



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA VIA DOS
ESFINGOLIPÍDIOS EM TECIDO TUMORAL E EM CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE NO CÂNCER DE MAMA**

Aluna: Larissa Prado Maia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia - MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA VIA DOS
ESFINGOLIPÍDIOS EM TECIDO TUMORAL E EM CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE NO CÂNCER DE MAMA**

Aluna: Larissa Prado Maia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M217c
2015 Maia, Larissa Prado, 1989
 Caracterização molecular e imunológica da via dos esfingolipídios
 em tecido tumoral e em células do sistema imune no câncer de mama /
 Larissa Prado Maia. - 2015.
 73 p. : il.

 Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Genética - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Genética
 molecular - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo.
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
 Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA VIA DOS
ESFINGOLIPÍDIOS EM TECIDO TUMORAL E EM CÉLULAS DO SISTEMA
IMUNE NO CÂNCER DE MAMA**

ALUNA: Larissa Prado Maia

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Dra. Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba

Data da defesa: 30/07/2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

Uberlândia-MG

2015

Dedico essa conquista aos meus pais, Antonio e Maria Dalva, que estão sempre me apoiando a alcançar os meus objetivos. São exemplos de perseverança que carregarei sempre comigo.

As minhas irmãs, Luciana e Cíntia, que mesmo distante se fazem muito presentes. Minhas eternas companheiras.

Ao meu namorado, Bruno, que esteve comigo nos momentos mais difíceis, não poupando esforços para me ajudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado durante esses anos, me iluminando pelos caminhos mais difíceis e me dado forças para concluir essa etapa.

Aos meus familiares, pelo apoio. Em especial a minha avó Isaura, as tias Iraíde e Ednalva, por se preocuparem tanto comigo, minha segunda casa em Uberlândia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, por ser um exemplo a ser seguido, com tanto conhecimento e humildade. Por ter acreditado e confiado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

A Cláudia e Patrícia, por terem me ensinado grande parte do que sei hoje, pela amizade e pela grande ajuda nesse trabalho.

A Paula, que esteve junto comigo em grande parte do estudo, me auxiliando na parte experimental.

Às Profs. Yara e Thaise, por terem contribuído diretamente para esse trabalho.

Ao Dr. Donizeti, pela atenção e disponibilidade, sempre disposto em auxiliar.

A Emília, minha roommate, pelos momentos juntas, é ótimo poder contar com você.

As Nanogirls, por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, tornando-os mais fáceis, e nos momentos de descontração.

A Lu Machado, com um coração tão puro, se tornou uma grande amiga.

A todos do Laboratório de Nanobiotecnologia, pelo convívio, auxílio e ensinamento.

A todos os meus amigos que estiveram sempre presentes, fazendo com que o meu caminho seja mais leve e fácil de ser trilhado.

As pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, que sempre em momentos tão difíceis estavam dispostas a ajudar o trabalho, e também pelo ensinamento pessoal.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro para a realização desse estudo.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 – Ciclo da Imunidade no Câncer	7
Figura 2 – Anatomia da mama.	9
Figura 3 - Biossíntese dos esfingolipídios.	12
Figura 4 – Metabolismo de S1P e Sinalização <i>inside out</i>	13
Figura 5 – Egresso dos linfócitos mediado pelo receptor S1P1.	18

Capítulo II

Fig. 1. Leukocyte-gating strategy for the measurement of S1PRs in cells subpopulations.....	51
Fig. 2. Cytotoxicity analysis of S1P in whole blood.....	52
Fig. 3. Cytokine analysis in BC and BCC whole blood supernatant.....	53
Fig. 4. Expression levels of <i>SPHK1</i> , <i>SPHK2</i> , <i>CERK</i> , <i>CERS2</i> and <i>ACER3</i> mRNA in BC and BCC whole blood.....	54
Fig. 5. Expression levels of <i>SPHK1</i> , <i>SPHK2</i> , <i>CERK</i> , <i>CERS2</i> and <i>ACER3</i> mRNA in BC and BBD tissues.....	55
Fig. 6. Characterization of S1P receptors in BC and BCC blood cells.....	56
Supplementary Fig. 1. Cytokine analysis in BC and BCC whole blood supernatant.....	58
Supplementary Fig. 2. Expression levels of <i>SPHK1</i> , <i>SPHK2</i> , <i>CERK</i> , <i>CERS2</i> and <i>ACER3</i> mRNA in BC and BCC whole blood.....	59

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Clinical parameters of patients with breast cancer.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC	transportadores da família cassete ligante de ATP
ACER	ceramidase
apoM	apolipoproteína M
C1P	ceramida-1-fosfato
CDI	carcinoma ductal infiltrante
CDIS	carcinoma ductal <i>in situ</i>
CERK	ceramida quinase
CerS	ceramida sintase
CERT	proteína transportadora de ceramida
CK	citoqueratinas
CM	câncer de mama
EDG	gene de diferenciação endotelial
EGF	fator de crescimento epidermal
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1,2	quinase regulada por sinal extracelular 1,2
GPCR	receptor acoplado à proteína G
HDL	lipoproteína de alta densidade
HER2/ErbB2/neu	receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β	interleucina-1 beta
JNK	<i>Jun quinase</i>
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NGF	fator de crescimento neural
NKT	<i>natural killers</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	proteína quinase C
PTX	picrotoxina
RE	receptor de estrógeno
RNA _m	RNA mensageiro
RP	receptor de progesterona
S1P	esfingosina-1-fosfato

SPHK1	esfingosina quinase 1
SPHK2	esfingosina quinase 2
SPPase	esfingosina-1-fosfato fosfatase
STAT3	transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TNF	fator de necrose tumoral
UTDL	unidade terminal ducto-lobular

RESUMO

A resposta imune desempenha funções fundamentais no desenvolvimento do tumor, e, interessante, a esfingosina 1-fosfato (S1P) tem emergido como um importante metabólito de sinalização implicado na diferenciação e proliferação celular. Apesar das interações entre a S1P e seus receptores favorecerem as respostas pró-tumorigênicas e inflamatórias, seus papéis na imunidade do câncer de mama não foi elucidada. Nós caracterizamos o perfil de parte dos genes envolvidos na via dos esfingolipídios, as citocinas e receptores de S1P em células de sangue e tecido de pacientes com câncer de mama (CM) com e sem tratamento quimioterápico (CMQ) e com doença benigna da mama (DBM). O grupo de CM apresentou um perfil imunossupressivo e imunoestimulatório, enquanto que o CMQ apresentou um perfil semelhante ao controle. Os níveis de mRNA de esfingosina quinase-1 estão aumentados no CM, tanto no tecido e sangue total, mas os receptores de S1P apresentaram expressão variável, dependendo do tipo células dos pacientes. Todos os receptores foram altamente expressos em linfócitos T no grupo CMQ, enquanto que os granulócitos apresentaram maiores níveis no CM. As populações de monócitos apresentaram maiores níveis dos receptores em doadores saudáveis, com exceção dos monócitos não-clássicos. Nossos achados sobre a dominância diferencial da via dos esfingolipídios em tipos celulares de diferentes grupos de pacientes, sugerem que este deve ser importante para o desenvolvimento do câncer e evasão imune, que serão posteriormente explorados.

Palavras-chave: esfingolipídios, câncer de mama, receptores de S1P, resposta imune.

