos α 1,2- fucosilados (BELO *et al.*, 2015). Portanto, compreender a regulação deste gene pode gerar respostas valiosas acerca da variação no perfil de expressão de glicanos fucosilados em células tumorais.

2.3 Os miRNAs no Câncer

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos, com em média 22 nucleotídeos, que se hibridizam ao RNAm bloqueando sua tradução (IORIO *et al.*, 2018; BARTEL, 2004). O processo de biogênese de miRNAs se inicia com a síntese de um transcrito primário denominado pri-miRNA, constituído por uma longa sequência de nucleotídeos (aproximadamente 1Kb), contendo estruturas do tipo *stem-loop*, que resultam em sequências maduras de miRNAs (LEE *et al.*, 2002). Além disso, os pri-miRNAs possuem fitas simples tanto nas extremidades 5' quanto 3' (HA, KIM, 2014; WINTER *et al.*, 2009). O processo de maturação se inicia então no núcleo da célula, com a RNase nuclear III, Drosha, cortando as estruturas *stem-loop* e liberando pequenos miRNAs em forma de *hairpin*, agora denominados pré-miRNAs, com em média 65 pares de bases (LEE *et al.*, 2003). Em seguida, este pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela proteína Exportina 5 (EXP5), que forma

um complexo com a proteína nuclear de ligação ao GTP (RAN-GTPase) e o pré-miRNA (ZHENG *et al.*, 2004). Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer, resultando em um pequeno miRNA, que será incorporado à proteína argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC – do inglês – *RNA-induced silencing complex*), a fita não incorporada a proteínas argonautas são posteriormente degradadas (HUTVAGNER *et al.*, 2001; KETTING *et al.*, 2001). Todo o processo de biogênese e maturação dos miRNAs está esquematizado na figura 3.

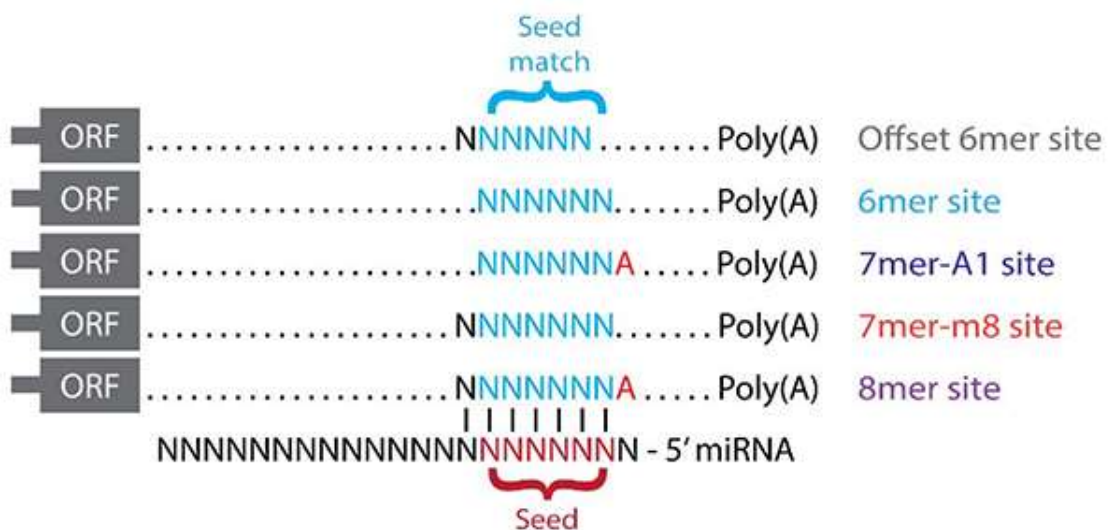
Figura 3. Processo de biogênese e maturação de miRNAs. O pri-miRNA é sintetizado no núcleo celular, e clivado pelo complexo Drosha-DGCR8 gerando o pré-miRNA, que em é exportado para o citoplasma através do complexo Exportina-5-RAN-GTP. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pelo complexo Dicer-TRBP e incorporado a proteínas argonautas como miRNA maduros. Adaptado de: (WINTER *et al.*, 2009).



Como mencionado, os miRNAs maduros se associam a proteínas argonautas formando um complexo de silenciamento (RISC), podendo este se anelar ao RNAm, desestabilizando ou reprimindo a sua tradução (FRIEDMAN *et al.*, 2018). O sítio de interação do miRNA ao RNAm é denominado *seed* (nucleotídeos 2-7), uma região heptamétrica bem conservada, situada na região 5' do miRNA, este sítio se anela principalmente a região 3'

UTR do RNAm, que correspondem a regiões bem conservadas na maioria dos mamíferos (Fig.4) (FRIEDMAN *et al.*, 2018).

Figura 4. Tipos de sítio de ligação canônicas entre miRNA e RNAm. ORF = *Open Reading Frame*, sequência de DNA entre um códon de início e um códon de parada. *Seed* = região do miRNA que interage com o RNAm. *Poly (A)* = cauda poli A dos RNAm. Sítio *offset 6mer* = correspondência exata do RNAm para as posições 3-7 do miRNA maduro. Sítio *6mer* = correspondência exata do RNAm para as posições 2-7 do miRNA maduro, sem ser seguida por uma adenina. Sítio *7mer-A1* = correspondência exata do RNAm às posições 2-7 do miRNA maduro, seguida por uma adenina. Sítio *7mer-m8* = correspondência exata do RNAm para as posições 2-8 do miRNA maduro (*seed* + posição 8) sem ser seguida de uma adenina. Sítio *8mer* = correspondência exata do RNAm para as posições 2-8 do miRNA maduro (*seed* + posição 8) seguida por um adenina. FONTE: TargetScanHuman, disponível em <http://www.targetscan.org/vert_72/>



No contexto do câncer, temos que o miRNA-424 (322)/503 regula a involução mamária através do alvo BCL2 em linfomas de células B e a ausência desse miRNA provoca resistência à quimioterapia (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). O miRNA-660-5p, superexpresso no câncer de mama, promove o desenvolvimento de tumores e metástase (SHEN *et al.*, 2017). O miRNA-206 tem como alvo o gene supressor de tumor BRCA1, estando associado ao desenvolvimento do câncer de mama (WRONSKI *et al.*, 2016). O efeito da supressão gênica do miRNA artificial (pcDNATM6.2-GW/EmGFP-FUT3-miR) inibe a proliferação, migração e invasividade em células de linhagem de câncer gástrico, através do silenciamento de FUT3 (CAI *et al.*, 2016). Foi demonstrado que o miRNA-198 regula negativamente a expressão gênica de FUT8, diminuindo o crescimento tumoral no câncer colorretal e metástases em camundongos, e inibindo a invasão e migração celular em câncer de pulmão de células não pequenas (WANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2019). O miRNA-184 é um supressor de tumor que regula genes envolvidos na via de sinalização PI3K / AKT / mTOR (PHUA *et al.*, 2015).

2.4 Vias de Sinalização no Câncer

As alterações celulares que resultam em carcinogênese são decorrentes de alterações moleculares de origem genética e/ou epigenética que afetam as redes de sinalização celular, em outras palavras, afetam a fisiologia celular, reprogramando diversas funções que garantem ao câncer características de malignidade (SEVER, BRUGGE, 2015). Neste trabalho, algumas vias de sinalização se destacaram por estarem fortemente relacionadas aos genes alvos dos miRNAs preditos neste estudo, com potencial para regulação negativa de FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 e HIF1A, estas vias, portanto, serão melhor abordadas neste trabalho.

A via de sinalização MAPK começa com a ativação da proteína Ras pelos receptores tirosina quinases. Ras ativado causa o recrutamento de membrana e a ativação das proteínas Raf, que fosforila MEK, que por sua vez, fosforila ERK, que pode ativar fatores de transcrição, levando à expressão de genes reguladores da proliferação e sobrevivência celular (KNIGHT, IRVING, 2014; CSEH *et al.*, 2014). A ativação exagerada da via MAPK favorece a proliferação celular descontrolada e resistência à apoptose (CAHPPELL *et al.*, 2011; BURROWS *et al.*, 2011), além disso, a ativação excessiva da via MAPK é descrita em diversos tumores, como melanoma, tumores papilares da tireoide, tumores serosos do ovário e tumores colorretais (ASCIERTO *et al.*, 2012; CANTWELL *et al.*, 2011; SANTARPIA *et al.*, 2012).

A via de sinalização Wnt é dividida em β -catenina dependente (canônica) e independente (não canônica). A ausência de glicoproteínas Wnt favorece a fosforilação e ubiquitinação da β -catenina e sua posterior degradação (LATRES *et al.*, 1999). A consequência da ausência de β -catenina nuclear é a repressão da expressão gênica, através do recrutamento de histonas desacetilases (METCALFE *et al.*, 2010). Simplificadamente, na via de sinalização canônica, a presença de proteínas Wnt ligadas a receptores Fzd e co-receptores LPR estimula a fosforilação do respectivo co-receptor, recrutando proteínas Dvl para a membrana plasmática, onde se polimerizam e inativam o complexo de destruição de β -catenina, que consequentemente passa a se acumular, e posteriormente se transloca para o núcleo, alterando o perfil da expressão gênica (LIEN, FUCHS, 2014). A via de sinalização não canônica se inicia com a ligação do Wnt ao receptor Fzd e co-receptores ROR, que por sua vez recruta e ativa Dvl, esta proteína ativará RAC1, que ativará JNK, que ativa fatores de transcrição, como o ATF2 (ZHAN *et al.*, 2017). Desregulações na via de sinalização Wnt já foram descritas em câncer de mama, câncer gastrointestinal, leucemia e melanoma, sempre associado a características tumorais de agressividade (ZHAN *et al.*, 2017).

A proteína p53, codificada pelo gene TP53, é um fator de transcrição com função pró-apoptótica (SIONOV, HAUPT, 1999). Foi descrito que mais de 50% dos cânceres cursam com mutação e perda de função no TP53, sendo este considerado um supressor de tumor (PERRI *et al.*, 2015). Em situações normais, a proteína p53 é expressa em níveis muito baixos, entretanto quando há dano ao DNA a expressão desta proteína aumenta significativamente, em especial no núcleo, devido a modificações pós-traducionais que a torna ativa (OZAKI, NAKAGAWARA, 2011). Uma vez ativa, p53 promove a transcrição de genes responsáveis por parar o ciclo celular e/ou induzir a apoptose, a depender da extensão do dano ao DNA (OZAKI, NAKAGAWARA, 2011). Foi descrito que modelos murinos com deficiência de p53 desenvolveram tumores espontâneos, demonstrando o papel fundamental deste fator de transcrição para a oncogênese (DONEYHOWER *et al.*, 1992).

A família TGF β humana corresponde a mais de 30 citocinas, estas se apresentam ativas quando em forma de dímero. O dímero ativo do TGF β reúne dois pares de receptores serina/treonina-quinases conhecidos como receptores tipo I e tipo II, respectivamente. Na ligação ao TGF β , os receptores do tipo II fosforilam e ativam os receptores do tipo I que propagam o sinal fosforilando os fatores de transcrição Smad. Uma vez ativado, o substrato receptor Smads (RSmads) é transportado para o núcleo e forma um complexo com Smad4, capaz de se ligar com qualquer RSmads (SHI, MASSAGUÉ, 2003). No núcleo é formado um complexo Smads/RSmads/cofator que se liga ao DNA e estimula a expressão gênica, onde cada combinação entre diferentes RSmads no complexo ativa genes específicos (FENG, DERYNCK, 2005; MASSAGUÉ *et al.*, 2005). O TGF β inibe a proliferação e induz a apoptose nos estágios iniciais do câncer de mama, mas promove agressividade em estágios avançados, esse efeito contraditório é conhecido como paradoxo do TGF β (ZHAO *et al.*, 2018).

Há quatro tipos de receptores Notch diferentes em mamíferos, Notch1-4, cada qual codificado por um gene diferente. Notch1 e Notch2 são expressos amplamente em muitos tecidos ao longo do desenvolvimento humano, já o Notch3 é mais abundante no músculo liso vascular e nos pericitos, e o Notch4 é mais expresso no endotélio (ASTER *et al.*, 2017). Durante o tráfego para a superfície celular, os receptores Notch sofrem clivagem, criando um heterodímero não covalentemente composto por uma subunidade extracelular e uma subunidade transmembranar (RAND *et al.*, 2000). Após uma série de clivagens, o domínio intracelular da proteína Notch se transloca para o núcleo e forma um complexo com o Fator de Ligação ao DNA RBPJ e coativadores da família MAML, promovendo a transcrição gênica (WU *et al.*, 2000). Mutações em genes codificadores da família Notch estão associados

a diversos cânceres, como leucemia, câncer de mama, linfoma, carcinoma urotelial e câncer de pulmão (ASTER *et al.*, 2017).

As proteínas da família HER são receptores transmembranares do fator de crescimento. Elas possuem um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembranar e um domínio tirosina-quinase intracelular (MOASSER, 2007). Após a ligação do fator de crescimento aos seus domínios extracelulares, a proteína HER2 sofre dimerização e fosforilação dos seus domínios intracelulares (BURGESS *et al.*, 2003). Os resíduos de tirosina fosforilados fosforilam demais moléculas de sinalização intracelular, levando à ativação de inúmeras vias secundárias e interações com outras vias de sinalização, levando a diversos efeitos biológicos (PRENZEL *et al.*, 2001). HER2 é considerado um oncogene, e é amplamente utilizado como marcador para prognóstico e alvo terapêutico no câncer de mama, associado a características de agressividade tumoral (BRANDÃO *et al.*, 2018; HARBECK, GNANT, 2017).

Alterações nas vias de sinalização celular são então o ponto de convergência da maioria das alterações genéticas e epigenéticas no câncer, incluindo modificações pós-transcricionais, como fazem os miRNAs, modificações pós-traducionais, como fazem as fucosiltransferases e as fucosidases, e modificações em fatores de transcrição, como o dímero HIF1 (PHUA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). Compreender a relação entre modificações genéticas e epigenéticas, e seus impactos em vias de sinalização celular, revelam informações valiosas acerca dos processos envolvidos com a carcinogênese e o desenvolvimento tumoral.

