ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOLOGIA MOLECULAR - BM02

CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POLILACTOSAMINAS E GALECTINA-3 EM AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS: UM ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO

A. L. V. DA SILVA¹, A. T. R. CLARK¹, E. I. C. BELTRÃO^{1,2}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

²Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica
E-mail para contato: alinelarissav@hotmail.com

RESUMO – *este trabalho avaliou a expressão de poliLacNAc e Gal-3 em diferentes tipos de lesões mamárias através de histoquímica com lectinas e imunohistoquímica, respectivamente. PoliLacNAc foi pouco expressa nas amostras malignas e ausentes nas benignas, enquanto Gal-3 foi expressa na maioria das amostras malignas. Assim, é sugerido o uso da Gal-3 como possível marcador de diagnóstico para transformações da mama.*

Palavras-chaves: *câncer de mama, imunohistoquímica, histoquímica com lectina*

ABSTRACT - *this work evaluated the polyLacNAc and Gal-3 expression at different types of breast lesions using lectin histochemistry and immunohistochemistry, respectively. PolyLacNAc was low expressed in malignant lesions and absent at benign ones, while Gal-3 expression was present in almost all malignant samples. Thus, it's possible to suggest the use of Gal-3 as a marker for the diagnoses of breast lesions.*

Keywords: *breast cancer, immunohistochemistry, lectin histochemistry*

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo maior causador de mortes entre os tipos de câncer (MAXMAN, 2012). Ele é uma doença complexa, fazendo com que o diagnóstico em estágios precoces seja importante para melhorar a eficiência do tratamento e evitar a sua recorrência (MITTAL *et al.*, 2017). Os glicanos são envolvidos em diversas funções fisiológicas que incluem diferenciação, reconhecimento célula-célula, sinalização celular, resposta imunológica, metástase, entre outros. Já é conhecido que a expressão alterada de glicanos de superfície celular está intimamente associada a numerosas doenças, incluindo o câncer (CHRISTIANSEN *et al.*, 2014). Um dos glicanos que tem chamado a atenção de pesquisadores por seus importantes papéis biológicos é a polilactosamina (poliLacNAc). Estudos sugerem que resíduos alterados de poliLacNAc de superfície desempenhem um papel na migração celular e metástase (KINOSHITA *et al.*, 2014). Ela é um polímero que serve de arcabouço para a formação de inúmeros epítomos importantes (QIU *et al.*, 2014). Algumas dessas estruturas podem ser reconhecidas pela galectina-3

(Gal-3) e resultar em diferentes respostas biológicas. A Gal-3 regula a interação célula-célula e célula-matriz, promovendo a adesão das células tumorais à matriz extracelular e ao endotélio. O papel da Gal-3 no câncer é muito complexo, mas já se tem observado elevados níveis de Gal-3 como um marcador de prognóstico mais reservado em diversos tipos de câncer (RUVOLO, 2016). A glicosilação alterada contribui desde estágios iniciais do tumor até a metástase. O perfil glicídico pode ter aplicação clínica, servindo de possíveis alvos terapêuticos e biomarcadores. Este trabalho avaliou a expressão de poliLacNAc e Gal-3 em diferentes tipos de lesões mamárias (de benignas a malignas).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: amostras fibroadenoma (FIB), carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular (CL) foram selecionados do Banco de Biópsias do Departamento de Patologia da Escola de Medicina de Ribeirão Preto.

Imunohistoquímica (IHQ) e histoquímica com lectinas (HqL): os cortes foram desparafinizados e hidratados. Em IHQ foi usado o anticorpo primário anti-gal-3 (1:100) e para HqL a lectina *Phytolacca americana* (PWM) a 20µg/mL. A detecção foi feita usando o kit Advanced™ HRP (DAKO), para a imuno-histoquímica e a lectina feito segundo Clark e colaboradores (2014). A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB). Hematoxilina foi usada para contra-coloração (CLARK *et al.*, 2014).

Análise e estatística: a marcação foi medida como: 0, ausência de marcação; 1+, marcação em 1/3 das células; 2+, marcação em 2/3 das células; e 3+, marcação em mais de 2/3 das células. Para a análise estatística os resultados foram dicotomizados em positivos (2+ e 3+) e negativos (1+ e 0) de acordo com dos-Santos *et al.* (2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cadeias de poliLacNAc (figura 1) apresentaram expressão baixa nas amostras de tumores mamários (6,1% no CDIS, 1,8% no CDI e 3,7% no CL) e completamente ausentes nas amostras de tumores benignos. A expressão de Gal-3 foi observada em todas as amostras de FIB (100%), com expressão variada nas amostras de carcinomas (64,4% no CDIS, 89,8% no CDI e 84,6% no CL) (figura 1). Após a análise estatística, foi observado significância entre FIB e CDIS ($p<0,001$), entre CDI e CDIS ($p=0,02$) e CDI e CL ($p<0,0001$) (tabela 1). Também foi observado uma expressão nuclear de Gal-3 nas amostras, sendo presente em 83,7% no FIB, 60% no CDIS, 30,6% no CDI e 9,6% no CL (figura 1). Todas as correlações foram significantes (tabela 1).

Figura 1 - expressão de poliLacNAc e Gal-3 de acordo com o tipo de lesão.

Tabela 1 - correlação das expressões de poliLacNAc e Gal-3 entre os tipos de lesões.