SUMÁRIO

Apresentação.....	1
Capítulo I - Fundamentação Teórica.....	4
Câncer de mama.....	5
Epidemiologia e Etiologia	5
Aspectos Histopatológicos e Moleculares	8
Via de Sinalização dos Esfingolipídios	11
Biossíntese dos Esfingolipídios	11
Esfingolipídios	14
Receptores de S1P	17
Terapia anti-câncer	20
Referências Bibliográficas	22
Capítulo II - Profiling the expression of major genes of the sphingolipid pathway and effects of S1P receptors signaling in breast cancer immunity	32
Abstract.....	33
Introduction	33
Materials and methods.....	35
Patients and Controls	35
Cytotoxicity assays.....	35
Whole Blood Cell Culture and Treatment	36
Cytokines Assays	36
Gene expression analysis for <i>SphK1</i> , <i>SphK2</i> , <i>CERK</i> , <i>CERS2</i> and <i>ACER3</i>	37
Flow cytometry analysis of S1P receptors on blood cells	38
Flow Cytometry Gating Strategy.....	39
Statistical Analysis.....	39
Results	40
S1P Cytotoxicity	40
Cytokine production by whole blood cells.....	40
Relative mRNA expression of major genes of the sphingolipid pathway in blood.....	40
Relative mRNA expression of major genes of the sphingolipid pathway in breast tissues	41

S1P receptors characterization in blood cells..... 42

Discussion 42

Conflicts of Interest..... 45

Acknowledgements..... 46

References 46

Apresentação

O câncer de mama (CM) é o tipo tumoral com maior frequência em mulheres, desconsiderando apenas o câncer de pele do tipo não melanoma, e apresenta uma alta taxa de mortalidade, se tornando um problema mundial de saúde pública. É uma alteração genética herdada ou adquirida, considerada uma doença heterogênea e multifatorial, influenciada por fatores ambientais, comportamentais e reprodutivos. Por sua gênese envolver uma complexidade molecular com diversas alterações, como em vias de sinalização, e ser tão frequente na população mundial, o estudo do CM possui um impacto.

A via de sinalização dos esfingolipídios parece estar intimamente ligada à vários processos tumorais, pois dependendo da direção de biossíntese, suas moléculas podem apresentar funções pró e antitumorais, influenciando diretamente na sobrevivência e proliferação celular. A ceramida é o lipídio central da via, que originará diversos outros esfingolipídios que apresentam funções primordiais. A ceramida, esfingosina e esfingosina 1-fosfato (S1P) fazem parte de um reostato que, dependendo da situação, acarretará em morte ou sobrevivência celular. Quando esse reostato está em favor da ceramida e da esfingosina, a célula entra em apoptose, já quando o reostato muda em favor de S1P, prevalece a sobrevivência celular. A S1P exerce suas funções de modo intra e extracelular, sendo que a sinalização *inside out* ocorre por meio da interação desse lipídio com 5 receptores acoplados a proteína G, S1P1-5, cuja ativação resultará em funções que irão diferir em cada tipo celular.

No Capítulo I desse trabalho, apresentamos uma revisão bibliográfica abordando a gênese do CM, o perfil epidemiológico dessa doença, além dos aspectos histopatológicos e moleculares. Também abordamos o metabolismo dos esfingolipídios, descrevendo as características dessa via e sua influência no câncer e resposta imune, destacando as funções dos receptores de S1P.

No Capítulo II, apresentamos a caracterização do perfil de citocinas em sangue de pacientes com CM com e sem tratamento de quimioterapia (CMQ) pelo ensaio de microesferas fluorescentes em citometria de fluxo (Kit CBA Th1/Th2/Th17). Além disso, analisamos a expressão gênica de parte da via dos esfingolipídios nessas amostras biológicas e em tecido de pacientes com doença benigna da mama (DBM) e CM, por PCR em Tempo Real. Ainda, realizamos a

caracterização dos cinco receptores de S1P em linfócitos T, granulócitos e monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) de pacientes com CM e CMQ, por citometria de fluxo.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

Câncer de mama

Epidemiologia e Etiologia

O câncer de mama (CM) é a neoplasia mais incidente mundialmente em mulheres (excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma), e estima-se que houve aproximadamente 1.7 milhões (25,2%) de casos novos desse tipo de câncer no ano de 2012 no mundo (WHO, 2014). Esse número vem crescendo progressivamente, uma vez que eram esperados 1.29 milhões de novos casos no mundo para o ano de 2008 (WHO, 2008). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, que também são válidas para o ano de 2015, apontam a ocorrência de 57.120 novos casos de CM, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres, já que o câncer de pele do tipo não melanoma é o de maior ocorrência nesse país (83.710 mil casos novos). Esse perfil se repete nas regiões Sudeste (71,18/ 100 mil), Sul (70,98/ 100 mil), Centro-Oeste (51,30/ 100 mil) e Nordeste (36,74/ 100 mil) do Brasil. Já na região Norte, o CM é o terceiro tipo de tumor mais incidente (21,29/ 100 mil) (INCA, 2014).

Apesar da chance de cura do CM ser alta se o diagnóstico for precoce e o tratamento adequado (PAHO, 2012), essa neoplasia continua sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo todo, com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012 (WHO, 2014). A sobrevida do câncer de mama, após 5 anos do surgimento da doença, tem se mantido estável nos últimos anos. Nos países desenvolvidos esse valor é de 85%, enquanto que em países em desenvolvimento a sobrevida é baixa, ficando entre 50 a 60% (INCA, 2014). Essa melhor condição de sobrevida que ocorre em países mais ricos deve-se provavelmente ao acesso das mulheres a exames de rastreamento como a mamografia e a tratamentos adjuvantes como quimioterapia, terapia hormonal, entre outros (BERRY et al., 2005; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005).

A tumorigênese, de acordo com diversas linhas de estudos, é um processo composto por várias etapas que convergem em alterações genéticas, conduzindo a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). O câncer é originado de uma única célula que sofreu

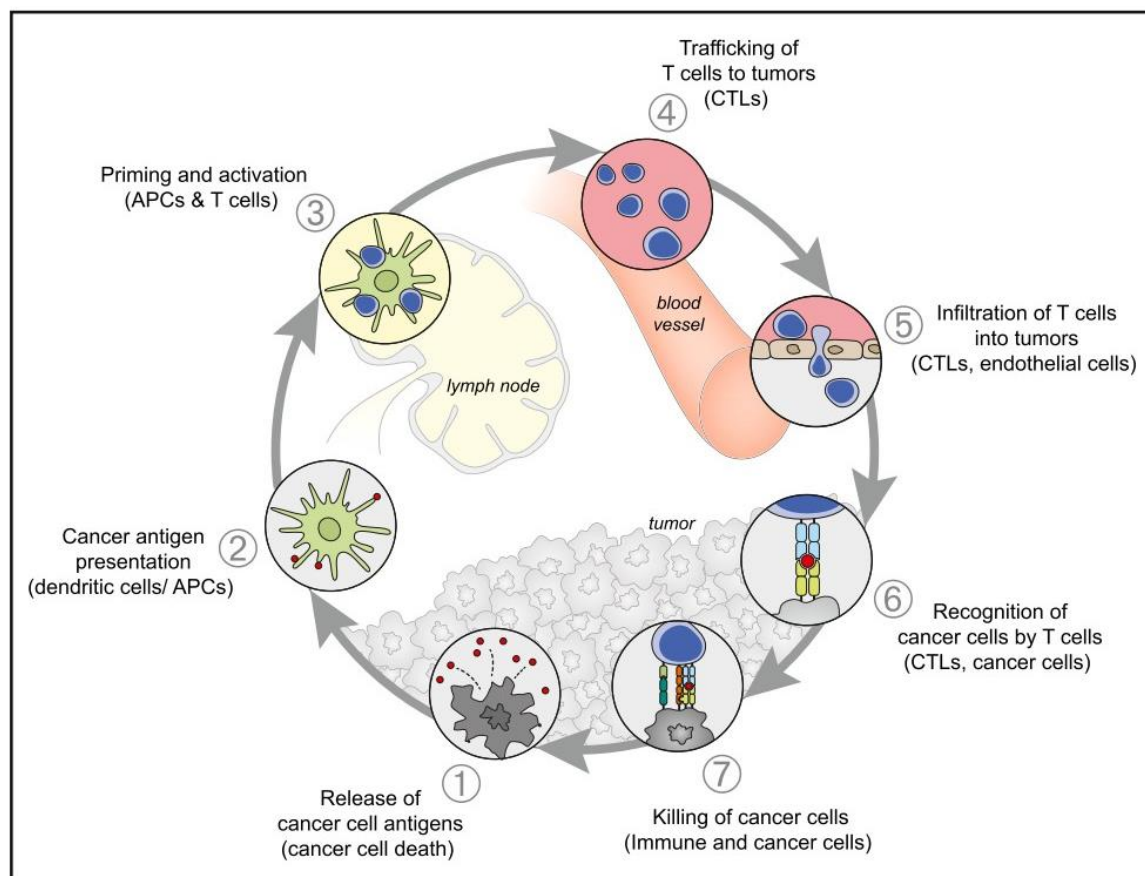
uma mutação inicial, entretanto, os descendentes desta célula precisam passar por várias outras mudanças, exigindo inúmeras mutações adicionais e eventos epigenéticos, para se tornar cancerígena (ALBERTS, 2008).