3 METODOLOGIA

3.1 Avaliação da expressão gênica de fucosiltransferases no câncer de mama

As respectivas expressões gênicas das fucosiltransferases foram obtidas por dados de alto rendimento (4454 *microarrays*, dos quais: 726 *microarrays* são de tecidos normais; 2016 *microarrays* de linhagens de células tumorais; 1460 *microarrays* de tumores primários e 79 *microarrays* de células de linhagens não cancerosas), disponível no banco de dados virtual e de livre acesso do *Whitehead Institute* (<http://wi.mit.edu/>), através da ferramenta *Metabolic gEne RApid Visualizer* (<http://merav.wi.mit.edu/>) que utiliza diversos outros bancos de dados para obtenção de *microarrays*. Os dados de expressão dos *microarrays* foram normalizados juntos, permitindo a comparação da expressão entre todas as amostras selecionadas. As amostras selecionadas consistiram em linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo (n = 92), RE/RP (+) (n = 73) e (-) (n = 14) (Apêndice A), tecidos normais de mama (n = 137) e tecidos acometidos por carcinoma ductal mamário, classificados em graus de 1 a 3 (n = 257).

3.2 Predição dos miRNAs

Os miRNAs com potencial para regular os genes alvos deste estudo foram preditos pelo programa miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), que utiliza algoritmos próprios de predição e compara com mais 11 algoritmos de programas distintos. O procedimento de predição está descrito na Figura 5, e o manual de uso do programa encontra-se no Apêndice B.

Figura 5. Procedimento de predição de miRNAs pelo programa miRWalk 2.0. A posição 2 para início da *seed* foi escolhida por ser a posição que confere maior estabilidade à interação miRNA-RNAm, já a região 3'UTR é a região mais comum de anelamento do miRNA ao RNAm. Foram selecionados 12 programas, correspondente ao número máximo de programas com algoritmos de predição utilizados pelo miRWalk 2.0.



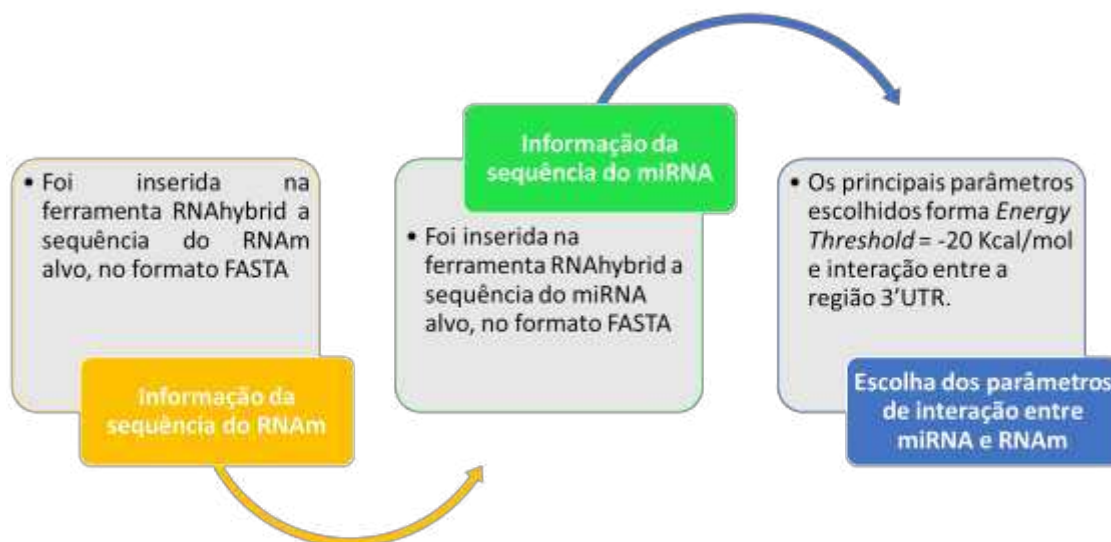
3.3 Coleta de dados sobre miRNAs e correlações patológicas

Os miRNAs que foram preditos pelas 3 maiores combinações de algoritmos (critério de seleção definido a fim de adequar a número amostral para as predições mais confiáveis) foram verificados no banco de dados miRDisease (<http://bnet.egr.vcu.edu/miRDisease/>), onde foram coletadas informações sobre a associação do miRNA com aspectos patológicos: presença no câncer de mama, metástase e hipóxia.

3.4 Avaliação de interação RNAm – miRNA

Os miRNAs selecionados foram analisados pela ferramenta RNAhybrid (https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission), para avaliar a interação entre o miRNA e a 3'UTR do RNAm alvo. Todos os transcritos analisados tinham as mesmas sequências nesta região. A descrição deste processo encontra-se na Figura 6 e o manual de uso do programa está descrito em detalhes no Apêndice B.

Figura 6. Procedimento para avaliação da interação miRNA – RNAm pelo RNAhybrid. O programa exige o formato FASTA para fazer a análise de interação miRNA-RNAm. Valores de *Energy Threshold* menores ou iguais a -20 KJ/mol possuem melhor performance no RNAhybrid (ZHANG, FONS, 2010). A região 3'UTR é região mais comum de anelamento do miRNA ao RNAm.



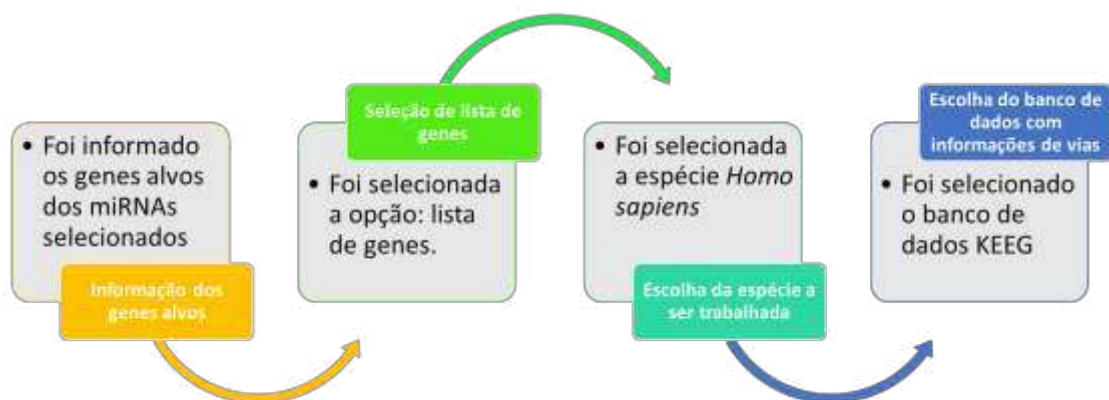
3.5 Escolha de miRNAs com maior potencial para regulação de FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 e HIF1A em células de câncer de mama

Para escolha dos miRNAs serviram como critério de inclusão (a ausência de qualquer um dos critérios de inclusão resultou em critério de exclusão): Interação entre miRNA-RNAm com *Energy Threshold* < -20 Kcal/mol, pois estes valores apresentam melhor performance (especificidade e sensibilidade) pelo programa RNAhybrid (ZHANG, FONS, 2010); expressão no câncer de mama, pois o foco deste trabalho é a expressão destes miRNAs no câncer de mama; expressão em metástases, pois o processo de invasão vascular e metástase está relacionado com a expressão das fucosiltransferases alvo deste estudo (LAI *et al.*, 2019; ALBURQUERQUE *et al.*, 2019; TU *et al.*, 2017); expressão em carcinomas, pois a maioria dos tumores que acometem a mama são carcinomas (FARHAT *et al.*, 2010); expressão em outros cânceres, pois é um indicativo de que este miRNA tem papel importante na dinâmica dos tumores; e expressão em hipóxia, pois é nessa situação onde o HIF1A está amplamente expresso (SEMENZA, 2000). Adicionalmente, os miRNAs que satisfizeram os critérios de inclusão, e foram preditos para mais de um dos genes analisados, receberam destaque por ter maior potencial de regulação da via de fucosilação.

3.6 Anotação funcional dos genes alvo preditos para os miRNAs selecionados

A predição de genes alvo dos miRNAs selecionados foram obtidos através do programa miRWalk 2.0, num procedimento semelhante ao de predição de miRNAs, colocando-se agora o miRNA ao invés do gene na busca. Após obtenção dos genes preditos, foi utilizado o programa DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) para anotação funcional do gene. O procedimento para anotação funcional via DAVID 6.8 está descrito na figura 7, e o manual de uso do programa está detalhado no Apêndice B.

Figura 7. Procedimento de anotação funcional dos genes pelo programa DAVID 6.8. KEEG = *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Os parâmetros selecionados são dispostos de forma intuitiva pelo DAVID 6.8.



3.6 Análises Estatísticas

Os dados de expressão entre fucosiltransferases no mesmo subtipo de câncer de mama foram comparados através do teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) pelo programa *GraphPad Prism 6.0*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. A diferença de expressão entre fucosiltransferases em diferentes subtipos de tumores de mama foi analisada através de teste T pelo programa *GraphPad Prism 6.0*, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. A distribuição de probabilidade de correspondências aleatórias da sequência da extremidade 5' do miRNA com a sequência 3'UTR do RNAm alvo, para predição de miRNAs, foi calculada usando a distribuição de Poisson, pelo programa miRWalk 2.0, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Para anotação funcional dos genes alvos dos miRNAs selecionados neste estudo, foi utilizado o *EASE score*, um valor

de p modificado do Teste Exato de Fisher (valores de $p < 0,005$ foram considerados significativos), e o FDR (*False Discovery Rate*), onde valores $< 0,005$ foram considerados significativos, estes valores foram calculados pelo programa DAVID 6.8.

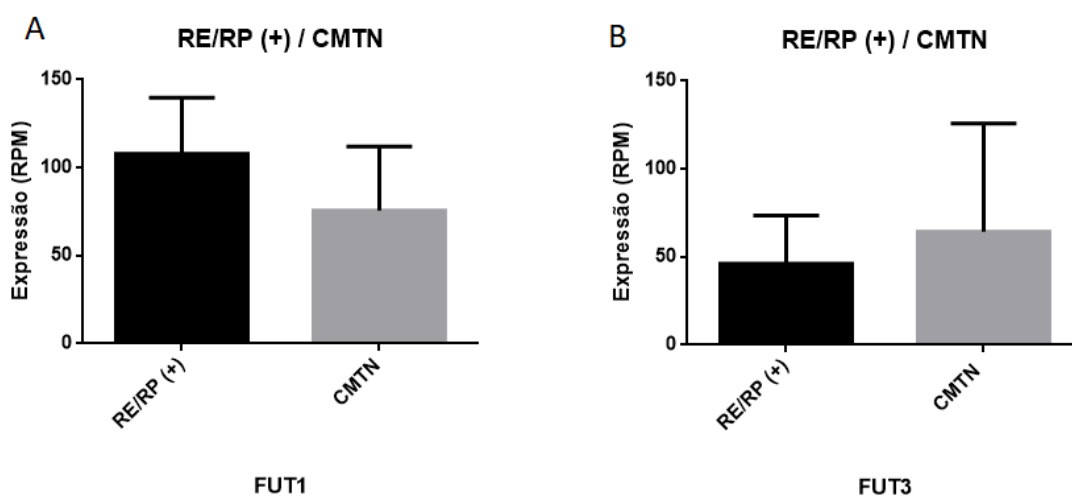
4 RESULTADOS

4.1 Expressão gênica das fucosiltransferases FUT1, FUT3 e FUT8 e do HIF1A no câncer de mama

Nossos estudos revelaram maior expressão de FUT1 em ductos mamários normais em relação a sua expressão em carcinomas ductais ($p < 0,0001$), ao passo que não foi verificada diferença na expressão de FUT3 e FUT8 entre os tecidos mencionados ($p = 0,2605$; $p = 0,8943$; respectivamente). Além disso, não foi observada diferença na expressão de FUT1, FUT3 e FUT8 entre graus histológicos do carcinoma ductal (1, 2 e 3) ($p = 0,9408$; $p = 0,2457$; $p = 0,4578$; respectivamente).

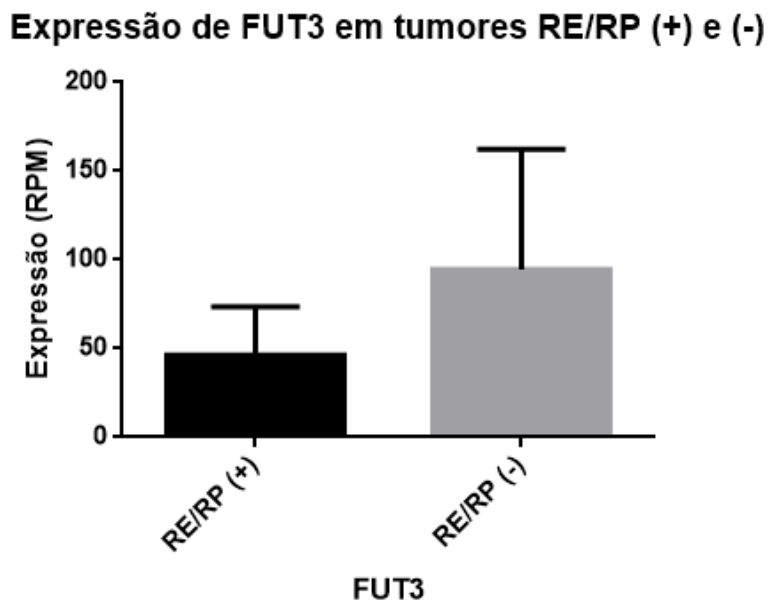
Existe um aumento na expressão de FUT3 no câncer de mama triplo negativo em relação a células RE/RP positivas (Fig.8), havendo em contrapartida, um aumento na expressão de FUT1 em RE/RP (+) em relação à CMTN (Fig.8). Não existe diferença significativa na expressão do gene FUT8 entre CMTN e células RE/RP (+). Existe um aumento na expressão de FUT3 em células RE/RP (-) em relação as RE/RP (+) (Fig.9), não havendo diferença estatística na expressão de FUT1 e FUT8 entre estas células. Já entre CMTN e células RE/RP (-) não houve diferença estatística entre a expressão de FUT1, FUT3 e FUT8.