Expression	FIB (G1)	DCIS (G2)	P-value G2 versus	IDC (G3)	P-value G3 versus	LC (G4)	P-value G4 versus
Gal-3							
Positive	49 (100%)	29 (64.4%)	G1: <0.0001 G3: 0.002	44 (89.8%)	G1: 0,0562	44 (84.6%)	G1: <0.0001
Negative	0 (-)	16 (35.6%)	G4: 0.4478	5 (10.2%)	G4: <0.0001	8 (15.6%)	
Nuclear Gal-3							
Positive	41 (83.7%)	27 (60.0%)	G1: 0.0122 G3: 0.0067	15 (30.6%)	G1: <0.0001	5 (9.6%)	G1: <0.0001
Negative	8 (16.3%)	18 (40.0%)	G4: <0.0001	34 (69.4%)	G4: <0.0117	47 (90.4%)	
PWM							
Positive	0 (-)	3 (6.1%)	G1: 0.0766 G3: 0.3406	1 (1.8%)	G1: 0.4583	2 (3.7%)	G1: 0.2038
Negative	65 (100%)	46 (93.9%)	G4: 0.6668	54 (98.2%)	G4: 0.618	52 (96.3%)	

Nos últimos anos estudos têm demonstrado a importância da expressão poliLacNAc associada a importantes papéis em processos vitais da progressão tumoral, com mais frequência, com o crescimento tumoral e metástase (MIYOSHI *et al.*, 2012). Nossos resultados não demonstram um expressivo aumento da expressão de poliLacNAc nas amostras malignas, quando comparada com as benignas. Talvez a expressão de cadeias de poliLacNAc sejam modificadas para formar outros antígenos glicídicos. Assim, o reconhecimento das cadeias de poliLacNAc pode estar bloqueado por estes resíduos terminais de carboidratos.

Gal-3 já teve seu papel descrito no processo de carcinogênese, onde sua expressão está associada tanto positivamente quanto negativamente com a progressão tumoral no câncer de mama (PEREIRA *et al.*, 2016). Além disso, em amostras de FIB, a Gal-3 também se tem mostrado presente nessas células transformadas (GALLEGOS *et al.*, 2012). Nossos dados reforçam a relação da Gal-3 com a transformação tumoral das células, já que foi observada uma alta expressão dela nas amostras. Vale ressaltar que as amostras com menor expressão de Gal-3 foram as com CDIS, o que pode ser relacionado com o menor grau de crescimento desse tipo de lesão quando comparado com as outras e/ou com a associação da Gal-3 com a capacidade de invasão.

4. CONCLUSÃO

Esse trabalho observou a expressão da poliLacNAc e Gal-3 em diferentes tipos de lesões mamárias (benignos e malignos), mostrando diferenças importantes nas suas expressões, em especial de Gal-3. Os resultados sugerem o uso de Gal-3 como um potencial marcador de diagnóstico para pacientes com transformações de mama.

5. REFERÊNCIAS

- CHRISTIANSEN, M. N.; CHIK, J. ; LEE, L.; M. ANUGRAHAM, J. L.; ABRAHAMS and N. H. PACKER. Cell surface protein glycosylation in cancer. **Proteomics**. v.14, n.4-5, p. 525-546, 2014.
- CLARK, A. T.; GUIMARAES DA COSTA V. M.; BANDEIRA COSTA, L.; BEZERRA CAVALCANTI C. L.; DE MELO REGO, M. J. and BELTRAO E. I.

- Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polylectosamines in uterine lesions. **Eur J Histochem.** v. 58, n. 2, p. 2334, 2014.
- DOS-SANTOS, P. B.; ZANETTI, J. S.; VIEIRA-DE-MELLO, G. S.; RÊGO, M. B. M.; A. R.-S. A and E. BELTRÃO, I. C. Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology.** V.7, n. 5, p. 2337-2349, 2014.
- GALLEGOS, I. B.; PEREZ-CAMPOS, E.; MARTINEZ, M.; MAYORAL, M. A; PEREZ, L.; AGUILAR, S.; ZENTENO, E.; PINA MDEL, S. and HERNANDEZ, P. Expression of antigen tf and galectin-3 in fibroadenoma. **BMC Res Notes.** v. 5, p. 694, 2012.
- MAXMEN, A. The hard facts. **Nature.** v. **485**, n. 7400, p. 50-51, 2012.
- MITTAL, S.; KAUR, H.; GAUTAM, N. and MANTHA, A. K. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. **Biosens Bioelectron.** v.88, p. 217-231, 2017.
- PEREIRA, J. X.; AZEREDO, M. C.; MARTINS, F. S.; CHAMMAS, R.; OLIVEIRA, F. L.; SANTOS, S. N.; BERNARDES, E. S. and EL-CHEIKH, M. C. The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis. **BMC Cancer.** v.16, p.636, 2016.
- QIU, H.; DUAN, W. M.; SHU, J.; CHENG, H. X.; WANG, W. P.; HUANG, X. E. and CHEN, H. L. B3GNT2, a polylectosamine synthase, regulates glycosylation of EGFR in H7721 human hepatocellular carcinoma cells. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. **15**, n. 24, p. 10875-10878, 2014.
- RUVOLO, P. P. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. **Biochim Biophys Acta.** v.1863, n.3, p.427-437, 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, CNPq, FACEPE pelo suporte financeiro e estrutural.