Atualmente são conhecidos mais de 100 tipos de cânceres. Apesar de tamanha diversidade, foram propostas seis características que ocorrem na maioria ou em todos os tipos de tumores, como: autossuficiência em sinais de crescimento celular, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento celular, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual e metástase. Tais características são capacidades funcionais adquiridas que permitem as células cancerosas sobreviverem e proliferarem, promovendo assim o crescimento tumoral e a disseminação metastática. (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

Posteriormente, foram acrescentadas mais duas características que permitem o desenvolvimento de células cancerosas: a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imunológica. Essa capacidade funcional das células tumorais se torna possível devido à duas características adquiridas: a instabilidade genômica, que promove mutações diversas, e a inflamação, com múltiplas funções relacionadas com o desenvolvimento do câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

A inflamação ocorre devido à produção dos antígenos tumorais pelas células cancerígenas e a resposta imune anticâncer só é eficaz quando o ciclo da imunidade no câncer é concluído (Figura 1). Primeiramente, esses antígenos são liberados pelas células tumorais (1º passo) e alguns fatores estimulante devem estar presentes, como citocinas pro-inflamatórias e alguns fatores liberados pelas morte das células tumorais. Esses antígenos são capturados pelas células dendríticas que irão apresentá-los em complexo de histocompatibilidade I e II (MHC I e II) a linfócitos T (2º passo), promovendo a ativação de células T citotóxicas (CTLs) (3º passo), e posterior migração (4º passo) e infiltração no tumor (5º passo). Essas células irão reconhecer especificamente as células tumorais (6º passo) para efetivar a morte celular por citotoxicidade (7º passo). Durante a morte celular, alguns antígenos são liberados dando início novamente ao 1º passo, desencadeando o ciclo. Entretanto, em pacientes com câncer pode haver falhas durante o ciclo, como os antígenos não serem detectados, as células T e dendríticas não reconhecerem os antígenos como auto-antígenos, as células T podem não migrar para o tumor ou não infiltrar, e também, os fatores do microambiente tumoral podem suprimir linfócitos (CHEN; MELLMAN, 2013).

Figura 1 – Ciclo da Imunidade no Câncer



Fonte: (CHEN; MELLMAN, 2013)

A resposta imune no câncer é um processo cíclico que pode ser auto propagado. Esse ciclo consiste em sete etapas, e se inicia com liberação de antígenos pelas células tumorais, envolve as células dendríticas e células T e termina com a morte destas células. Durante o ciclo, há produção de fatores imunoestimuladores, que irão aumentar a resposta das células T. Entretanto, também há produção de fatores inibitórios, que levam ao mecanismo de feedback regulatório da resposta imune.

Recentemente, o CM tem sido reconhecido por ser não uma única doença, mas por grupos de doenças diferentes que afetam o mesmo órgão e se originam da mesma estrutura anatômica, e que, no entanto, apresentam diferentes fatores de risco, condições clínicas, características histopatológicas, evolução da doença e resposta a tratamentos (REIS-FILHO; PUSZTAI, 2011). Acredita-se que a interação da exposição ao meio ambiente com fatores genéticos, hormonais, culturais e comportamentais, além do estilo de vida, está envolvida no desenvolvimento e progressão do CM (JOHNSON-THOMPSON; GUTHRIE, 2000). Dentre esses fatores de risco, a idade avançada é um dos mais importantes, sendo que a incidência é baixa até os 25 anos de idade, dobrando

a cada 10 anos até a menopausa e aumentando em até 100 vezes aos 45 anos (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000; DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

O desenvolvimento dessa patologia também pode ser determinado de acordo com fatores reprodutivos: a menarca precoce, provavelmente devido à exposição prolongada do epitélio da mama à progesterona e estrógeno, ou também pelos altos níveis de estradiol que essas mulheres produzem durante a adolescência (BERNSTEIN, 2002); a menopausa tardia, já que as mulheres possuem um número maior de ciclos ovulatórios, de forma que mulheres que iniciam a menopausa após os 55 anos de idade são duas vezes mais propícias a desenvolverem o CM do que as que iniciam antes de 45 anos; a primeira gestação tardia, pois as mulheres que tem sua primeira gravidez após os 30 anos de idade possuem um risco duas vezes maior de desenvolver o CM do que as engravidam até os 30 anos (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000); e a nuliparidade, uma vez que a gravidez parece ter um efeito protetor, possivelmente devido a susceptibilidade reduzida de transformação da glândula mamária em carcinógenos e diminuição da atividade proliferativa (SIVARAMAN; MEDINA, 2002; RUSSO; RUSSO, 2011).

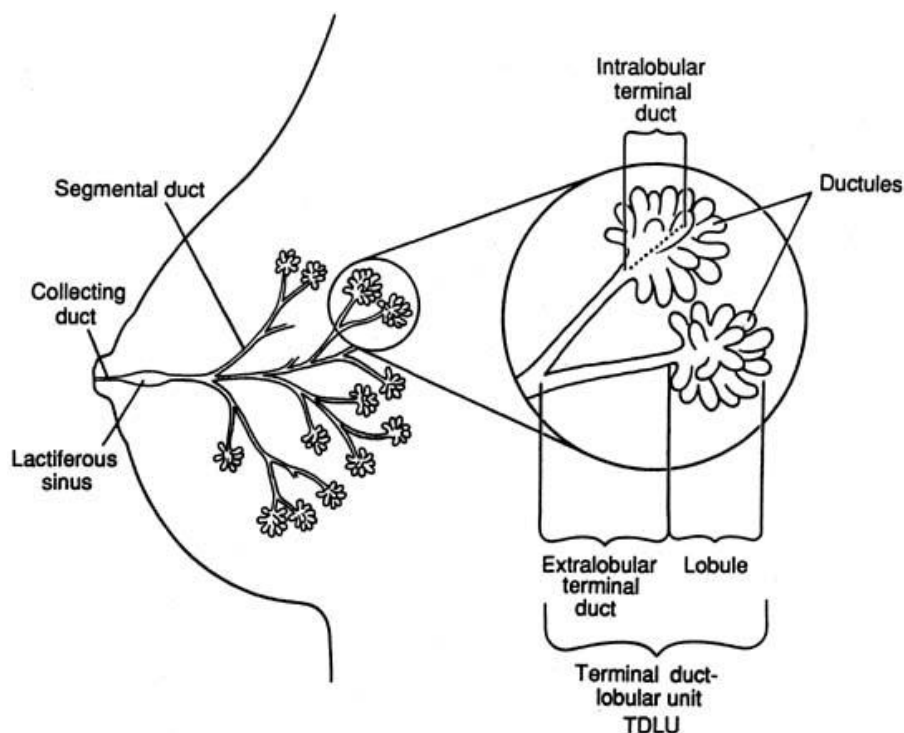
Outros fatores de risco também são considerados importantes para o desenvolvimento do CM: a hiperplasia atípica prévia, já que as mulheres que possuem essa doença apresentam um risco 4 a 5 vezes maior de desenvolver o CM em relação às que não possuem (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000); o estilo de vida, como a dieta contendo agentes genotóxicos (BUTLER; FURNIVAL; HART, 1995) e/ou rica em gordura, principalmente insaturada (VELIE et al., 2000), bem como a ingestão de álcool (SINGLETARY; GAPSTUR, 2001); o uso de contraceptivos orais (CANCER, C. G. O. H. F. I. B. C. C., 1996); e a terapia de reposição hormonal (CANCER, C. G. O. H. F. I. B., 1997; ROSS et al., 2000). Já os casos de CM hereditários, estão, em grande parte, envolvidos com os genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* (BUCHHOLZ et al., 1999; DE JONG et al., 2002), localizados no braço longo dos cromossomos 17 e 13 (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