Figura 8. Diferença na expressão de FUT1 e FUT3 em CMTN e RE/RP (+). **A** Há um aumento na expressão de FUT1 em RE/RP (+) em relação a CMTN ($p < 0,0001$). **B** Há um aumento na expressão de FUT3 em CMTN em relação a RE/RP (+) ($p = 0,0184$).



CMTN = Câncer de Mama Triplo Negativo; RE/RP (+) = Câncer de Mama Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona Positivo. RPM = *Reads per Million*.

Figura 9. Diferença na expressão de FUT3 em relação a expressão de RE/RP no câncer de mama. Há um aumento na expressão de FUT3 em câncer de mama RE/RP (-) em relação a câncer de mama RE/RP (+) ($p < 0,0001$).



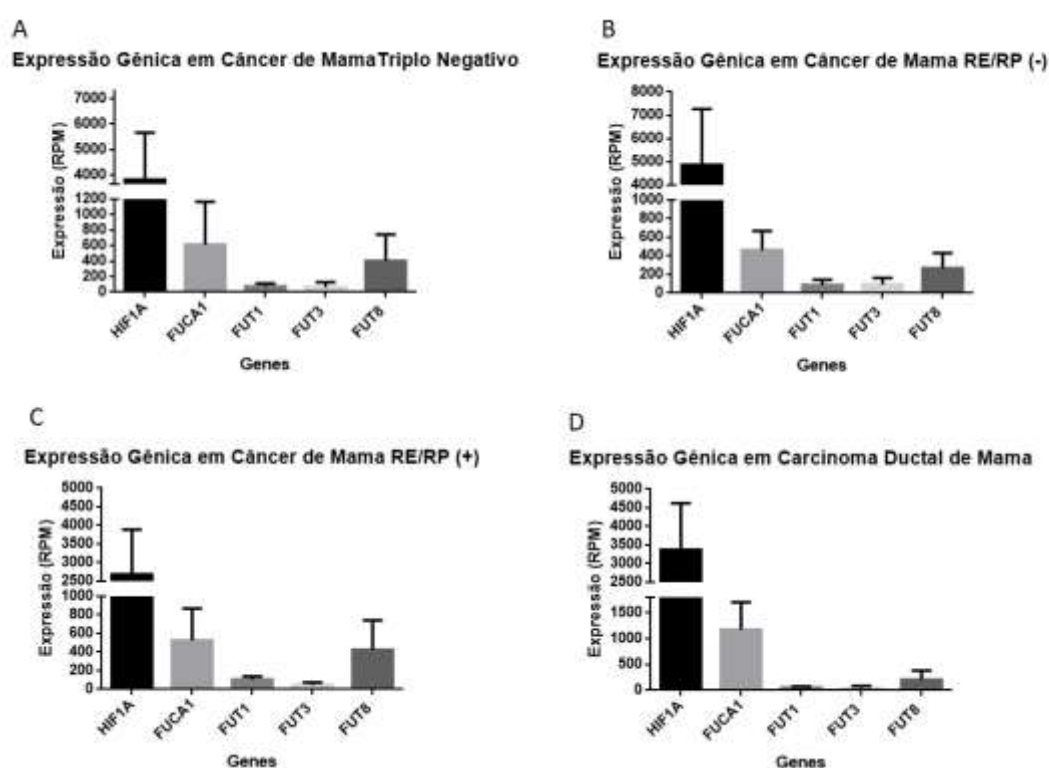
RE/RP (+) = Câncer de Mama Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona Positivo; RE/RP (-) = Câncer de Mama Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona Negativo. RPM = *Reads per Million*.

Comparando-se os níveis de expressão das fucosiltransferases, constata-se que existe um aumento significativo na expressão de FUT8 em relação a FUT1 e FUT3 nos fenótipos moleculares RE/RP (+) e (-) e no CMTN, bem como no carcinoma ductal de mama (Fig.10). Já os níveis de expressão de FUT1 e FUT3 encontram-se iguais em tumores triplo negativo, RE/RP (+), RE/RP (-), e no carcinoma ductal de mama (Fig.10).

A expressão do gene FUCA1 está aumentada em relação a expressão de FUT1, FUT3 e FUT8 no carcinoma ductal de mama (Fig. 10). Entretanto, a expressão de FUCA1 não é diferente de FUT8 no CMTN, nos tumores de mama RE/RP (-), ou ainda nos tumores de mama RE/RP (+) (Fig. 10). Em relação à FUT1 e FUT3, a expressão de FUCA1 está aumentada em todas as situações analisadas (Fig. 10).

Em relação à expressão dos genes das fucosiltransferases 1, 3 e 8, e da α -L-fucosidase 1, a expressão do gene HIF1A está significativamente aumentada no CMTN, CD, e nos tumores de mama RE/RP positivo e negativo (Fig. 10).

Figura 10. Expressão gênica de HIF1A e enzimas envolvidas no perfil de fucosilação em tumores de mama. **A** HIF1A encontra-se aumentada em relação a FUCA1, FUT1, FUT3 e FUT8 ($p < 0,0001$, para todas as comparações). FUCA1 encontra-se aumentada em relação a FUT1 ($p = 0,0003$), FUT3 ($p = 0,0002$), mas não FUT8 ($p = 0,4648$). Não houve diferença significativa em relação a expressão de FUT1 e FUT3 ($p = 0,9998$), FUT1 e FUT8 ($p = 0,0844$), FUT3 e FUT8 ($p = 0,0679$). **B** HIF1A encontra-se aumentada em relação a FUCA1, FUT1, FUT3 e FUT8 ($p < 0,0001$ para todas as comparações). FUCA1 encontra-se aumentada em relação a FUT1 ($p = 0,0088$) e FUT3 ($p = 0,0089$), mas não FUT8 ($p = 0,9893$). Não houve diferença significativa entre a expressão de FUT1 e FUT3 ($p = 0,9899$), mas houve entre FUT1 e FUT8 ($p = 0,0091$) e FUT3 e FUT8 ($p = 0,0093$). **C** HIF1A encontra-se aumentada em relação a FUCA1, FUT1, FUT3 e FUT8 ($p < 0,0001$ para todas as comparações). FUCA1 encontra-se aumentada em relação a FUT1 ($p = 0,0001$), FUT3 ($p < 0,0001$), mas não FUT8 ($p = 0,8380$). Não houve diferença significativa entre a expressão de FUT1 e FUT3 ($p = 0,9668$), mas houve entre FUT1 e FUT8 ($p = 0,0079$) e FUT3 e FUT8 ($p = 0,0007$). **D** HIF1A encontra-se aumentada em relação a FUCA1, FUT1, FUT3 e FUT8 ($p < 0,0001$ em todas as comparações). FUCA1 encontra-se aumentada em relação a FUT1, FUT3 e FUT8 ($p < 0,0001$ para todas as comparações). Não houve diferença significativa entre a expressão de FUT1 e FUT3 ($p = 0,9998$), FUT1 e FUT8 ($p = 0,0687$), mas houve entre FUT3 e FUT8 ($p = 0,0407$). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



RE/RP (+) = Câncer de Mama Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona Positivo; RE/RP (-) = Câncer de Mama Receptor de Estrógeno/Receptor de Progesterona Negativo. RPM = *Reads per Million*.

4.2 Predições dos miRNAs com potencial regulador das vias de fucosilação e hipóxia

Os resultados da predição de miRNAs são compostos por uma lista de miRNAs, organizados em ordem decrescente de grupos classificados pelo número de algoritmos que identificaram um dado miRNA como potencial regulador do gene alvo em questão. Com isso, a confiabilidade da predição é tanto maior para o primeiro grupo da lista, quanto menor para o último.

Dentre os 12 algoritmos utilizados para a predição dos miRNAs, foram selecionados os miRNAs com os 3 maiores números de combinações, resultando em o número mínimo de 7 e de máximo de 9 algoritmos considerados para a pré-seleção de miRNAs (Tab. 1).

Tabela 1. Número de miRNAs preditos e pré-selecionados através do número mínimo de algoritmos considerados por análise.

Gene	miRNAs preditos	Número mínimo de algoritmos considerados	Número de miRNAs pré-selecionados
FUCA1	269	7	9
FUT1	720	9	8
FUT3	366	7	16
FUT8	496	7	16
HIF1A	2177	8	10
TOTAL	4028	-	59

Foram obtidos 4028 miRNAs com potencial para regulação negativa dos genes alvo (HIF1A, FUCA1, FUT1, FUT3, FUT8), destes, 59 foram pré-selecionados a partir do número mínimo de algoritmos considerados capazes de prever o mesmo miRNA.

Os miRNAs pré-selecionados foram submetidos aos critérios de inclusão adotados neste estudo. Em seguida, foram selecionados 6 miRNAs potencialmente envolvidos com a regulação das vias de fucosilação no câncer de mama, relacionado à hipóxia (Tab. 2), o processo de seleção de miRNAs está resumido na figura 11.

Tabela 2. Genes alvos e respectivos miRNAs selecionados com seus valores de *Energy Threshold* para interação miRNA-RNA

Genes	miRNA	Energy Threshold (kcal/mol)
FUT1 / FUCA1	has-miR-181b-5p	-31,2* / -28,7**
FUT1	has-miR-181d-5p	-28,7
FUT1 / FUT8	hsa-miR-449a	-30,2*** / -29,4****
FUT8	hsa-miR-34a-5p	-27,6
HIF1A	hsa-miR-519b-3p	-26,3
FUT3	hsa-miR-519b-5p	-23,6

Valores de *Energy Threshold* abaixo de ≤ -20 Kcal/mol foram considerados significativos. **Energy Threshold* referente à FUT1. ***Energy Threshold* referente à FUCA1. ****Energy Threshold* referente à FUT1. *****Energy Threshold* referente à FUT8.

Figura 11. Processo de seleção de miRNAs com potencial para regulação de proteínas envolvidas nas vias de fucosilação e hipóxia no câncer de mama.



4.3 Estudo de vias reguladas por genes alvo de miRNAs

Tendo em vista os miRNAs preditos para regulação de proteínas importantes na via de fucosilação em neoplasias de mama, constata-se que: os miRNAs has-miR-181b-5p e o has-miR-181d-5p são candidatos para regulação negativa da expressão de FUT1 e FUCA1; os miRNAs hsa-miR-449a e hsa-miR-34a-5p são candidatos para regulação negativa da expressão de FUT1 e FUT8, respectivamente; e o hsa-miR-519b-5p é candidato para regulação negativa da expressão de FUT3, já o hsa-miR-519b-3p é candidato para regulação negativa da expressão de HIF1A, sugerindo que o processamento do hsa-miR-519b gere miRNAs capazes de inibir a expressão de FUT3 e HIF1A.

A avaliação do impacto causado pela expressão dos miRNAs: has-miR-181b-5p, has-miR-181d-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-519b-3p e hsa-miR-519b, via estudo de anotação funcional dos genes alvos dos respectivos miRNAs preditos e enriquecidos pelo miRWalk 2.0, demonstrou que cada um dos miRNAs em questão pode regular milhares de genes (Tab.3). Consequentemente a possibilidade de funções celulares e sistêmicas que estes miRNAs podem regular é diversificada.

Tabela 3. Quantidade de genes alvos preditos pelo programa miRWalk 2.0 para cada miRNA chave nas vias de fucosilação.

miRNA	Genes	Oncogenes	Genes Supressores de Tumor	Genes Translocados no Câncer
has-miR-181b-5p	7415	283	64	249
has-miR-181d-5p	1347	285	63	251
hsa-miR-449a	7947	328	79	291
hsa-miR-34a-5p	17243	330	76	293
hsa-miR-519b-3p	14920	302	66	270
hsa-miR-519b-5p	15699	308	71	270

A maioria dos genes alvos preditos para os miRNAs selecionados são potenciais reguladores, das vias de sinalização MAPK, HER2, TGF β , Wnt, p53 e Notch (Tab.5). Além disso, os genes alvos preditos para o hsa-miR-34a-5p estão envolvidos em interações com receptores de matriz extracelular (MEC) ($p = 0,004$), podendo também regular genes relacionados ao citoesqueleto de actina ($p = 0,001$). Os genes alvos preditos para o hsa-miR-449a, também estão envolvidos com vias de sinalização de neurotrofinas ($p = 0,005$), e interações com receptores de MEC ($p = 0,0033$), e genes relacionados com citoesqueleto de actina ($p = 0,0011$). Já os genes alvos preditos para o hsa-miR-519b-3p estão envolvidos, dentre outras vias, como as de controle de ciclo celular ($p = 0,0023$).

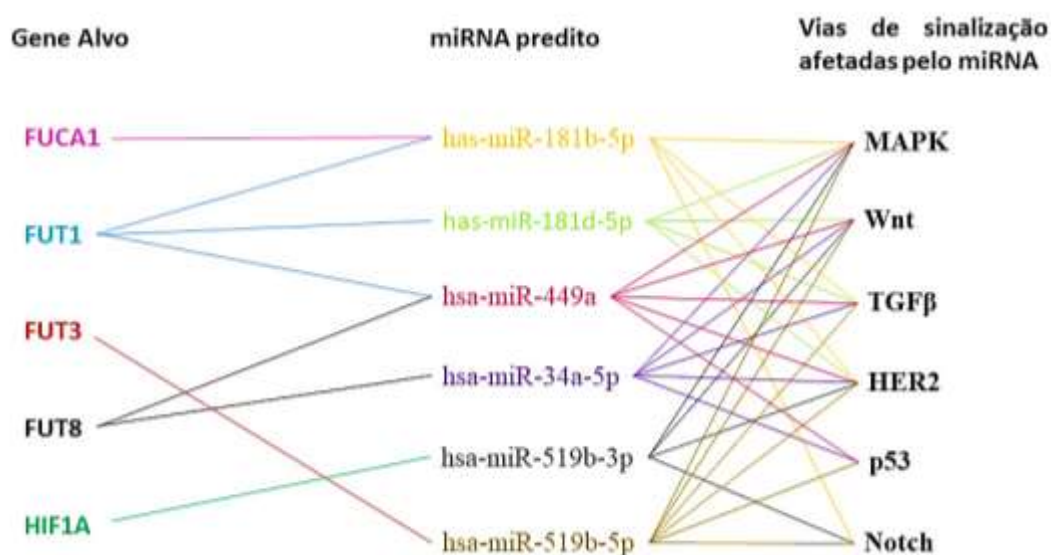
Tabela 4. Principais vias afetadas pelos potenciais genes alvos dos miRNAs chave nas vias de fucosilação

miRNA	MAPK (valor-p)	Wnt (valor-p)	TGF β (valor-p)	HER2 (valor-p)	p53 (valor-p)	Notch (valor-p)
has-miR-181b-5p	$5,70 \cdot 10^{-9}$	$9,34 \cdot 10^{-7}$	0,0037	$3,5 \cdot 10^{-5}$	-	<i>0,0541</i>
has-miR-181d-5p	0,0009	$1,9 \cdot 10^{-9}$	0,0054	0,0013	<i>0,0167</i>	<i>0,0202</i>
hsa-miR-34a-5p	$2,49 \cdot 10^{-9}$	$5,59 \cdot 10^{-9}$	0,0008	0,0025	0,0011	<i>0,0520</i>
hsa-miR-449a	0,0001	0,0002	0,0001	0,0023	$8,29 \cdot 10^{-9}$	<i>0,0520</i>
hsa-miR-519b-3p	0,0001	$1,33 \cdot 10^{-8}$	0,0043	0,0027	<i>0,0118</i>	0,0004
hsa-miR-519b-5p	0,0006	0,0001	0,0009	0,0005	0,0013	$3,42 \cdot 10^{-9}$

Todos os valores de p foram obtidos através do Teste Exato de Fisher, calculados automaticamente pelo programa miRWalk 2.0, e os valores de $p < 0,005$ foram considerados significativos. Os valores de $p > 0,005$ estão destacados em itálico e negrito. O has-miR-181b-5p não retornou dados quanto a via de sinalização da p53.

Em resumo, o gene hsa-miR-181b-5p é um candidato para a regulação negativa de FUCA1 e FUT1, estando esse miRNA associado às vias MAPK, Wnt, TGF β e HER2. Já o hsa-miR-181d-5p é um potencial candidato à regulação negativa de FUT1, estando relacionado às mesmas vias do hsa-miR-181b-5p. O hsa-miR-449a é um candidato à regulação negativa de FUT1 e FUT8, estando associado às principais vias descritas na Tabela 5, exceto a via Notch. O hsa-miR-34a-5p é um candidato à regulação negativa de FUT8, estando associado às mesmas vias do hsa-miR-449a. Já o hsa-miR-519b-3p é um candidato à regulação negativa de HIF1A, estando associado às principais vias descritas na Tabela 5, exceto a via de controle do ciclo celular dependente de p53. Por fim, o hsa-miR-519b-5p é um candidato à regulação negativa de FUT3, estando este miRNA associado à todas as vias de sinalização celular descritas na tabela 4. As principais relações entre os genes alvo deste estudo, miRNAs preditos e vias de sinalização a eles relacionadas estão representadas na Figura 12.

Figura 12. Rede de interação entre gene, miRNAs e vias de sinalização potencialmente envolvidas no perfil de fucosilação em tumores de mama. Cada linha do esquema indica uma predição de interação entre gene e miRNA ou miRNA e via de sinalização celular. As cores das linhas combinam com as cores dos genes ou dos miRNAs, indicando a relação de predição entre cada variável do estudo.



5 DISCUSSÃO

As fucosiltransferases têm despertado a atenção devido ao seu potencial regulador (positivo ou negativo) em vários tipos de câncer. A influência de miRNAs na exacerbação ou silenciamento de vias metabólicas envolvidas no desenvolvimento de fenótipos agressivos em cânceres humanos tem sido uma verdade crescente na oncologia, influenciando, além do diagnóstico, a terapêutica de escolha existente e o design de novas drogas alvo-específicas. A superexpressão da proteína HIF-1 α tem revelado estar associada à aquisição de vantagens adaptativas às células neoplásicas, inclusive influenciando no perfil de fucosilação celular (BELO *et al.*, 2015), portanto o entendimento da regulação da expressão gênica de proteínas relacionadas às vias de fucosilação e hipóxia, via miRNA, demonstra ser uma possibilidade para o desenvolvimento de estratégias no combate ao câncer.

No tocante à expressão de HIF1A, principal gene associado à regulação da expressão gênica em condições de hipóxia (MINET *et al.* 1999; SCHOFIELD, RATCLIFFE, 2004), nossos resultados revelam que este encontra-se significativamente elevado em relação às fucosiltransferases e à α -L-fucosidade 1 em todos os grupos analisados. A superexpressão de HIF1A no câncer de mama é coerente com sua função no desenvolvimento tumoral, pois ele é um importante promotor do crescimento celular e metástases, e o aumento de sua expressão está associada a um prognóstico reservado no câncer de mama, incluindo resistência à quimioterapia e radioterapia (SEMENZA, 2016, WANG *et al.*, 2014). Além disso, a diminuição dos níveis de HIF-1 α aumentam a taxa de sobrevida de pacientes com câncer de mama (CAMPBELL *et al.*, 2019; VLEUGEL *et al.*, 2005; VOLINIA *et al.*, 2012). Também já foi relatado que a superexpressão de HIF1A suprime a expressão das α -1,2-fucosiltransferases em câncer de pâncreas, atuando na regulação do perfil de fucosilação na superfície celular (BELO *et al.*, 2015).

Em relação ao perfil de expressão de FUT3, nossos resultados demonstram que este gene se encontra menos expresso no câncer de mama RE/RP (+) do que em RE/RP (-) e CMTN, sugerindo uma associação entre a expressão de FUT3 e a expressão de receptores de estrógeno e de progesterona. O aumento na expressão de FUT3 em linhagens celulares de CMTN em relação a amostras RE/RP (+) já foi descrito na literatura (JULIEN *et al.*, 2011). A expressão elevada de FUT3 em tumores RE (-) está diretamente correlacionado com a expressão do antígeno sLe^x (JULIEN *et al.*, 2011), associado a processos de adesão celular e invasão vascular. Além disso foi relatado que FUT3 pode predizer metástases distantes em

câncer de mama RE (-) (WANG *et al.*, 2005) e foi descrita como superexpressa em uma variante de CMTN colonizadora de osso (CARCEL-TRULLOLS *et al.*, 2006).

Os resultados deste trabalho revelaram que a expressão de FUCA1 está elevada em relação à FUT1 e FUT3 no carcinoma ductal de mama e em todos os subtipos moleculares analisados, porém a expressão de FUCA1 é maior que FUT8 apenas no carcinoma ductal de mama. Já foi constatado que no câncer de mama triplo negativo, o RNAm de FUCA1 é mais expresso em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral do que em estágios mais avançados, enquanto a proteína α -L-fucosidade 1 é superexpressa em estágios mais avançados do câncer de mama e menos expressa em estágios iniciais (CHENG *et al.*, 2015).

Nossos resultados demonstraram que a expressão de FUT8 é maior que a de FUT1 e FUT3 no CMTN, RE/RP (+), RE/RP (-), bem como no CD. O gene FUT8 já foi descrito como superexpresso no câncer de mama, estando associado à metástase, e diretamente correlacionado a estágios avançados do desenvolvimento tumoral (YUE *et al.* 2016). Estudos demonstram que a expressão de FUT8 está correlacionada com a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em câncer de mama ductal invasivo (ANDRES, WITTLIFF, 2012), bem como é responsável por aumentar a mobilidade celular através da ativação da via AKT em células de câncer de mama (GUO *et al.*, 2018). A supressão de FUT8 diminui as taxas de migração, invasão e adesão celular em linhagens tumorais de mama, bem como diminuiu a fucosilação de E-caderinas e o acúmulo de β -cateninas (LIU *et al.*, 2019). Não há muitos trabalhos que avaliem o impacto clínico da expressão de FUT8 sobre o câncer de mama, contudo, no câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas, e carcinoma hepatocelular, ele está frequentemente associado a um prognóstico reservado (OKAGAWA *et al.* 2016; NODA *et al.*, 2018; HONMA *et al.*, 2015).

Uma hipótese que sustenta a expressão elevada de FUCA1 e FUT8 é a atividade catalítica única de cada uma dessas enzimas. A α -L-fucosidade 1 é a única enzima intracelular responsável pela remoção de resíduos de fucose de glicanos fucosilados (TSUCHIDA *et al.*, 2017), enquanto há 13 fucosiltransferases com a capacidade de adicionar resíduos de fucose à glicanos (BLANAS *et al.*, 2018). Portanto, para que se mantenha um equilíbrio no perfil de fucosilação celular, presume-se que a expressão de FUCA1 supere individualmente a expressão de cada fucosiltransferase, como foi observado em nossos resultados. Neste estudo, a única fucosiltransferase que individualmente não teve expressão inferior à FUCA1 foi FUT8, no CMTN e nos RE/RP (+) e (-). Uma explicação possível para este resultado reside no fato deste gene codificar a única enzima com atividade α -1,6 fucosiltransferase (WANG *et*

al., 2014), portanto é sugestivo que uma baixa expressão de FUT8 provoque uma diminuição na síntese de seu produto, consequentemente uma expressão de FUT8 acima da média das outras fucosiltransferases (que possuem atividades redundantes entre si) pode ser requerida para que não haja deficiência na síntese de glicanos α -1,6 fucosilados.

Uma das possíveis explicações para o aumento de FUCA1 e FUT8 pode estar na expressão da proteína p53 mutada. No câncer de tireoide foi relatada uma correlação inversa na expressão de FUCA1 e FUT8 em pelo menos 2 tipos histológicos diferentes, estando FUT8 superexpresso no câncer anaplásico da tireoide com p53 mutado (ts-p53A138V), e FUCA1 mais expresso em câncer papilar de tireoide sem mutações em p53, com característica de menor agressividade quando comparado ao câncer anaplásico de tireoide, contudo não foi observada correlação entre FUCA1 e outras FUTs como FUT1, FUT3, FUT4 e FUT6 (TSUCHIDA *et al.*, 2017). No mesmo estudo, foi constatado que a expressão de FUCA1 está associada ao *status* do fator de transcrição p53, nos dois tipos histológicos de câncer de tireoide analisados (TSUCHIDA *et al.*, 2017). Outros estudos demonstram que FUT8 também é regulado pelo p53, tanto no câncer colorretal, como no carcinoma hepatocelular (OKAGAWA *et al.* 2016; NODA *et al.*, 2018).

No tocante à predição de miRNAs, é preciso considerar que as ferramentas de bioinformática disponíveis para estes estudos são constituídas por algoritmos baseados em características de interação RNAm-miRNA, como a abundância de sítios de ligação, a conservação dos sítios de ligação, a estabilidade do pareamento das seeds, dentre outros parâmetros que podem variar entre programas, contudo, todas estas ferramentas buscam características e informações associadas aos miRNAs em bancos de dados, gerando uma quantidade massiva de miRNAs capazes de interagir com o gene alvo de interesse, desta forma, um único gene pode gerar centenas ou milhares de predições de miRNAs (MAZIERE *et al.*, 2007; THOMAS *et al.*, 2010; YUE *et al.*, 2009; WITKOS *et al.*, 2011). Neste trabalho, os genes alvos encontram-se diferencialmente expressos em neoplasias mamárias (MUNKLEY *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2010; DUBE *et al.*, 2005).

Este estudo revelou um total de 4028 miRNAs com potencial para regular a expressão de enzimas responsáveis pelo perfil de expressão de glicanos fucosilados, dentre os quais, foram selecionados 6, de acordo com os critérios de inclusão descritos na metodologia deste trabalho. Os miRNAs selecionados foram: hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181d-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-519b-3p e hsa-miR-519b-5p. Identificamos que os referidos miRNAs podem regular genes envolvidos, principalmente, com as vias MAPK, Wnt, TGF β , HER2, p53 (exceto has-miR-181b-5p), e Notch (apenas has-miR-181d-5p, hsa-miR-519b-3p

e hsa-miR-519b-5p). As vias reguladas pelos miRNAs selecionados participam ativamente de processos relacionados à carcinogênese e progressão tumoral, inclusive no câncer de mama (YIN *et al.*, 2018; PENG *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2018; BRANDÃO *et al.*, 2018).

Nossos resultados mostram que todos os miRNAs preditos tem potencial para regular a via de sinalização MAPK. A ativação da via de sinalização MAPK/ERK, no câncer de mama, promove a fosforilação de receptores de estrógeno favorecendo o crescimento tumoral (BUNONE *et al.*, 1996; PENG *et al.*, 2017). Foi constatado que a IL32 secretada pelo câncer associado a fibroblastos promove invasão e metástase de células tumorais de mama, via sinalização de integrina β 3-p38 MAPK (WEN *et al.*, 2019). No carcinoma ductal invasivo de mama, a inibição da fucosilação reduziu a expressão de E-selectinas e a proliferação celular, bem como a ativação de MAPK, ERK1/2 e p38 (CARRASCAL *et al.*, 2018).

De acordo com nossos resultados, os miRNAs hsa-miR-34a-5p e hsa-miR-449a tem potencial para regular a via de sinalização Wnt e a expressão de FUT8. A via de sinalização iniciada pelo grupo de glicoproteínas Wnt pode dar início à via de sinalização dependente e independente de β -cateninas, esta via está envolvida com processos de regeneração de células tronco e organogênese, além de estar envolvida com a carcinogênese e progressão tumoral no câncer de mama (YIN *et al.*, 2018; KRISHNAMURTHY, KURZROCK, 2018). Estudos relatam uma interação entre esta via e a de sinalização Notch, em células tronco tumorais de mama, favorecendo a formação de nicho macrofágico e resistência à quimioterapia (CHAKRABARTI *et al.*, 2018; BRAUNE *et al.*, 2018). Foi demonstrado que o aumento na expressão de FUT8, aumenta o perfil de α 1,6-fucosilação através da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina, induzindo o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT – do inglês *Epithelial–Mesenchymal Transition*) e desdiferenciação de células tumorais de mama (YANG *et al.*, 2017).