Aspectos Histopatológicos e Moleculares

A mama é formada por lobos ou glândulas mamárias que partem do mamilo, sendo que cada lobo é uma glândula tubuloalveolar composta por vários lóbulos e por um sistema de ductos ramificados (OVALLE; NAHIRNEY, 2014). Este sistema pode ser

dividido em dois grupos: a unidade terminal ducto-lobular (UTDL) (Figura 2), que consiste em um lóbulo e um ducto terminal, e os grandes ductos (SCHMITT; GOBBI, 2006). A UTDL é a subunidade anatômica da mama mais importante, onde é encontrada a maioria das patologias desse órgão (HINDLE, 1998). As células epiteliais que revestem os ductos e lóbulos estão arranjadas em duas camadas distintas: uma superficial, formada por células mioepiteliais, com morfologia variável, e outra interna, composta por células luminais, células colunares que apresentam capacidade de secreção e absorção de fluidos. Toda esta estrutura encontra-se circundada pela membrana basal, juntamente com os fibroblastos (SCHMITT; GOBBI, 2006).

Figura 2 – Anatomia da mama.



Fonte: (HINDLE, 1998).

Representação diagramática de um lobo, ressaltando a unidade terminal ducto-lobular, formada por um lóbulo e um ducto terminal extralobular.

O CM pode ser classificado histologicamente em carcinoma *in situ*, quando não há invasão estromal, e carcinoma infiltrante (invasivo), quando há invasão no estroma independente de uma ocorrência *in situ*. O carcinoma de mama *in situ* é subdividido em ductal ou lobular, diferenciados pelos padrões de crescimento e as características citológicas. Entre eles, o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é consideravelmente mais

comum, correspondendo a cerca de 25% dos casos de câncer de mama, e pode ser classificado de acordo com o padrão arquitetural em: papilar, micropapilar, cribriforme, sólido e comedocarcinoma (ADASP, 2004; SCHMITT; GOBBI, 2006). Já os carcinomas infiltrantes formam um grupo mais diversificado, com diversos subtipos, como: ductal, lobular, tubular, medular, mucinoso, secretório, papilar infiltrante, cribriforme infiltrante, metaplástico, entre outros (ADASP, 2004). Entre eles, o carcinoma ductal infiltrante (CDI) é o subtipo mais comum (75%) (LI, C. I. et al., 2003). Ainda, o CDI pode ser classificado em 3 graus diferentes de acordo com algumas características como: pleomorfismo nuclear, formação glandular/tubular e índice mitótico, sendo: Grau 1 - bem diferenciado, Grau 2 - moderadamente diferenciado, Grau 3 - pouco diferenciado (ADASP, 2004; MALHOTRA et al., 2010).

Ao analisar a expressão de genes envolvidos no câncer de mama, como receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/ErbB2/neu), citoqueratinas (CK), proteína p53, genes relacionados ao RE e com a proliferação, entre outros, foi possível classificar essa doença molecularmente. Inicialmente foram identificados os seguintes subtipos: basal-símile (RE⁻/RP⁻/HER2⁻/CK5/14⁺/EGFR⁺), superexpressão do HER2 (RE⁻/HER2⁺), normal-símile (assinatura de genes do tecido adiposo⁺), luminal A (RE^{high}/HER2^{low}) e luminal B (RE^{low}/HER2^{low}/proliferação^{high}) (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; MALHOTRA et al., 2010). Posteriormente, um outro subtipo também foi identificado e denominado *claudin-low* (RE⁻, Claudina 3/4/7^{low}, vimentina⁺, E-caderina^{low}, Zeb1⁺), sendo a maioria de ruim prognóstico (HERSCHKOWITZ et al., 2007; PRAT et al., 2010).

Os subtipos basal-símile e superexpressão do HER2 apresentam um prognóstico ruim e tempo de sobrevivência menor quando comparados com os subtipos luminal A e B, provavelmente devido à ausência na expressão do RE. Já entre os subtipos luminal, o B possui pior prognóstico (SORLIE et al., 2001; ZEPEDA-CASTILLA et al., 2008). Também há uma diferença na resposta aos tratamentos relacionada à expressão desses genes, uma vez que na presença de RE (BAST et al., 2001) e ausência de HER2 (RASTELLI; CRISPINO, 2008), há uma boa resposta ao tratamento endócrino, e quando o RE está ausente, a resposta ao tratamento quimioterápico é melhor (RING et al., 2004; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, 2005).