Os miRNAs hsa-miR-34a-5p e hsa-miR-449a, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, têm potencial para regular a expressão de FUT8 e a via de sinalização TGF- β . Foi descrito que o miR-34a induz apoptose em células de câncer de mama, bem como diminui as taxas migração e invasão nessas células (HAGHI *et al.*, 2019), assim como o hsa-miR-449a pode induzir apoptose em carcinoma hepatocelular (BUURMAN *et al.*, 2012). A citocina TGF β , também está associada à apoptose em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral (ZHAO *et al.*, 2018). Além disso, foi descrito um mecanismo de retroalimentação positiva na fucosilação do receptor de TGF β , mediado por FUT8, que promove a sinalização de TGF- β e o processo de EMT, estimulando a invasão e metástase de células de câncer de mama (TU *et al.*, 2017). Portanto, observamos associações indiretas, com base no que foi descrito na

literatura, que sustentam uma possível interação entre o hsa-miR-34a-5p, a via de sinalização TGF β e a expressão de FUT8. Quanto ao hsa-miR-449a, não há estudos que o associem à via de sinalização TGF β ou expressão de FUT8.

Nossos resultados revelaram que o miRNA hsa-miR-519b-5p tem potencial para regular a via de sinalização dependente de HER2 e o gene FUT3. HER2 é um fator de crescimento epitelial que confere agressividade a carcinomas mamários, é também um importante marcador tumoral e alvo terapêutico no câncer de mama (BRANDÃO *et al.*, 2018; HARBECK, GNANT, 2017). Foi relatado que no carcinoma ductal invasivo de mama FUT3 não está expresso, especialmente em amostras HER2 negativas (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Em células de câncer gástrico com superexpressão de HER2 foi observado uma alta expressão de FUT3, associada à síntese de antígenos de sL^a e uma baixa expressão de FUT8 (DUARTE *et al.*, 2017).

De acordo com os nossos resultados de predição de miRNAs, o has-miR-181b-5p tem potencial para regular FUCA1, mas não TP53, já os miRNAs hsa-miR-34a-5p e hsa-miR-449a tem potencial para regular tanto FUT8 quanto as vias dependentes de p53. O gene TP53 é um supressor de tumor que codifica a proteína p53, que atua como fator de transcrição sobre genes pró-apoptóticos durante a divisão celular (DUFFY *et al.*, 2018). O gene TP53 é mais frequentemente mutado no câncer de mama invasivo, e sua baixa expressão, bem como mutações, favorece a carcinogênese, inclusive no câncer de mama (DUFFY *et al.*, 2018; KAUR *et al.*, 2018). Foi relatado que a expressão de FUT8 está relacionada com a expressão da proteína p53 nos estágios II e III do câncer colorretal, representando um prognóstico reservado (NODA *et al.*, 2018). FUCA1 foi descrito como um alvo da p53, e foi demonstrado que FUCA1 atua como um supressor de tumor e a sua baixa expressão foi associada a um prognóstico reservado em diversas linhagens tumorais, como glioblastoma, osteossarcoma e câncer de pulmão (EZAWA *et al.*, 2016).

Dentre os miRNAs selecionados neste trabalho, apenas o hsa-miR519b-3p e o hsa-miR-519b-5p não estão potencialmente envolvidos com a via de sinalização Notch. Esta via é regulada pela hipóxia e por citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e leptina) e tem papel no desenvolvimento de tumores de mama, devido a sua participação em processos de proliferação e diferenciação celular, bem como na apoptose (REEDIJK, 2012; KONTOMANOLIS *et al.*, 2018). A via de sinalização Notch também regula a angiogênese por diversos mecanismos, inclusive regulando os receptores de VEGF (DUFRAINE *et al.*, 2008). As células que superexpressam HER2 tem a via de sinalização Notch ativada, enquanto a inibição da ativação da via Notch regula negativamente a expressão de HER2

(MAGNÍFICO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 1997; KANTOMANOLIS *et al.*, 2018). Associado ao HIF1A, a via de sinalização Notch induz a EMT no câncer de mama, este processo é importante para a desdiferenciação celular, conferindo maior malignidade ao tumor (DE FRANCESCO *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos neste trabalho nos fazem levantar a hipótese de que a influência dos miRNA selecionados sobre as vias de sinalização celular aqui descritas, estaria associada à regulação negativa que estes miRNAs desempenham sobre FUT1, FUT3, FUT8, FUCA1 e HIF1A, uma vez que as vias descritas neste trabalho estão associadas à expressão destes genes, como foi demonstrado no decorrer desta discussão. Com isso, abre-se um horizonte de novas investigações acerca do comportamento de vias de sinalização celular, frente ao perfil de expressão de enzimas relacionadas à síntese e degradação de glicanos fucosilados, suscitando novas perspectivas para compreensão do desenvolvimento tumoral e para a busca de novos biomarcadores e terapias alvo-molecular inovadoras.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados de expressão obtidos, podemos inferir que o perfil de expressão elevado e a exclusividade catalítica de FUT8, bem como perfil de expressão elevado de FUCA1, em diversos tipos de câncer de mama, faz desses genes excelentes candidatos à biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos no câncer de mama, destacando-se entre as demais enzimas envolvidas nas vias de fucosilação.

Os 6 miRNAs selecionados como potenciais reguladores das proteínas envolvidas nos processos de fucosilação e hipóxia, também são potencialmente capazes de regular genes relacionados a vias chaves para o desenvolvimento e progressão tumoral, associados a características de agressividade e malignidade. Isto implica que os miRNAs selecionados, assim como seus genes alvos preditos, são potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos para o câncer de mama.

Mediante as conclusões aqui apresentadas, ficam como perspectivas para trabalhos futuros a validação experimental da interação entre os miRNAs selecionados e os genes alvos deste estudo (FUCA1, FUT1, FUT3, FUT8 e HIF1A), e posteriormente a pesquisa pelo impacto dessas interações sobre os aspectos clínicos e biológicos do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL P, FONTANALS-CIRERA B, SOKOLOVA E, JACOB S, VAIANA CA, ARGIBAY D, HERNANDO E. 2017. A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis. **Cancer Cell**. v.31, n.6, p.804–819, 2017.
- ALBUQUERQUE APB, BALMAÑA M, MEREITER S, PINTO F, REIS CA, BELTRÃO EIC. Hypoxia and serum deprivation induces glycan alterations in triple negative breast cancer cells. **Biol Chem**. v.399, n.7, p.661-672, 2018.
- ALBUQUERQUE APB, SILVA AL, LIMA CA, BELTRÃO EIC. FUT3 expression in human breast cancer cells under hypoxia and serum deprivation. **Exp Oncol**. v.41, n.4, p.318-322, 2019.
- ANDRES SA, WITTLIFF JL. Co-expression of genes with estrogen receptor- α and progesterone receptor in human breast carcinoma tissue. **Horm Mol Biol Clin Investig**. v.12, n.1, p.377-390.
- ASCIERTO PA, KIRKWOOD JM, GROB JJ, SIMEONE E, GRIMALDI AM, MAIO M, PALMIERI G, TESTORI A, MARINCOLA FM, MOZZILLO N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **J Transl Med**. v.10, n.85, p. 1-9, 2012.
- ASTER C, PEAR WS, BLACKLOW SC. The Varied Roles of Notch in Cancer. **Annu Rev Pathol**. v.12, p. 245–275, 2017.
- ATCC. American Type Culture Collection. Disponível em: < <https://www.atcc.org/en.aspx> >. Acesso em: jan. de 2019.
- BARTEL, DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**. v.116, p. 281–297, 2004.
- BARTHEL SR, WIESE GK, CHO J, OPPERMAN MJ, HAYS DL, SIDDIQUI J, PIENTA KJ, FURIE B, DIMITROFF CJ. Alpha 1,3 fucosyltransferases are master regulators of prostate cancer cell trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 106, n. 46, p. 19491-19496, 2009
- BELO AL, VAN VLIET SJ, MAUS A, LAAN LC, NAUTA TD, KOOLWIJK P, TEFSSEN B, VAN DIE I. Hypoxia inducible factor 1 α down regulates cell surface expression of α 1,2-fucosylated glycans in human pancreatic adenocarcinoma cells. **FEBS letters**. v. 589, n.18, p. 2359-2366, 2015.
- BAYSAL BE, FERRELL RE, WILLETT-BROZICK JE, LAWRENCE EC, MYSSIOREK D, BOSCH A, VAN DER MEY A, TASCHNER PE, RUBINSTEIN WS, MYERS EN, RICHARD CW, CORNELISSE CJ, DEVILEE P, DEVLIN B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. **Scienc**. v.287, p.848-851, 2000.

BERNARDI C1, SOFFIENTINI U, PIACENTE F, TONETTI MG. Effects of microRNAs on fucosyltransferase 8 (FUT8) expression in hepatocarcinoma cells. **PLoS One**. v.8, n.10, 2013.

BLANAS A; SAHASRABUDHE N; RODRIGUEZ E; KOOYK YV, VLIET SV. Fucosylated Antigens in Cancer: An Alliance toward Tumor Progression, Metastasis, and Resistance to Chemotherapy. **Front. Oncol**. v.8, n.39, p.01-14, fev, 2018.

BONIN S, PARASCANDOLO A, AVERSA C, BARBAZZA R, TSUCHIDA N, CASTELLONE MD, STANTA G, VECCHIO G. Reduced expression of α -L-Fucosidase-1 (FUCA-1) predicts recurrence and shorter cancer specific survival in luminal B LN+ breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 9, n.20, p. 15228-15238, 2018.

BRANDÃO M, PONDÉ NF, POGGIO F, KOTECKI N, SALIS M, LAMBERTINI M, DE AZAMBUJA E. Combination therapies for the treatment of HER2-positive breast cancer: current and future prospects. **Expert Rev Anticancer Ther**. v.18, n.7, p.629-649, 2018.

BRAUNE EB, SESHIRE A, LENDAHL U. Notch and Wnt Dysregulation and Its Relevance for Breast Cancer and Tumor Initiation. **Biomedicines**. v.6, n.4, p. 101, 2018.

BREIMAN A, ROBLES LMD, TRÉCESSON SC, ECHASSERIEAU K., BERNARDEAU K., DRICKAMER K, INBERTY A, BARILLÉ-NION S, ALTARE F, PENDU, JL. Carcinoma-associated fucosylated antigens are markers of the epithelial state and can contribute to cell adhesion through CLEC17A. *Oncotarget*. v.7, n.12, p.14064-14082, 2016.

BUNONE G, BRIAND PA, MIKSICEK RJ, PICARD D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. **EMBO J**.v.15, p.2174–2183, 1996.

BURGESS AW, CHO HS, EIGENBROT C, FERGUSON KM, GARRETT TP, LEAHY DJ, LEMMON MA, SLIWKOWSKI MX, WARD CW, YOKOYAMA S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. **Mol Cell**. v.12, n.3, p.541-552, 2003.

BURROWS N, BABUR M, RESCH J, WILLIAMS KJ, BRABANT G. Hypoxia-inducible factor in thyroid carcinoma. **J Thyroid Res**. v.2011, n. 762905, p. 1-17, 2011.

BUURMAN R, GÜRLEVIK E, SCHÄFFER V, EILERS M, SANDBOTHE M, KREIPE H, WILKENS L, SCHLEGELBERGER B, KÜHNEL F, SKAWRAN B. Histone deacetylases activate hepatocyte growth factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells. **Gastroenterology**. v.143, n.3, p.811-820, 2012.

CAI YJ, ZHENG XF, LU CH, JIANG Q, LIU Q, XIN YH. Effect of FUT3 gene silencing with miRNA on proliferation, invasion and migration abilities of human KATO-III gastric cancer cell line. **Cellular and Molecular Biology**. v. 62, n. 7, p. 15-20, 2016.

CAMPBELL EJ, DACHS GU, MORRIN HR, DAVEY VC, ROBINSON BA, VISSERS MCM. Activation of the hypoxia pathway in breast cancer tissue and patient survival are inversely associated with tumor ascorbate levels. **BMC Cancer**. v.19, p.307, 2019.

CANTWELL-DORRIS ER, O'LEARY JJ, SHEILS OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. **Mol Cancer Ther**. v.10, p.385-394, 2011.

CARCEL-TRULLOLS J, STANLEY JS, SAHA R, SHAAF S, BENDRE MS, MONZAVI-KARBASSI B, SUVA LJ, KIEBER-EMMONS T. Characterization of the glycosylation profile of the human breast cancer cell line, MDA-231, and a bone colonizing variant. **Int J Oncol**. v.28, n.5, p.1173–1183, 2006.

CARRASCAL MA, SILVA M, RAMALHO JS, PEN C, MARTINS M, PASCOAL C, AMARAL C, SERRANO I, OLIVEIRA MJ, SACKSTEIN R, VIDEIRA PA. Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation, and ERK1/2 and p38 MAPK activation. **Mol Oncol**. v.12, n.5, p.579-593, 2018.

CHAKRABARTI R., CELIA-TERRASSA T., KUMAR S., HANG X., WEI Y., CHOUDHURY A., HWANG J., PENG J., NIXON B., GRADY J.J., *et al*. Notch ligand Dll1 mediates cross-talk between mammary stem cells and the macrophageal niche. **Science**. v.153, 2018.

CHAPPELL WH, STEELMAN LS, LONG JM, KEMPF RC, ABRAMS SL, FRANKLIN RA, BÄSECKE J, STIVALA F, DONIA M, FAGONE P, MALAPONTE G, MAZZARINO MC, NICOLETTI F, LIBRA M, MAKSIMOVIC-IVANIC D, MIJATOVIC S, MONTALTO G, CERVELLO M, LAIDLER P, MILELLA M, TAFURI A, BONATI A, EVANGELISTI C, COCCO L, MARTELLI AM, MCCUBREY JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. **Oncotarget**. v. 2, n.3, p.135-164, 2001.

CHAVEZ KJ, GARIMELLA SV, LIPKOWITZ S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Breast Dis**. v.32, n.1-2, p. 35–48, 2010.

CHEN CY, JAN YH, JUAN YH, YANG CJ, HUANG MS, YU CJ, YANG PC, HSIAO M, HSU TL, WONG CH. Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.110, n.2, p. 630–635, 2013.

CHEN Y, ZHANG B, BAO L, JIN L, YANG M, PENG Y, KUMAR A, WANG JE, WANG C, ZOU X, XING C, WANG Y, LUO W. ZMYND8 acetylation mediates HIF-dependent breast cancer progression and metastasis. **J Clin Invest**. v.128, n.5, p.1937-1955, 2018.

CHEN Y., FISCHER W. H., GILL G. N. Regulation of the ERBB-2 promoter by RBPJ κ and NOTCH. **The Journal of Biological Chemistry**. v.272, n.22, p.14110–14114, 1997.

CHENG TC, TU SH, CHEN LC, CHEN MY, CHEN WY, LIN YK, HO CT, LIN SY, WU CH, HO YS. 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.21283-30000, 2015.

CRUZEIRO GAV, REIS MB, SILVEIRA VS, LIRA RCP, CARLOTTI CGJ, NEDER L, OLIVEIRA RS, YUNES JA, BRANDALISE SR, AGUIAR S, ETEROVIC AK, TONE LG, SCRIDELI CA, VALERA ET. HIF1A is Overexpressed in Medulloblastoma and its Inhibition Reduces Proliferation and Increases EPAS1 and ATG16L1 Methylation. **Curr Cancer Drug Targets**. v.18, n.3, p.287-294, 2018.

CSEH B, DOMA E, BACCARINI M. “RAF” neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. **FEBS Lett**. v.588, p.2398-2406, 2014.

DE FRANCESCO EM, MAGGIOLINI M, MUSTI AM. Crosstalk between Notch, HIF-1 α and GPER in Breast Cancer EMT. **Int J Mol Sci**. v.19, n.7, 2018.

DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY CA JR, BUTEL JS, BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**. v.356, n.6366, p.215-221, 1992.

DUARTE HO, BALMAÑA M, MEREITER S, OSÓRIO H, GOMES J, REIS CA. Gastric Cancer Cell Glycosylation as a Modulator of the ErbB2 Oncogenic Receptor. **Int J Mol Sci**. v.18, n.11, p.01-19, 2017.

DUBE DH., BERTOZZI CR. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics, *Nat. Rev. Drug Discov*. v.4, p.477–488, 2005.

DUFFY MJ, SYNNOTT NC, CROWN J. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. **Breast Cancer Res Treat**. v.170, n.2, p.213-219, 2018.

DUFRAINE J., FUNAHASHI Y., KITAJEWSKI J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. **Oncogene**.v.27, n.38, p.5132–5137, 2008.

EIBERG, H; MOHR, J; NIELSEN, LS. Linkage of plasma α -L-fucosidase (FUCA2) and the plasminogen (PLG) system. **Clin Genet**. v.26, p.23-29,1984.

EZAWA I, SAWAI Y, KAWASE T, OKABE A, TSUTSUMI S, ICHIKAWA H, KOBAYASHI Y, TASHIRO F, NAMIKI H, KONDO T, SEMBA K, ABURATANI H, TAYA Y, NAKAGAMA H, OHKI R. Novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. **Cancer Sci**. v.107, n.6, p.734-745, 2016.

FARHAT, GN, WALKER R, BUIST DSM, ONEGA T, KERLIKOWSKE K. Changes in Invasive Breast Cancer and Ductal Carcinoma In Situ Rates in Relation to the Decline in Hormone Therapy Use. **J Clin Oncol**.v.28, n.35, p. 5140–5146, 2010.

FENG, XH, DERYNCK, R. Specificity and versatility in tgfbeta signaling through Smads. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**. v.21, p. 659–693, 2005.

FRIEDMAN RC, FARH KK, BURGE CB, BARTEL DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res.** v.19, n.1, p.92-105, 2009.

GERALD D, BERRA E, FRAPART YM, CHAN DA, GIACCIA AJ, MANSUY D, POUYSSÉGUR J, YANIV M, MECHTA-GRIGORIOU F. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. **Cell.** v.118. p.781-794, 2004.

GILKES DM, SEMENZA GL, WIRTZ D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. **Nat Rev Cancer.** v.14, n.6, p.430-439, 2014.

GREIJER, AE, VAN DER GROEP P, KEMMING D, SHVARTS A, SEMENZA GL, MEIJER GA, VAN DE WIEL MA, BELIEN JA, VAN DIEST PJ, VAN DER WALL E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor1 (HIF-1). **The Journal of pathology**, v.206, n.3, p.291–304, 2005.

GUO D, GUO J, LI X, GUAN F. Enhanced motility and proliferation by miR-10b/FUT8/p-AKT axis in breast cancer cells. **Oncol Lett.** v. 16, n.2, p.2097-2104, 2018.

GUZY RD, HOYOS B, ROBIN E, CHEN H, LIU L, MANSFIELD KD, SIMON MC, HAMMERLING U, SCHUMACKER PT. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. **Cell Metab.** v. 1, p.401-408, 2005.

HARBECK N, GNANT M. Breast cancer. **Lancet.** v.389, n.10074, p.1134-1150, 2017.

HOGENESCH JB, CHAN WK, JACKIW VH, BROWN RC, GU YZ, PRAY-GRANT M, PERDEW GH, BRADFIELD CA. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry.** v.272, n.13, p. 8581–8593, 1997.

HONMA R, KINOSHITA I, MIYOSHI E, TOMARU U, MATSUNO Y, SHIMIZU Y, TAKEUCHI S, KOBAYASHI Y, KAGA K, TANIGUCHI N, DOSAKA-AKITA H. Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. **Oncology.** v. 88, n.5, p.298-308, 2015.

HUTVAGNER G, MCLACHLAN J, PASQUINELLI AE, BÁLINT E, TUSCHL T, ZAMORE PD. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science.** v.293, p.834–838, 2001.

IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, CAMPIGLIO M, MÉNARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res.** v.65, n.16, p.7065-7070, 2018.

JOHNSON SW, ALHADEFF JA. Mammalian alpha-l-fucosidases. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 99, p. 479–488, 1991.

JONES RB, DORSETT KA, HJELMELAND AB, BELLIS SL. The ST6Gal-I sialyltransferase protects tumor cells against hypoxia by enhancing HIF-1 α signaling. **J Biol Chem.** v. 293, n.15, p.5659-5667, 2018.

JOSEPH JP, HARISHANKAR MK, PILLAI AA, DEVI A. Hypoxia induced EMT: A review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC. **Oral Oncol.** v.80, p.23-32, 2018.

JULIEN S, IVETIC A, GRIGORIADIS A, QIZE D, BURFORD B, SPROVIERO D, PICCO G, GILLET C, PAPP SL, SCHAFFER L, TUTT A, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, PINDER SE, BURCHELL JM. Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. **Cancer Res.** v.71, n.24, p.7683-7693, 2011.

JUNG SY, SONG HS, PARK SY, CHUNG SH, KIM YJ. Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression. **Int J Oncol.** v.38, p.571-576, 2011.

KAUR RP, VASUDEVA K, KUMAR R, MUNSHI A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. **Curr Pharm Des.** v.24, n.30, p.3566-3575, 2018.

KAWAI S, KATO S, IMAI H, OKADA Y, ISHIOKA C. Suppression of FUT1 attenuates cell proliferation in the HER2-overexpressing cancer cell line NCI-N87. **Oncol Rep.** v.29, p.13-20, 2013.

KETTING RF, FISCHER SE, BERNSTEIN E, SIJEN T, HANNON GJ, PLASTERK RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes Dev.** v.15, p.2654–2659, 2001.

KNIGHT T, IRVING JA. Ras/Raf/MEK/ERK pathway activation in childhood acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic targeting. **Front Oncol.** v.4, n.160, p. 1-12, 2014.

KOIVUNEN P, LEE S, DUNCAN CG, LOPEZ G, LU G, RAMKISSOON S, LOSMAN JA, JOENSUU P, BERGMANN U, GROSS S, TRAVINS J, WEISS S, LOOPER R, LIGON KL, VERHAAK RGW, YAN H, KAELEN WG. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. **Nature.** v.483, p.484-488, 2012.

KONTOMANOLIS EN, KALAGASIDOU S, POULILIOU S, ANTHOULAKI X, GEORGIOU N, PAPAMANOLIS V, FASOULAKIS ZN. The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. **ScientificWorldJournal.** v.2018, n.2415489, p.1-11, 2018.

KRISHNAMURTHY N, KURZROCK R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. **Cancer Treat Rev.** v.62, p.50-60, 2018.

LAI TY, CHEN IJ, LIN RJ, LIAO GS, YEO HL, HO CL, WU JC, CHANG NC, LEE AC, YU AL. Fucosyltransferase 1 and 2 play pivotal roles in breast cancer cells. **Cell Death Discov.** v.5, n.74, 2019.

LATRES E, CHIAUR DS, PAGANO M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. **Oncogene**. v.18, n.4, p.849-854, 1999.

LEE Y, JEON K, LEE JT, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **EMBO J**. v.21, p.4663–4670, 2002.

LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RÅDMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**. v.425, p.415–419, 2003.

LI H, ROKAVEC M, JIANG L, HORST D, HERMEKING H. Antagonistic Effects of p53 and HIF1A on microRNA-34a Regulation of PPP1R11 and STAT3 and Hypoxia-induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells. **Gastroenterology**. v.153, n.2, p.505-520, 2017.

LIEN WH, FUCHS E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. **Genes Dev**. v.28, n.14, p.1517-1532, 2014.

LIU B, MA H, LIU Q, XIAO Y, PAN S, ZHOU H, JIA L. MiR-29b/Sp1/FUT4 axis modulates the malignancy of leukemia stem cells by regulating fucosylation via Wnt/ β -catenin pathway in acute myeloid leukemia. **J Exp Clin Cancer Res**. v.38, n.1, p.200, 2019.

LIU D, GAO Z, YUE L. Fucosyltransferase 8 deficiency suppresses breast cancer cell migration by interference of the FAK/integrin pathway. **Cancer Biomark**. v.25, n.4, p.303-311, 2019.

LU H, FORBES RA, VERMA A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. **J Biol Chem**. v.277, p.23111-23115, 2002.

MAGNIFICO A., ALBANO L., CAMPANER S., *et al*. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. **Clinical Cancer Research**. 2009;15(6):2010–2021.

MAH LY, RYAN KM. Autophagy and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. v. 4, n.1, 2012.

MASSAGUÉ, J, SEOANE, J, AND WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes Dev**. v.19, p. 2783–2810, 2005.

MAZIERE P, ENRIGHT AJ. Prediction of microRNA targets. **Drug Discov**. v.12, p. 452-458, 2007.

MCGUIRE A, BROWN JA, KERIN MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. **Cancer Metastasis Rev**. v.34, n.1, p.145-155, 2015.

MEANY, DANNY; CHAN DANIEL. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clin Proteomics**. v.8, n.7, 2011.

MENG L; XU L; YANG Y; ZHOU L; CHANG Y; SHI T; CHENG T; AN H; ZHU Y; XU J. High expression of FUT3 is linked to poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **Oncotarget**. v.8, n.37, p.61036-61047, 2017.

METCALFE C, MENDOZA-TOPAZ C, MIESZCZANEK J, BIENZ M. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. **J Cell Sci**. v.123, n. 9, p.1588-1599, 2010.

MINET E, ERNEST I, MICHEL G, ROLAND I, REMACLE J, RAES M, MICHIELS C. HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.261, n.2, p. 534–540, 1999.

MOASSER MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**. v.26, n.45, p.6469-6487, 2007.

MOLLICONE R, MOORE SE, BOVIN N, GARCIA-ROSASCO M, CANDELIER JJ, MARTINEZ-DUNCKER I, ORIOL R. Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). **J Biol Chem**. v.284, n.7, p.4723-4738, 2009.

MOVAFAGH S, CROOK S, VO K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. **J Cell Biochem**. v.116, p.696-703, 2015.

MUNKLEY J, ELLIOTT DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**. v.7, p.35478–35489, 2016.

MYOSHI E; MORIWAKI K; NAKAGAWA T. Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology. **J. Biochem**. v.143, p.725-729, 2008.

NASCIMENTO JC, FERREIRA SA, VASCONCELOS JL, SILVA FJL, BARBOSA BT, BEZERRA MF, ROCHA CR, BELTRÃO EI. Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression. **Exp Mol Pathol**. v.99, n.3, p.409-415, 2015.

NDUBUIZU OI, TSIPIIS CP, LI A, LAMANNA JC. Hypoxia-induciblefactor-1(HIF-1)-independent microvascular angiogenesis in the aged rat brain. **Brainresearch**. v. 1366, p.101–109, 2010.

NIU Y, JIN Y, DENG SC, DENG SJ, ZHU S, LIU Y, LI X, HE C, LIU ML, ZENG Z, CHEN HY, ZHONG JX, YE Z, WANG CY, ZHAO G. MiRNA-646-mediated reciprocal repression between HIF-1 α and MIIP contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer. **Oncogene**. v.37, n.13, p.1743-1758, 2018.

NODA M, OKAYAMA H, KOFUNATO Y, CHIDA S, SAITO K, TADA T, *et al.* Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III colorectal cancer. **PLoS One**. v. 13, n.7, 2018.

OKAGAWA Y, TAKADA K, ARIHARA Y, KIKUCHI S, OSUGA T, NAKAMURA H, *et al.* Activated p53 with Histone Deacetylase Inhibitor Enhances L-Fucose-Mediated Drug Delivery through Induction of Fucosyltransferase 8 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells. **PLoS One**. v.11, n.12, 2016.

OZAKI, T, NAKAGAWARA A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers (Basel)**. v.3, n.1, p.994–1013, 2011.

PADRÓ M, COBLER L, GARRIDO M, DE BOLÓS C. Down-regulation of FUT3 and FUT5 by shRNA alters Lewis antigens expression and reduces the adhesion capacities of gastric cancer cells. **Biochim Biophys Acta**. v.1810, n.12, p.1141-1149, 2011.

PARKS SK, CORMERAIS Y, POUYSSÉGUR J. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. **J Physiol**. v.595, n.8, p.2439-2450, 2017.

PEIXOTO A, FERNANDES E, GAITEIRO C, LIMA L, AZEVEDO R, SOARES J, COTTON S, PARREIRA B, NEVES M, AMARO T, TAVARES A, TEIXEIRA F, PALMEIRA C, RANGEL M, SILVA AMN, REIS CA, SANTOS LL, OLIVEIRA MJ, FERREIRA JA. Hypoxia enhances the malignant nature of bladder cancer cells and concomitantly antagonizes protein O-glycosylation extension. **Oncotarget**. v.7, n.39, p.63138–63157, 2016.