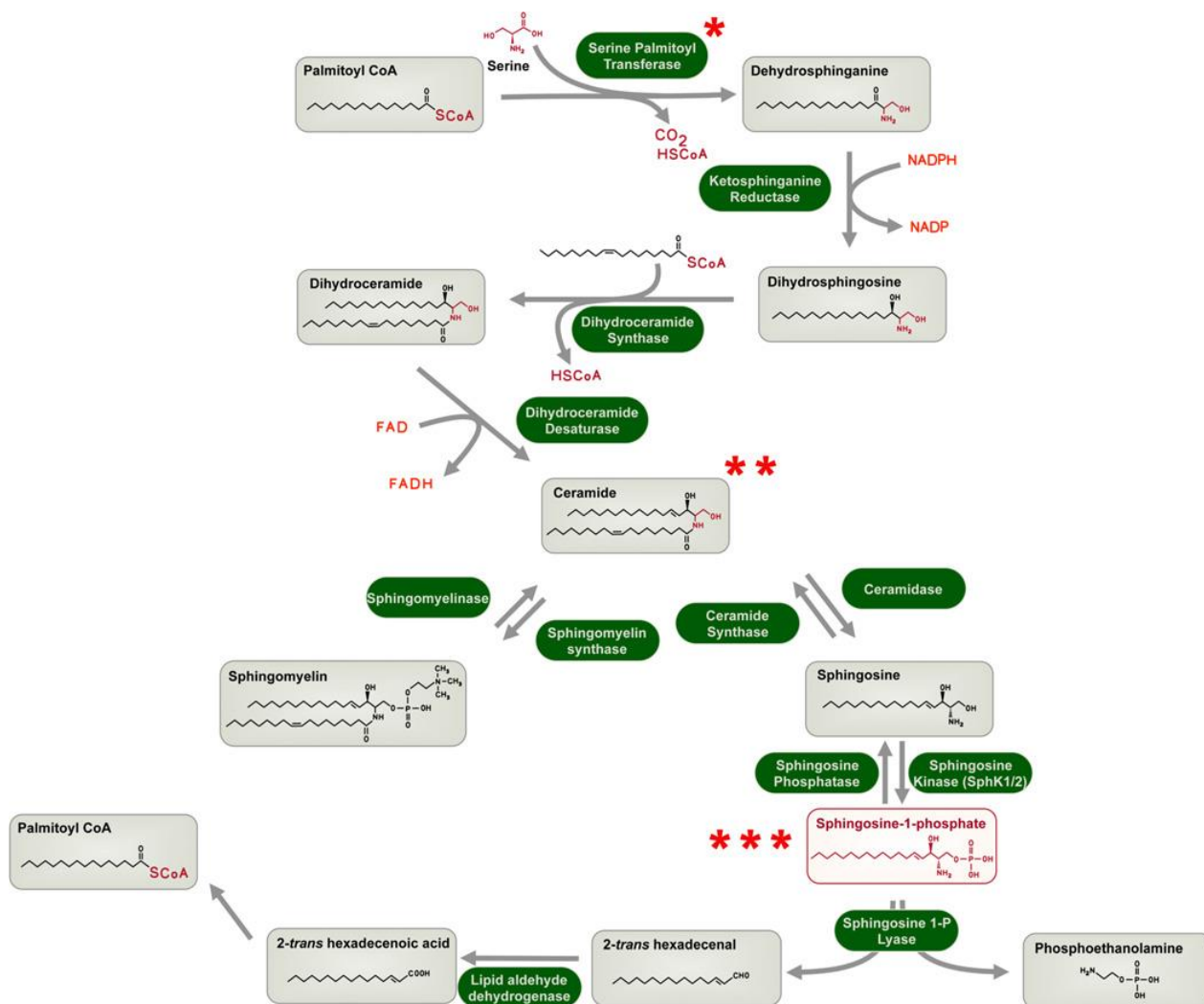
Via de Sinalização dos Esfingolipídios

Biossíntese dos Esfingolipídios

Os lipídios eram reconhecidos por muitos anos apenas por serem componentes da membrana celular e moléculas armazenadoras de energia. Entretanto, nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente a participação dos lipídios como moléculas de sinalização para os processos celulares vitais (HUWILER; ZANGEMEISTER-WITTKE, 2007). Os esfingolipídios compõem a segunda maior classe de lipídios de membrana. São conhecidos mais de 300 tipos de esfingolipídios, sendo que todos possuem uma longa cadeia hidrocarbônica, a base esfingóide, no entanto se diferem devido ao grupo que compõe a cabeça de sua estrutura molecular (MERRILL et al., 1997). Esses lipídios são importantes moléculas sinalizadoras, que estão envolvidas em processos celulares como crescimento celular, sobrevivência, migração de células imunes, integridade vascular e epitelial, e possuem um papel especial na inflamação e câncer. A ceramida, esfingosina e esfingomielina, dentre vários metabólitos, fazem parte desse grande complexo (MERRILL et al., 1997; HANNUN; OBEID, 2008; MACEYKA; SPIEGEL, 2014).

A ceramida é o lipídio central no metabolismo dos esfingolípídeos, sintetizada por dois mecanismos diferentes (Figura 3), sendo que a via de novo é o principal deles. Este processo ocorre por meio da condensação da serina e do palmitoil-CoA no retículo endoplasmático com ação da enzima serina palmitoil-CoA transferase, formando a 3-ceto-dihidroesfingosina, que, por sua vez, é convertida em dihidroesfingosina, a qual é acetilada em dihidroceramida pela ceramida sintase (CerS ou Lass), e a sua dessaturação leva à formação de Cer (LINN et al., 2001; HANNUN; OBEID, 2008). No total, existem 6 genes que irão produzir diferentes CerS, diferindo na porção C-terminal, que conseqüentemente, utilizarão diversos acil-CoA, originando diferentes Cer (CerS1, C18; CerS2, C22-24; CerS3, C16-26; CerS4, C18/C20; CerS5, C16; CerS6, C14-16) (PATWARDHAN; LIU, 2011). O outro mecanismo de produção de Cer é resultado da hidrólise da esfingomielina pelas esfingomielinases (LIU; OBEID; HANNUN, 1997; XU et al., 2010).

Figura 3 - Biossíntese dos esfingolipídios.



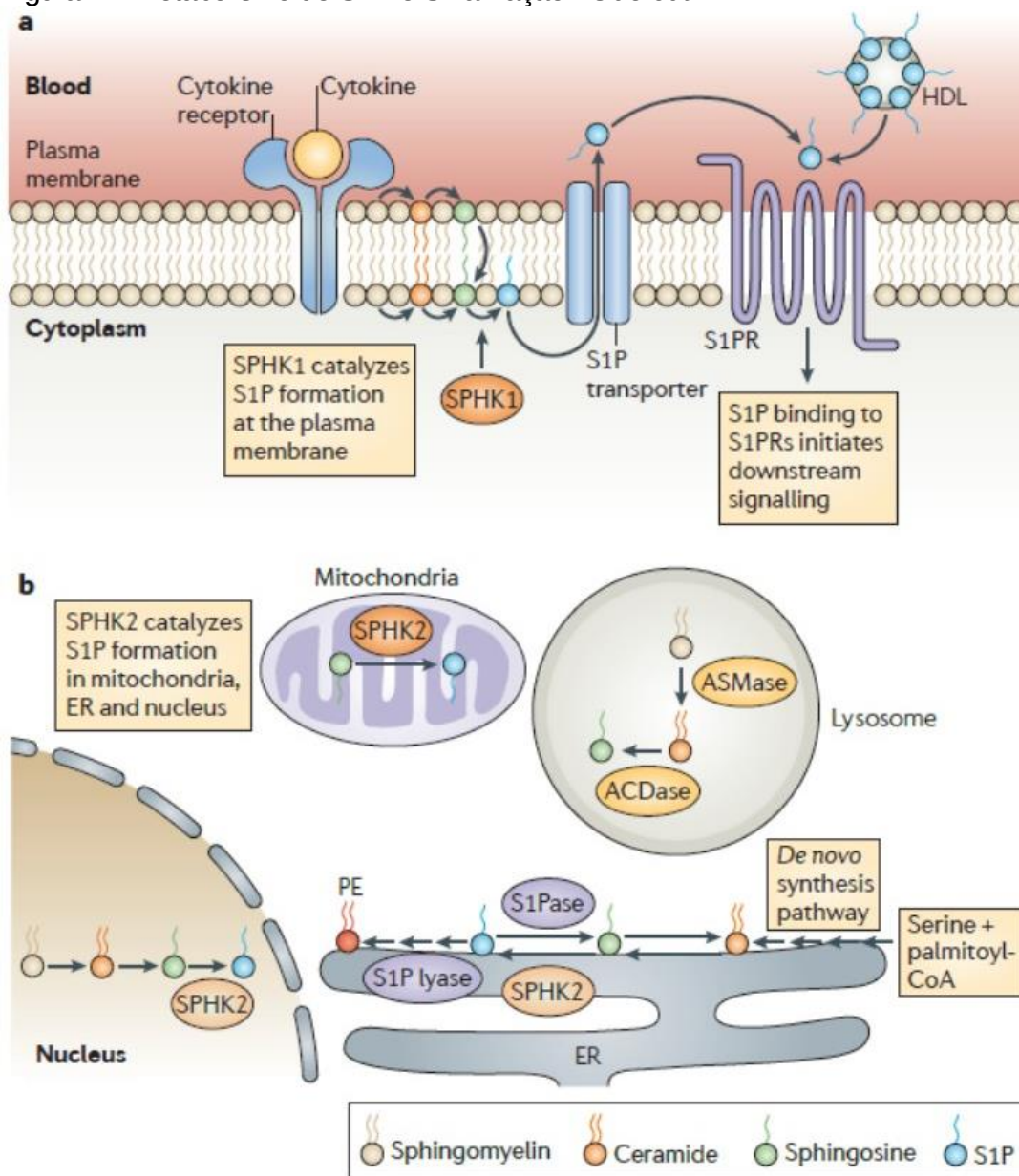
Fonte: (HLA; DANNENBERG, 2012).

O metabolismo dos esfingolipídios se inicia com a formação de ceramida pela via de novo ou pela hidrólise da esfingomielina. Os lipídios estão indicados em caixas e as enzimas em balões verdes. As principais etapas de regulação estão sinalizadas com asteriscos: * regulação da enzima serina palmitoil transferase; ** transporte da ceramida do retículo endoplasmático para o complexo golgi pela proteína ceramida transferase; *** S1P intracelular é secretado pelo transportador Spns2 para mediar a ação extracelular nos receptores de S1P.

Para que possa sofrer modificações, a ceramida é transportada do retículo endoplasmático para o complexo de golgi, por transporte vesicular e não vesicular (FUKASAWA; NISHIJIMA; HANADA, 1999). A proteína transportadora de ceramida (CERT) é responsável pela a maior parte desse transporte (HANADA et al., 2003). Ao ser metabolizada, a ceramida originará diferentes esfingolipídios, sendo que sua fosforilação

pela ação da enzima ceramida quinase (CERK) levará à formação da ceramida-1-fosfato (C1P) (SUGIURA et al., 2002). A deacetilação da ceramida pela ceramidase (ACER) dará origem à esfingosina, que pode ser revertida em ceramida pela ceramida sintase (CerS) ou ser fosforilada pelas esfingosina quinases (SPHKs) produzindo a esfingosina-1-fosfato (S1P) (CHALFANT; SPIEGEL, 2005) (Figura 3). Existem duas isoformas de SPHK (1 e 2), as quais diferem quanto à localização celular, de forma que a SPHK1 localiza-se predominante no citoplasma enquanto que a SPHK2 está mais presente no compartimento nuclear (PYNE; PYNE, 2010) (Figura 4).