PENG WX, HUANG JG, YANG L, GONG AH, MO YY. Linc-RoR promotes MAPK/ERK signaling and confers estrogen-independent growth of breast cancer. **Mol Cancer**. v. 16, n.1, p.161-172, 2017.

PERRI F, PISCONTI S, SCARPATI GDV. P53 mutations and cancer: a tight linkage. **Ann Transl Med**. v.4, n.24, p.522-526, 2016.

PHUA YW, NGUYEN A, RODEN DL, ELSWORTH B, DENG N, NIKOLIC I, YANG J, MCFARLAND A, RUSSELL R, KAPLAN W, COWLEY MJ, NAIR R, ZOTENKO E, O'TOOLE S, TAN SX, JAMES DE, CLARK SJ, KOUROS-MEHR H, SWARBRICK A. MicroRNA profiling of the pubertal mouse mammary gland identifies miR-184 as a candidate breast tumour suppressor gene. **Breast Cancer Res**, v. 17, n.83, 2015.

POLLARD PJ, WORTHAM NC, TOMLINSON IP. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. **Ann Med**. v.35, p.632-639, 2003.

PRENZEL N, FISCHER OM, STREIT S, HART S, ULLRICH A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocr Relat Cancer**. v.8, n.1, p.11-31, 2001.

RAND MD, GRIMM LM, ARTAVANIS-TSAKONAS S, PATRIUB V, BLACKLOW SC, *et al.* Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. **Mol Cell Biol.** v.20, p. 1825–1835, 2000.

REEDIJK M. Notch Signaling in Embryology and Cancer. Vol. 727. New York, NY: Springer US; 2012. Notch Signaling and Breast Cancer; pp. 241–257. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

REIS CA., OSORIO H, SILVA L, GOMES C, DAVID L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, **J. Clin. Pathol.** v.2, p.322–329, 2010.

RODRIGUEZ-BARRUECO R, NEKRITZ EA, BERTUCCI F, YU J, SANCHEZ-GARCIA F, ZELEKE TZ, GORBATENKO A, BIRNBAUM D, EZHKOVA E, CORDON-CARDO C, FINETTI P, LLOBET-NAVAS D, SILVA JM. miR-424(322)/503 is a breast cancer tumor suppressor whose loss promotes resistance to chemotherapy. **Genes Dev.** v. 31, n.6, p. 553–566, 2017.

RUSTIN P, ROTIG A. Inborn errors of complex II – unusual human mitochondrial diseases. **Biochem Biophys Acta.** v.1553, p.117-122, 2002.

SANTARPIA L, LIPPMAN SL, EL-NAGGAR AK. Targeting the mitogen-activated protein kinase RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets.** v.6, p.103-119, 2012.

SCHOFIELD CJ, RATCLIFFE PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.5, n.5, p.343-354, 2004.

SEMENZA, GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of Applied Physiology.** v.88, n.4, p.1474–1480, 2000.

SEMENZA, GL. "Targeting HIF-1 for cancer therapy". **Nature Reviews. Cancer.** v.3, n.10, p. 721–32, 2003.

SEMENZA GL. The Hypoxic Tumor Microenvironment: A Driving Force for Breast Cancer Progression. **Biochim Biophys Acta.** v.1863, n.3, p. 382–391, 2016.

SEVER R, BRUGGE JS. Signal Transduction in Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v.5, p.01-21, 2015.

SHEN Y, YE YF, RUAN LW, BAO L, WU MW, ZHOU Y. Inhibition of miR-660-5p expression suppresses tumor development and metastasis in human breast cancer. **Genet Mol Res,** v. 16, n.1, gmr16019479, 2017.

SHI Y, MASSAGUÉ J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell.** v.113, p. 685–700, 2003.

SILVA FAF, SENA WLB, LIMA LRA, CARVALHO LVN, PEREIRA MC, SANTOS LGS, SANTOS RVC1, TAVARES LB, PITTA MGR, RÊGO MJBM. Glycobiology Modifications in Intratumoral Hypoxia: The Breathless Side of Glycans Interaction. *Cell Physiol Biochem*. v.41, n.5, p.1801-1829, 2017.

SIONOV RV, HAUPT Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. v.18, n.45, p. 6145-6157, 1999.

SONVEAUX P, COPETTI T, DE SAEDELEER CJ, VÉGRAN F, VERRAX J, KENNEDY KM, MOON EJ, DHUP S, DANHIER P, FRÉRAR F, GALLEZ B, RIBEIRO A, MICHIELS C, DEWHIRST MW, FERON O. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS ONE*. v.7, p.01-13, 2012.

TAN KP, HO MY, CHO HC, YU J, HUNG JT, YU AL. Fucosylation of LAMP-1 and LAMP-2 by FUT1 correlates with lysosomal positioning and autophagic flux of breast cancer cells. *Cell Death Dis*. v.7, n.8, p. 1-13, 2016.

THOMAS M, LIEBERMAN J, LAL A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol*. v.17, n.10, p. 116974, 2010.

TOMLINSON IP, ALAM NA, ROWAN AJ, BARCLAY E, JAEGER EE, KELSELL D, LEIGH I, GORMAN P, LAMLUM H, RAHMAN S, ROYLANCE RR, OLPIN S, BEVAN S, BARKER K, HEARLE N, HOULSTON RS, KIURU M, LEHTONEN R, KARHU A, VILKKI S, LAIHO P, EKLUND C, VIERIMAA O, AITOMÄKI K, HIETALA M, SISTONEN P, PAETAU A, SALOVAARA R, HERVA R, LAUNONEN V, AALTONEN LA. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet*. v.30, p.406-410, 2002.

TORRES JF, NAVA GAM, RUÍZ MCG, QUIROZ LEG, GUTIÉRREZ M. Papel da via de sinalização do HIF-1 α na osteoartrite: revisão sistemática. *Rev. Bras. Reumatol*. v.57 n.2, p. 162-173, 2017.

TU CF, WU MY, LIN YC, KANNAGI R, YANG RB. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Res*. v.19, n.1, p.111, 2017.

TSUCHIDA N, IKEDA MA, ISHINO Y, GRIECO M, VECCHIO G. FUCA1 is induced by wild-type p53 and expressed at different levels in thyroid cancers depending on p53 status. *Int J Oncol*. v.50, n.6, p.2043-2048, 2017.

VLEUGEL MM, GREIJER AE, SHVARTS A, VAN DER GROEP P, VAN BERKEL M, AARBODEM Y, VAN TINTEREN H, HARRIS AL, VAN DIEST PJ, VAN DER WALL A. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol*. v.58, n.2, p. 172–177, 2005.

VOLINIA S, GALASSO M, SANA ME, WISE TF, PALATINI J, HUEBNER K, CROCE CM. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.109, n.8, p.3024–3029, 2012.

VRIES TD; KNEGTEL R; HOLMES E; MACHER B. Fucosyltransferases: structure/function studies. **Glycobiology**. v. 11, n.10, p.119R-128R, jul, 2001.

WANG H, FLACH H, ONIZAWA M, WEI L, MCMANUS MT, WEISS A. Negative regulation of Hif1 α expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210. **Nat Immunol**. v.15, n.4, p.393-401, 2014.

WANG M, WANG J, KONG X, CHEN H, WANG Y, QIN M, LIN Y, CHEN H, XU J, HONG J, CHEN YX, ZOU W, FANG JY. MiR-198 represses tumor growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fucosyl transferase 8. **Sci Rep**. v.4, n.6145, 2014.

WANG S, ZHANG X, YANG C, XU S. MicroRNA-198-5p inhibits the migration and invasion of non-small lung cancer cells by targeting fucosyltransferase 8. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.46, n.10, v.955-967, 2019.

WANG W, HE YF, SUN QK, WANG Y, HAN XH, PENG DF, YAO YW, JI CS, HU B. Hypoxia-inducible factor 1 α in breast cancer prognosis. **Clin Chim Acta**. v. 428, p. 32-37, 2014.

WANG Y, DAI YX, WANG SQ, QIU MK, QUAN ZW, LIU YB, OU JM. miR-199a-5p inhibits proliferation and induces apoptosis in hemangioma cells through targeting HIF1A. **Int J Immunopathol Pharmacol**. v.31, p. 02-10, 2018.

WANG Y, KLIJN JG, ZHANG Y, SIEUWERTS AM, LOOK MP, YANG F, TALANTOV D, TIMMERMANS M, MEIJER-VAN GELDER ME, YU J, JATKOE T, BERNIS EM, ATKINS D, FOEKENS JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet**. v. 365, n.9460, p.671–679, 2005.

WANG Y; SHAO L; SHI S; HARRIS R; SPELLMAN M; STANLEY P; HALTIWANGER R. Modification of Epidermal Growth Factor-like Repeats with O-Fucose. **J Biol Chem**. v.276, n.43, p. 40338–40345, 2001.

WANG X, CHEN J, LI QK, PESKOE SB, ZHANG B, CHOI C, PLATZ EA, ZHANG, H. Overexpression of α (1,6) fucosyltransferase associated with aggressive prostate cancer. **Glycobiology**. v.24, n.10, p. 935–944, 2014.

WINTER J, JUNG S, KELLER S, GREGORY RI, DIEDERICH S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**. v.11, n.3, p.228-234, 2009.

WEN S, HOU Y, FU L, XI L, YANG D, ZHAO M, QIN Y, SUN K, TENG Y, LIU M. Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β 3-p38 MAPK signalling. **Cancer Lett**. v.442, p.320-332, 2019.

WILLIAMSON JR, CHANG K, FRANGOS M, HASAN KS, IDO Y, KAWAMURA T, NYENGAARD JR, VAN DEN ENDEN M, KILO C, TILTON RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**. v. 42, p. 801-813, 1993.

WITKOS TM, KOSCIANSKA E, KRZYZOSIAK WJ. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. **Curr Mol Med**. v.11, n.2, p.93-109, 2011.

WRONSKI A, SANDHU GK, MILEVSKIY MJG, BREWSTER BL, BRIDGE JA, SHEWAN AM, EDWARDS SL, FRENCH JD, BROWN MA. MicroRNA-206 is differentially expressed in Brca1-deficient mice and regulates epithelial and stromal cell compartments of the mouse mammary gland. **Oncogenesis**, v.5, n.218, 2016.

WU L, ASTER JC, BLACKLOW SC, LAKE R, ARTAVANIS-TSAKONAS S, GRIFFIN JD. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. **Nat Genet**. v.26, p. 484–489, 2000.

XU W, YANG H, LIU Y, YANG Y, WANG P, KIM SH, ITO S, YANG C, WANG P, XIAO MT, LIU L, JIANG W, LIU J, ZHANG J, WANG B, FRYE S, ZHANG Y, XU Y, LEI Q, GUAN KL, ZHAO S, XIONG Y. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell**. v.19, p.17-30, 2011.

YANG HF, YU M, JIN HD, YAO JQ, LU ZL, YABASIN IB, YAN Q, WEN QP. Fentanyl Promotes Breast Cancer Cell Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition by Upregulating $\alpha 1$, 6-Fucosylation via Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Front Physiol**. v.8, n. 510, p. 1-12, 2017.

YIN P, WANG W, ZHANG Z, BAI Y, GAO J, ZHAO C. Wnt signaling in human and mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists. **Cancer Sci**. v.109, n.11, p.3368-3375, 2018.

YIN X, RANA K, PONMUDI V, KING MR. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. **Carbohydr Res**. v.345, n.16, p.2334-2342, 2010.

YUE D, LIU H, HUANG Y. Survey of Computational Algorithms for MicroRNA Target Prediction. **Curr Genomics**. v.10, n.7, p.478-492, 2009.

YUE L, HAN C, LI Z, LI X, LIU D, LIU S, YU H. Fucosyltransferase 8 expression in breast cancer patients: A high throughput tissue microarray analysis. **Histol Histopathol**. V.31, n.5, p.547-550, 2016.

ZENG Y, CULLEN BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. **Nucleic Acids Res**. v.32, p.4776–4785, 2004.

ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer. **Oncogene**. v.36, n.11, p. 1461–1473, 2017

ZHANG Z, SUN P, LIU J, FU L, YAN J, LIU Y, YU L, WANG X, YAN Q. Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumour growth. **Biochim Biophys Acta**. v. 1783, p. 287–296, 2008.

ZHAO Y, MA J, FAN Y, WANG Z, TIAN R, JI W, ZHANG F, NIU R. TGF- β transactivates EGFR and facilitates breast cancer migration and invasion through canonical Smad3 and ERK/Sp1 signaling pathways. **Mol Oncol**. v.12, n.3, p.305-321, 2018.

ZHENG Q, CUI X, ZHANG D, YANG Y, YAN X, LIU M, NIANG B, AZIZ F, LIU S, YAN Q, LIU J. miR-200b inhibits proliferation and metastasis of breast cancer by targeting fucosyltransferase IV and α 1,3-fucosylated glycans. **Oncogenesis**. v.6, n.7, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS DISÓNÍVEIS NO BANCO DE DADOS WHITEHEAD INSTITUTE.

Amostras Triplo Negativo	Amostras RE/RP (+)	Amostras RE/RP (-)
BT20 (n = 5)	BT-474 (n = 11)	AU-565 (n = 2)
BT-549 (n = 2)	BT-483 (n = 1)	HCC-1569 (n = 1)
CAL-120 (n = 3)	CAMA-1 (n = 2)	HCC-1954 (n = 5)
CAL-148 (n = 1)	EFM-192A (n = 2)	Hs-274-T (n = 1)
CAL-51 (n = 3)	EFM-19 (n = 5)	Hs-281-T (n = 1)
CAL-851 (n = 1)	EVSA-T (n = 2)	Hs-343-T (n = 1)
DU4475 (n = 4)	HCC-1419 (n = 2)	Hs-606-T (n = 1)
HCC1143 (n = 5)	HCC-1428 (n = 1)	Hs-739-T (n = 1)
HCC1187 (n = 1)	HCC-1500 (n = 2)	KPL-4 (n = 1)
HCC1395 (n = 5)	HCC-202 (n = 2)	—
HCC1599 (n = 4)	HCC-2218 (n = 5)	—
HCC1806 (n = 2)	KPL-1 (n = 5)	—
HCC1937 (n = 5)	MCF7 (n = 5)	—
HCC2157 (n = 4)	MDA-MB-134-VI (n = 1)	—
HCC38 (n = 5)	MDA-MB-175 (n = 4)	—
HCC70 (n = 2)	MDA-MB-361 (n = 3)	—
HDQ-P1 (n = 2)	MDA-MB-415 (n = 2)	—
Hs-578-T (n = 2)	T47D (n = 5)	—
MDA-MD-157 (n =1)	UAAC-812 (n = 5)	—
MDA-MB-231 (n = 21)	UAAC-893 (n = 4)	—
MDA-MB-436 (n = 1)	YMB-1 (n = 1)	—
MDA-MB-453 (n = 7)	ZR-751 (n =2)	—
MDA-MB-468 (n = 3)	ZR-7530 (n = 2)	—
MFH-223 (n =1)	—	—
SW537 (n =1)	—	—
n (TOTAL) = 92	n (TOTAL) = 73	n (TOTAL) = 14

O padrão molecular de cada linhagem foi consultado em: *American Type Culture Collection* (ATCC), disponível em < <https://www.atcc.org/en.aspx>>, acesso em: 01/2019; e CHAVEZ, *et al.* 2010.