Figura 4 – Metabolismo de S1P e Sinalização *inside out*.



Fonte: (SPIEGEL; MILSTIEN, 2011).

(a) A esfingosina 1-fosfato (S1P) é sintetizada pela fosforilação da esfingosina por meio da esfingosina quinase 1 (SPHK1) na membrana plasmática, e pode ser transportada para o meio extracelular mediante a estímulos e se ligar aos receptores específicos (S1PR), iniciando a sinalização *inside out*. No sangue, a S1P pode se ligar à albumina e lipoproteína de alta densidade (HDL), podendo ativar os S1PRs. (b) A S1P também pode ser originada no retículo endoplasmático (RE), mitocôndria e núcleo pela SPHK2. No RE, a S1P pode ser degradada irreversivelmente pela S1P liase ou defosforilada em esfingosina pela S1P fosfatase (S1Pase), enquanto que no núcleo e mitocôndria a S1P tem alvos intracelulares diretos.

A S1P, assim que sintetizada, pode ser liberada para fora da célula por transportadores da família cassete ligante de ATP (ABC), possivelmente pelo ABCA1, ABCB1 e ABCC1 (IHLEFELD et al., 2015). Uma outra proteína transportadora, a Spinster 2, foi identificada recentemente em zebrafish e parece ser específica para o transporte de S1P (KAWAHARA et al., 2009). Fora da célula, a S1P encontra-se principalmente associada à lipoproteína de alta densidade (HDL), e também à albumina (CHRISTOFFERSEN et al., 2011). Após ser liberada, a S1P pode se ligar a cinco receptores de membrana diferentes desencadeando a sinalização *inside-out* (Figura 4). Todos os receptores são acoplados à proteína G (S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, S1P5), sendo que a célula sofrerá determinado estímulo de acordo com a expressão dos receptores e das proteínas G (PYNE; PYNE, 2010). A S1P, por fim, pode ser degradada por um processo reversível, por meio de sua defosforilação em esfingosina pela S1P fosfatase (SPPase), e por um processo irreversível, pela ação da S1P liase, formando etanolamina-1-fosfato e palmitaldeído (SPIEGEL; MILSTIEN, 2003).

Esfolingolípídios

A ceramida está envolvida na regulação de processos biológicos fundamentais como respostas ao estresse, senescência celular e apoptose (HANNUN; OBEID, 2002; PASCHALL et al., 2014). Sua síntese, independente do mecanismo de formação, ocorre em resposta a fatores indutores de estresse, como: fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento neural (NGF), interleucina-1 β (IL-1 β), 1,25-dihidroxitamina D3, estresse ambiental (calor e radiação ultravioleta), agentes quimioterápicos, antígeno Fas e senescência celular (LIU; OBEID; HANNUN, 1997; CHALFANT; SPIEGEL, 2005). Esse lípídio é um ativador de enzimas fosfatases das proteínas serina/treonina que estão envolvidas na apoptose e, dessa forma, a ceramida executa um papel pró-apoptótico. A

ativação das fosfatases desencadeia a defosforilação de proteínas SR, uma família de proteínas com domínios de serina/arginina que, modulando o *splicing* do RNA mensageiro (RNAm), reduz os níveis da proteína anti-apoptótica Bclx (L) e aumenta os níveis da proteína apoptótica Bclx (S) (CHALFANT et al., 2002).

Foi demonstrado que a CERT está superregulada no câncer e esse perfil está associado à resistência a múltiplas drogas. A inibição dessa proteína provoca acúmulo de ceramida no retículo endoplasmático e sensibiliza as células cancerosas a múltiplos quimioterápicos, aparentemente por meio da potenciação de estresse do retículo endoplasmático (BECKHAM et al., 2010; GATT; DAGAN, 2012).

Já a C1P desempenha papéis em processos celulares como fagocitose, proliferação, migração e sobrevivência celular, além de possuir propriedades anti-apoptóticas e ser importante na mediação da resposta pró-inflamatória (BOATH et al., 2008). Diferente da ceramida, a C1P é um potente inibidor de fosfatases das proteínas serina/treonina e, em vista da correlação entre a inibição das fosfatases e ativação da via ERK1/2 promovida por esse lipídio, sugere-se um efeito mitogênico e de indução da sobrevivência, via essa que regula aspectos fundamentais da função normal na célula como metabolismo, secreção e expressão gênica (DOUGHERTY et al., 2005; HANCOCK; DANGI; SHAPIRO, 2005).

A C1P estimula ainda as vias fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e *Jun quinase* (JNK) (PATWARDHAN; LIU, 2011). Outras funções atribuídas a este metabólito incluem a estimulação da proliferação e migração celular (GOMEZ-MUNOZ et al., 2010). Recentemente, evidências indicam que a C1P tem efeitos sob a migração de células tumorais em modelos murinos, através da ligação ao receptor acoplado à proteína G (GPCR) sensível à picrotoxina (PTX), dependente da ativação da proteína G. Contudo, os receptores específicos que se ligam a C1P ainda não foram identificados (GRANADO et al., 2009).

As isoformas que dão origem à S1P apresentam papéis opostos, uma vez que a elevada expressão de SPHK1 desencadeia a ativação cascatas pró-tumorais, enquanto que altos níveis de SPHK2 parece gerar uma cascata de reações antitumorais, apesar de sua função não estar bem definida (PYNE; PYNE, 2010). Essas enzimas são ativadas por fatores de crescimento, citocinas, hormônios e fatores antigênicos importantes para o câncer, como estradiol, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento endotelial vascular (TAKABE;

SPIEGEL, 2014). A S1P produzida por SPHK2 no núcleo está relacionada com a regulação epigenética, uma vez que é um inibidor de histona deacetilase (HAIT et al., 2009). Também já foi demonstrado o seu envolvimento juntamente com a SPPase na reciclagem de esfingosina, convertendo S1P até originar ceramida novamente. Entretanto, pouco se sabe sobre a SPHK2, sendo que os estudos são mais voltados para o entendimento da SPHK1 e seu metabólito (MACEYKA et al., 2005).

As primeiras funções da S1P que foram descritas e apresentaram grande relevância foram a regulação do crescimento celular (ZHANG et al., 1991) e a supressão da apoptose (CUVILLIER et al., 1996). Depois disso, foi demonstrado que a S1P também desempenha outras atividades como regulação da motilidade e invasão celular, angiogênese e maturação vascular, migração de linfócitos e regulação imune, além de estar relacionado com o câncer, alergias, aterosclerose e doenças autoimunes (TAKABE et al., 2008). A sinalização *inside-out* de S1P parece contribuir de forma crucial na inibição de apoptose. Existem evidências de que a S1P exógena aumenta a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2 e MCL1 e, ao mesmo tempo, atua diminuindo as proteínas pró-apoptóticas BAD e BAX (LI, W. et al., 2009). Ainda, a S1P pode se ligar ao receptor de TNF associado ao fator 2 (TRAF2) e estimular a atividade da ubiquitina ligase (E3), importantes na ativação da via sinalizadora do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que está envolvida em processos celulares como inflamação, resposta imune e anti-apoptose (ALVAREZ et al., 2010).

Estudos descrevem a grande associação da S1P à estabilização e proliferação do carcinoma. Esse esfingolípido exerce funções cujos efeitos podem culminar no desequilíbrio entre homeostase e progressão tumoral (ALEMANY et al., 2007; VADAS et al., 2008). Há vários relatos sobre a presença de S1P nas células tumorais demonstrando que níveis elevados desse esfingolípido derivado da SPHK1 foram encontrados em diversos tipos de cânceres, como câncer de mama, cérebro, pulmão, ovário e útero (FRENCH et al., 2003; PYNE; PYNE, 2010). Além disso, a superexpressão de SPHK1 está correlacionada com a inibição da apoptose e indução à quimioresistência em vários tipos de câncer (BEKTAS et al., 2005; SOBUE et al., 2008). Ainda, o aumento na expressão desse lipídio está associada ao pior prognóstico no câncer de mama (RUCKHABERLE et al., 2008) e de estômago (LI, W. et al., 2009). BECKHAM e colaboradores (2010) demonstraram que a superexpressão da ceramidase está presente em mais de 60% dos cânceres da próstata e 70% dos cânceres da cabeça e do pescoço,

com um aumento da incidência de superexpressão em tumores de grau mais elevados, e a inibição da sua atividade mostrou um efeito anticâncer em células de melanoma e câncer de colon (ZEIDAN; HANNUN, 2007).

Os eritrócitos são a maior fonte de S1P no sangue, e apesar de não serem capazes de sintetizar a esfingosina, possuem altos níveis de SPHK e importam esfingosina do meio extracelular. Além disso, essas células não possuem a enzima de degradação de S1P, a S1P liase, contribuindo para a armazenar e proteger este lipídio da degradação. As células endoteliais também são responsáveis por grande parte de S1P no plasma, bem como os trombócitos. Outras células já foram identificadas como fonte de S1P no plasma, como neutrófilos e macrófagos, mas ainda não existem muitos estudos que esclareçam como esse processo ocorre. Além disso, os neutrófilos e células mononucleares do sangue também apresentam alta atividade de SPHK (THUY et al., 2014).

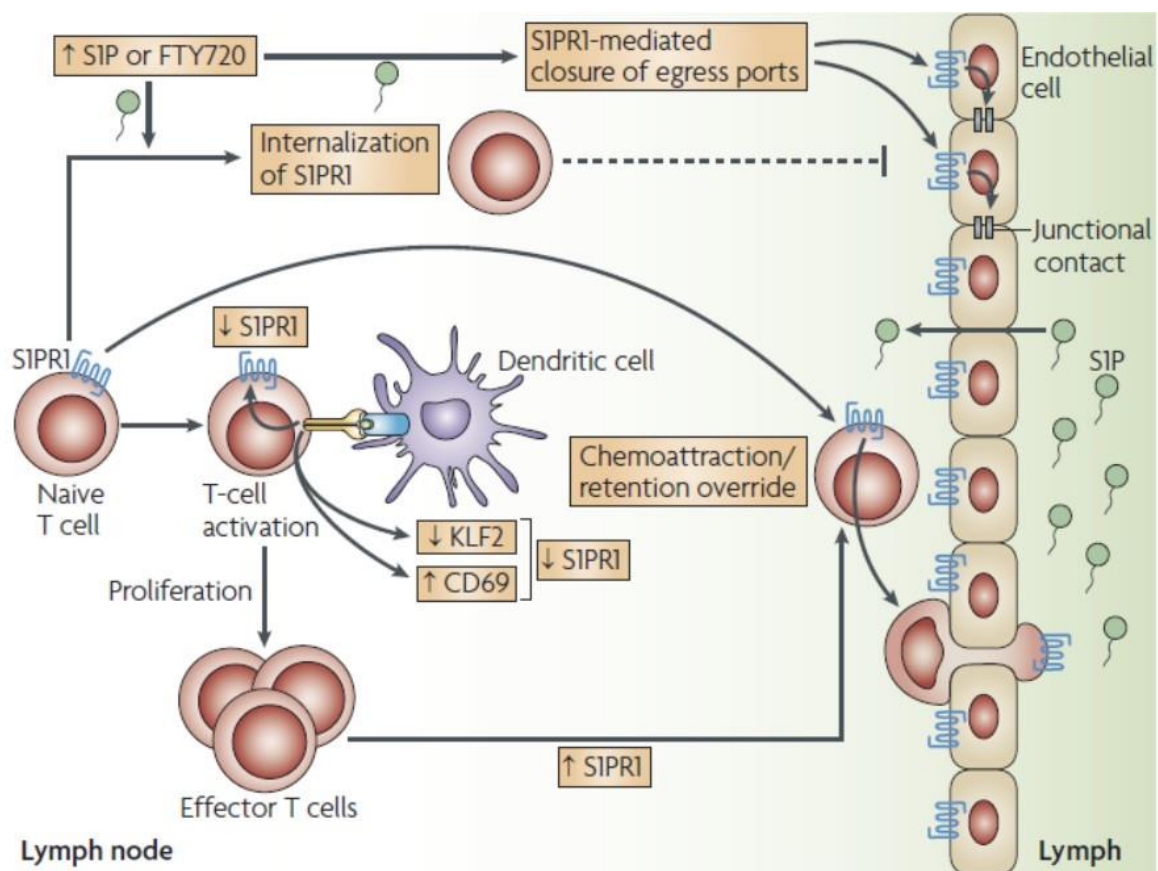
Receptores de S1P

Os receptores de S1P, conhecidos originalmente por gene de diferenciação endotelial (EDG) (HLA; MACIAG, 1990), assim que ativados, são internalizados desencadeando a ativação de vias de sinalização intracelular. Esses receptores também podem ser translocados para o núcleo, ativando vias de sinalização nuclear. Após a remoção do ligante, os receptores podem ser reciclados para a membrana plasmática ou serem transportados para lisossomos para degradação (VERZIJI; PETERS; ALEWIJNSE, 2010).

As células podem expressar mais de um tipo de receptor, sendo que o 1, 2 e 3 estão expressos em vários tecidos, e o 4 é mais expresso no tecido linfático e hematopoiético, e o 5 no sistema nervoso central (SANCHEZ; HLA, 2004). As células endoteliais expressam os receptores S1P1 e 3, já as musculares lisas vasculares, o S1P2 e 3, e as musculares cardíacas expressam S1P1, 2 e 3. (ROSEN et al., 2009). No sistema imune também há uma diversidade na expressão dos receptores, uma vez que as células dendríticas possuem todos os receptores, enquanto que as células T expressam S1P1 e 4, as células B apresentam o S1P1 e 3, os macrófagos expressam S1P1 e 2, os eosinófilos possuem S1P1, 2 e 3 (RIVERA; PROIA; OLIVERA, 2008) e os neutrófilos S1P1, 4 e 5 (RAHAMAN et al., 2006).

O S1P1 é o receptor mais estudado e tem função importante de mobilidade celular, agindo no controle da migração de várias células do sistema imune, como linfócitos, células *natural killers* (NKT), células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e osteoclastos (SPIEGEL; MILSTIEN, 2011). Uma das principais funções desse receptor é sobre o egresso das células T dos órgãos linfóides para a linfa. Em concentrações normais no plasma, a S1P é capaz de promover a quimiotaxia de células T. Quando essas células sofrem ativação mediada pelo receptor de células T nos órgãos linfóides, ocorre a supressão da expressão dos receptores S1P1 e 4, impedindo a resposta de quimiotaxia à S1P (GRAELER; GOETZL, 2002). As células T efetoras são capazes de re-expressar o S1P1 e migrarem do linfonodo para a linfa, e para os tecidos periféricos. Já em resposta a altos níveis de S1P nos tecidos linfáticos, os linfócitos internalizam o S1P1, de forma que a expressão desse receptor é determinante para o egresso dessas células (THANGADA et al., 2010) (Figura 5).

Figura 5 – Egresso dos linfócitos mediado pelo receptor S1P1.



Fonte: (RIVERA; PROIA; OLIVERA, 2008).

Os níveis de esfingosina 1-fosfato são menores nos tecidos linfáticos se comparados à linfa, formando um gradiente de S1P. Os receptores de S1P (S1PR) são responsivos ao gradiente de S1P e promovem o egresso das células T dos órgãos linfáticos para a linfa. Após a ativação das células T, a expressão do S1PR1

diminui. O mecanismo inclui interação direta com o CD69, induzindo a produção de interferon I, reduzindo o fator de transcrição tipo Kruppel 2 (KFL2), que é um ativador direto do gene *S1PR1*. As células T efetoras reexpressam o *S1PR1* e egressam do linfonodo para a linfa, e para tecidos periféricos. Se os níveis de S1P estão altos, as células T sofrem bloqueio de vários mecanismos: diminuição do *S1PR1*, egresso mediado por *S1PR1* e dissipação do gradiente de S1P.