APÊNDICE B – MANUAL PARA PREDIÇÃO DE miRNAs E ANOTAÇÃO FUNCIONAL DE GENES ALVOS.

Parte I: Predição por alvo específico

1. A primeira etapa para predição de miRNAs com genes alvos já definidos é acessar o site do miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>). Em seguida direcionar o cursor para a aba “*Predicted Target Module*” e escolher a opção “*Gene-miRNA Targets*”.
2. Você será redirecionado para uma página que dará a opção de configurar as informações de busca de miRNAs em quatro etapas (*Gene-miRNA interaction information retrieval system*).
3. Primeira etapa: Na aba esquerda da sessão “*Step 1*”, selecione a espécie que você deseja trabalhar. Em seguida, mais à direita, selecione o banco de dados que deve buscar o gene de interesse. Sugiro selecionar a opção “*Gene*”. Logo depois selecione a forma de identificação do gene de interesse. Sugiro selecionar a opção “*Official symbol (PDK1)*”. Tendo selecionado respectivamente as opções “*Gene*” e “*Official symbol (PDK1)*”, como sugerido, escreva o nome oficial do gene (disponível no NCBI, normalmente é o nome usual do gene, sempre em caixa alta para genes humanos).
4. Segunda etapa: Marque todas as opções disponíveis, elas trazem informações sobre o gene.
5. Terceira etapa: No canto direito da linha “*Output fields*” na opção “*Select start position of miRNA seed*”, troque de “*Position 1*” para “*Position 2*”, pois miRNAs com *seed* na posição 2 são mais estáveis. Na segunda linha “*Input parameters*” selecione apenas a opção 3’UTR, se as regiões 5’UTR e CDS estiverem marcadas, desmarque-as. No mais, deixar de acordo com as configurações do programa. Na terceira linha “*Other databases*” marque todas as opções e selecione a opção “*OR*” em todas elas. Assim você obterá uma tabela comparativa entre 12 programas de predição distintos.
6. Quarta etapa: Tendo definido todos os parâmetros das etapas anteriores, clique em “*SEARCH*”.
7. Você será redirecionado para uma página com os resultados de predição de miRNAs e de informações sobre o gene. Não deixe de conferir os tópicos em azul gerados na sessão “*Gene information*”. Na tabela “*Putative miRNA binding sites predicted by chosen algorithms within mRNA selected regions*” selecione a opção “*3UTR*”.

8. Você será redirecionado para uma página contendo uma tabela com os 50 primeiros miRNAs preditos pelos programas que você selecionou. Clique em “*Download Complete Table*” para obter todos os demais miRNAs preditos.
9. Salve a tabela no formato “txt” e abra com o Excel. Uma vez aberta a tabela, na caixa de ferramentas do Excel, procure a aba “Dados”, em seguida na sessão “Ferramentas de Dados” selecione a opção “Remover Duplicatas” e selecione apenas a coluna “miRNA”, clique em “Ok”.
10. Ainda no Excel, na caixa de ferramentas, volta para a aba “Página Inicial” e na sessão “Edição”, selecione a opção “Classificar e Filtrar”, em seguida clique na opção “Filtro”.
11. Na tabela, selecione o filtro da coluna “SUM” e marque apenas as opções 1 e 2. Em seguida, exclua todos os itens selecionados. A intenção é ignorar os miRNAs preditos por menos de 3 algoritmos distintos.

Parte II: Busca de correlação entre miRNAs e processos patológicos

1. A primeira etapa para descobrir se seus miRNAs preditos são potenciais reguladores do seu gene, no processo patológico estudado, é buscar associações entre a patologia e/ou processos associados a patologia com o miRNA em questão.
2. Selecione os miRNAs mais preditos por algoritmos distintos (na coluna “SUM”, escolha os 3 maiores números, o importante é buscar pelos miRNAs com maior potencial de regulação do gene estudado, portanto não abranja muito a quantidade de miRNAs).
3. Escolhidos os miRNAs, busque em bancos de dados as associações destes com a patologia e/ou características patológicas da doença em questão. Use bancos de dados como o miRDisease.
4. Estabeleça um peso para as características patológicas avaliadas. Por exemplo, se o estudo busca miRNAs reguladores de genes envolvidos com metástase no câncer de mama, em situações de hipóxia, atribua um peso maior para a característica “Presente no câncer de mama”, depois um peso um pouco menor para “Associado à metástase”, pesos menores para outras características como “Presente em outros carcinomas” e “Presente na hipóxia”.

5. Faça um somatório desses pesos com o somatório obtido pelo número de programas de predição. Isso ajudará a avaliar quais miRNAs estão mais ou menos envolvidos com seu objeto de estudo.

Parte III: Avaliação da interação termodinâmica entre miRNA e RNAm

1. Para avaliar a interação termodinâmica entre os miRNAs e seus respectivos alvos usamos a ferramenta RNAhybrid disponível em: https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid?id=rnahybrid_view_submission. Este link dará acesso a uma página pronta para submissão das sequências de miRNA e seu gene alvo.
2. No primeiro quadro, selecione a opção “*Copy & Paste*” no canto esquerdo. Em seguida, cole no espaço à direita a sequência do gene, no formato FASTA. A sequência pode ser facilmente obtida no banco de dados do NCBI, digite o nome do gene com o filtro “*nucleotide*” e busque o transcrito de interesse. Fique atento, ao colar a sequência no quadro “*target Sequence(s)*”, para não deixar espaços em branco entre nucleotídeos.
3. No segundo quadro “*miRNA sequence(s)*”, selecione a opção “*Copy & Paste*” no canto esquerdo. Em seguida, cole no espaço à direita a sequência do miRNA, no formato FASTA. A sequência pode ser facilmente obtida no banco de dados do miRBase, digitando o nome do miRNA de interesse no campo de busca do lado direito da tela. Clique em “*next*”
4. Você será redirecionado para uma página onde deverá selecionar os parâmetros de interesse no tocante a interação entre miRNA e RNAm. Não modifique os parâmetros já selecionados no programa. No campo “*energy Threshold*” digite o número “-20” e no campo “*approximate p-value*” selecione a opção “*3utr_human[3utr_human]*”. Clique em “*next*”
5. Você será redirecionado para uma nova página. Não altere os parâmetros selecionados nela. Clique em “*start calculation*”.
6. Você será redirecionado para uma nova página, onde será possível efetuar o download dos dados.
7. Ao clicar em “*Download*” uma nova guia abrirá automaticamente. Nela você terá as informações do tipo: energia livre mínima (*minimun free energy - mfe*) em Kcal/mol, posição da hibridização, comprimento, entre outras informações.

8. Anote os valores de *mfe* na sua tabela, quanto menor seu valor, mais provável será que o miRNA interaja com o seu alvo, pois mais estável será sua hibridização.

Parte IV: Anotação funcional dos genes alvo para os miRNAs selecionados

1. Antes de realizar a anotação funcional dos genes alvo do seu miRNA, você precisará definir quais os potenciais genes podem interagir com o miRNA selecionado.
2. Para isso, você voltará ao miRwalk 2.0 e novamente direcionará o cursor sobre a aba “*Predicted Target Module*”, porém desta vez deverá escolher a opção “*MicroRNA–gene Targets*”.
3. Você será redirecionado para uma página que te dará a opção de configurar as informações de busca de miRNAs em cinco etapas.
4. Primeira etapa: Na aba esquerda da sessão “*Step 1*”, selecione a espécie que você deseja trabalhar. Em seguida, mais à direita, selecione o banco de dados que deve buscar o gene de interesse. Sugiro selecionar a opção “*miRBase*”. Logo depois selecione a forma de identificação do miRNA de interesse. Sugiro selecionar a opção “*MiRNA (hsa-miR-1)*”. Tendo selecionado respectivamente as opções “*miRBase*” e “*MiRNA (hsa-miR-1)*”, como sugerido, escreva o nome do miRNA como consta na sua tabela.
5. Segunda etapa: Marque todas as opções disponíveis, elas trazem informações sobre o miRNA.
6. Terceira etapa: No canto direito da linha “*Output fields*” na opção “*Select start position of miRNA seed*”, troque de “*Position 1*” para “*Position 2*”. Na segunda linha “*Input parameters*” selecione apenas a opção 3’UTR, se as regiões 5’UTR e CDS estiverem marcadas, desmarque-as. No mais, deixar de acordo com as configurações do programa. Na terceira linha “*Other databases*” marque todas as opções e selecione a opção “*OR*” em todas elas.
7. Quarta etapa: Selecione todos os parâmetros possíveis. Na linha “*Panther protein classes*” selecione a opção “*All*”. Nesta etapa você já poderá obter informações de anotação funcional.
8. Quinta etapa: Tendo definido todos os parâmetros das etapas anteriores, clique em “*SEARCH*”.
9. Você será redirecionado para uma página com os resultados de predição de genes e de informações sobre o miRNA e anotações funcionais. Não deixe de conferir os tópicos

- em azul gerados em todas as sessões. Na tabela “*Putative target genes predicted by chosen algorithms within mRNA selected regions*” selecione a opção “3UTR”.
10. Uma nova guia abrirá automaticamente, contendo uma tabela com os 50 primeiros genes preditos pelos programas que você selecionou. Clique em “*Download Complete Table*” para obter todos os genes preditos.
 11. Para saber como tratar sua tabela, consulte os tópicos 8 a 11 na “Parte I: Predição por alvos” deste manual.
 12. Para anotação funcional do genes alvo dos miRNAs selecionados, usaremos a ferramenta DAVID 6.8, disponível em: <https://david.ncifcrf.gov>.
 13. Na parte esquerda da tela inicial do DAVID, clique na aba “*Functional Annotation*”.
 14. Você será redirecionado para uma nova página. No canto esquerdo, no “*Step 1*”, opção “A” copie e cole os genes preditos no miRwalk 2.0 (insira apenas os primeiros 3000 genes, pois a ferramenta não processa uma lista de genes maior que 3000).
 15. No “*Step 2*”, selecione a opção “*OFFICIAL_GENE_SYMBOL*”.
 16. No “*Step 3*”, selecione a opção “*Gene List*”.
 17. No “*Step 4*”, clique em “*Submit List*”.
 18. Aguarde, a depender do tamanho da sua lista e de sua conexão com a internet, este processo pode ser demorado.
 19. Você será redirecionado para uma nova página, onde lhe será solicitado escolher a espécie para anotação funcional. Escolha a opção “*Use All Apecies*” ou busque uma espécie de interesse, selecione-a e clique em “*Select Species*”.
 20. Você será redirecionado para uma nova página. Nela clique em qualquer uma das opções disponível na sessão “*Functional Annotation Tools*”.
 21. Uma nova guia será aberta automaticamente. Nela haverá informações importantes sobre os genes de sua lista, dentre elas, as vias em que estão envolvidos. Clique em “*Pathways*” e escolha a opção “*KEEG_PATHWAY*”.
 22. Uma nova janela abrirá automaticamente. Nela haverá uma tabela das vias envolvidas com a expressão dos genes selecionados.

APÊNDICE C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA REALIZADA DURANTE O MESTRADO

1. **Publicação do artigo intitulado:** “The challenge of determining the impact of FUT3 tumor-associated polymorphism rs2306969 (-6951 C> T) in invasive breast cancer cells.”, na revista *Molecular Biology Reports*.
2. **Aceite do artigo intitulado:** “Challenges of including visually impaired persons in laboratory practice classes in life sciences courses”, na revista FAFIRE.
3. **Apresentou o trabalho:** “Fucosyltransferase 3 Expression and Pathological Impact in Breast Invasive Ductal Carcinoma.” Modalidade pôster, na XIV Reunião Regional da SBBQ, 2018, Salvador, publicado em anais da Revista de Ciências Médicas e Biológicas.
4. **Apresentou o trabalho:** “Identificação *in silico* de um potencial miRNA regulador do gene FUT8 no câncer de mama.” Modalidade oral, na VI Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde, 2018, Recife. Publicado os anais da VI Semana de Biociências e Biotecnologia em Saúde.
5. **Conclusão do curso de:** Especialização em Análises Clínicas (372h), pela FAFIRE.
6. **Ministrou o curso:** Fundamentos de Química Aplicados à Bioquímica, ofertada pela Coordenadoria do Ensino de Ciências do Nordeste (CECINE - UFPE), nos períodos de 2019.1 e 2019.2, com cargas horárias de 42h e 60h, respectivamente.
7. **Orientou o trabalho intitulado:** “Perfil epidemiológico de portadores de HBV no estado de Pernambuco. ” Apresentado no MEDTROP - 54º congresso da sociedade brasileira de medicina tropical, 2018, Recife.
8. **Foi conferencista em:** Semana Estadual da Pessoa com Deficiência, realizada pela FAFIRE, apresentando o trabalho: “Desafios da inclusão de pessoas com deficiência visual em aulas práticas laboratoriais em cursos de ciências da vida.”
9. **Foi responsável pela disciplina:** Padrões de Segurança e Prevenção de Acidentes, como professor convidado, da pós-graduação da FAFIRE.
10. **Realização de Estágio de Docência:** Na disciplina de Bioquímica II, para biomedicina, UFPE, do período de setembro ao atual.
11. **Participou da Comissão Científica em:** XXVI Semana de Biomedicina.