Além disso, foi demonstrado que esse receptor está relacionado com o câncer, visto que o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) pode se ligar no promotor de *S1P1*, e essa regulação, facilitada por S1P e IL-6, contribui para a atividade persistente de STAT3 no tumor, promovendo a progressão maligna (Figura 6) (LEE et al., 2010). Em fibroblastos de pulmão saudáveis, o receptor *S1P1* protegeu as células da apoptose ao induzir a ativação da proteína anti-apoptótica Mcl1, por meio das vias mediadas por PI3K e proteína quinase C (PKC), e diminuir a expressão da proteína pró-apoptótica *BH3-only*, Bim, por meio da via das quinases reguladas por sinal extracelular 1,2 (ERK1,2). Em tecidos de câncer de mama que expressavam o receptor de estrógeno (RE) houve uma correlação entre a expressão de *S1P1* e sobrevivência das células tumorais com o aumento da ativação de ERK (RUTHERFORD et al., 2013). Também, o receptor *S1P1* está relacionado com a ação protetora da lipoproteína de alta densidade (HDL) sobre o endotélio. A S1P associada à HDL se liga especificamente à apolipoproteína M (apoM), a qual é capaz de entregar S1P ao receptor *S1P1* na superfície das células, desencadeando a redução da ativação de MAPK e Akt, a migração celular endotelial e a formação de junções aderentes do endotélio, de forma que S1P se torna um constituinte vasculoprotetor da HDL no endotélio. Entretanto, os mecanismos de como essa entrega acontece e se ela acontece para outros receptores ainda não estão bem esclarecidos (CHRISTOFFERSEN et al., 2011)

Já o receptor *S1P2*, inibe a resposta de migração induzida por *S1P1* e *S1P3* (WANG et al., 2010), como nos fibroblastos, já a deleção desse receptor implicou no aumento da ativação de Rac, importante na migração celular, e da proliferação dessas células (GOPARAJU et al., 2005). Tal receptor também atua na migração dos monócitos e macrófagos, uma vez que a ausência do *S1P2* gerou menos aterosclerose, observando uma retenção diminuída dessas células nas placas ateroscleróticas (SKOURA et al., 2011). Entretanto, também está envolvido em vias de sobrevivência celular, já que em adenocarcinoma de próstata, a S1P derivada de SPHK1 ativa a via Akt, e essa ativação é dependente do *S1P2* (BECKHAM et al., 2013).

O receptor S1P3 está envolvido na sinalização do estrógeno (E2), já que em células de câncer de mama positivas para o RE, a S1P e E2 regularam a localização e sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), mediante S1P3 (SUKOCHEVA; WADHAM; XIA, 2013). Além disso, a expressão dos receptores S1P1 e 3 em pacientes com câncer de mama que expressavam RE foi associada com um pequeno tempo de sobrevida e recorrência, resultando em um prognóstico ruim (WATSON et al., 2010). Ainda, esse receptor está envolvido no efeito de quimiotaxia do S1P em macrófagos, e atua na aterosclerose ao promover o recrutamento de monócitos/macrófagos (KEUL et al., 2011).

O receptor S1P4 também está envolvido na migração de linfócitos de forma indireta, uma vez que sua ausência em camundongos resultou na diminuição da polarização de células Th17 (SCHULZE et al., 2011), além de atuar na migração de neutrófilos do sangue para o tecido (ALLENDE et al., 2011). Em células de câncer de mama que não expressam RE, S1P4 estimulou a via ERK 1,2 por meio de um mecanismo dependente de HER2. Além disso, sua alta expressão está associada ao baixo tempo de sobrevida (OHOTSKI et al., 2012).

O receptor S1P5 é mais restrito a alguns tipos celulares, como do sistema nervoso. Esse receptor induz o processo de retração de pré-oligodendrócitos por meio da via de sinalização mediada pela resposta de Rho quinase/colapsina e está envolvido na sobrevivência de oligodendrócitos maduros, mediada por Gi/Akt (JAILLARD et al., 2005). Entretanto, já foi demonstrado o envolvimento do S1P5 no egresso de células NKT, e que esse receptor é importante para a migração dessas células para órgãos inflamados (WALZER et al., 2007).

Terapia anti-câncer

Uma vez que a ceramida e a esfingosina possuem atividades diametralmente opostas à S1P na sobrevivência celular, pode-se dizer que essas três moléculas fazem parte de um reostato que, dependendo das condições, pode tanto ativar a morte quanto a sobrevivência celular. Quando esse reostato muda em favor da ceramida e da esfingosina, a célula entra em apoptose, e quando a mudança é em favor de S1P, prevalece a sobrevivência celular (PYNE; PYNE, 2010), de forma que o impacto desse reostato difere de um tipo celular para outro (GATT; DAGAN, 2012). Algumas células

tumorais apresentam habilidade em escapar da apoptose induzida por drogas anti-câncer, que é o mecanismo da maioria das terapias para câncer (AKAO et al., 2006). Dessa forma, tem se tornado importante o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, e as moléculas do metabolismo dos esfingolípídios podem ser alvos promissores (GUILLERMET-GUIBERT et al., 2009).

Um estudo recente demonstra que as células de adenocarcinoma de próstata expressam grandes concentrações de ceramidase, e que essas células são insensíveis à quimioterapia (BECKHAM et al., 2013). Ainda, células de câncer de próstata PC3 submetidas ao tratamento com camptotecina, tiveram uma alta expressão de SPHK1, e dos receptores S1P1 e 3 (AKAO et al., 2006). Foi demonstrado que a inibição da SPHK1 em células de câncer de mama triplo negativas, as quais expressam altos níveis dessa enzima, reduziu a sinalização ERK $\frac{1}{2}$ e Akt, diminuiu o crescimento celular e sensibilizou as células à drogas quimioterápicas (DATTA et al., 2014). Esta sensibilização também já foi relatada em células de câncer de próstata, LNCaP e PC-3, ao realizar a inibição da SPHK1 (PCHEJETSKI et al., 2008), em células de câncer de pâncreas (GUILLERMET-GUIBERT et al., 2009) e de leucemia (BARAN et al., 2007). Assim, as terapias que envolvem o reostato ceramida-esfingosina-S1P direcionado para ceramida e diminuindo a atividade da SPHK1 são o novo caminho para combater o câncer efetivamente (PYNE; PYNE, 2010).

Referências Bibliográficas

ADASP. **Recommendations for the Reporting of Breast Carcinoma**: secondary title, 2004.

AKAO, Y.; BANNO, Y.; NAKAGAWA, Y.; HASEGAWA, N.; KIM, T. J.; MURATE, T.; IGARASHI, Y.; NOZAWA, Y. High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, n. 4, p. 1284-1290, 2006.

ALBERTS, B. E. A. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science Publishing, 2008. 1601 p.

ALEMANY, R.; VAN KOPPEN, C. J.; DANNEBERG, K.; TER BRAAK, M.; MEYER ZU HERINGDORF, D. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 374, n. 5-6, p. 413-428, 2007.

ALLENDE, M. L.; BEKTAS, M.; LEE, B. G.; BONIFACINO, E.; KANG, J.; TUYMETOVA, G.; CHEN, W.; SABA, J. D.; PROIA, R. L. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. **J Biol Chem**, v. 286, n. 9, p. 7348-7358, 2011.

ALVAREZ, S. E.; HARIKUMAR, K. B.; HAIT, N. C.; ALLEGOOD, J.; STRUB, G. M.; KIM, E. Y.; MACEYKA, M.; JIANG, H.; LUO, C.; KORDULA, T.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. 1084-1088, 2010.

BARAN, Y.; SALAS, A.; SENKAL, C. E.; GUNDUZ, U.; BIELAWSKI, J.; OBEID, L. M.; OGRETMEN, B. Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 15, p. 10922-10934, 2007.

BAST, R. C., JR.; RAVDIN, P.; HAYES, D. F.; BATES, S.; FRITSCH, H., JR.; JESSUP, J. M.; KEMENY, N.; LOCKER, G. Y.; MENNEL, R. G.; SOMERFIELD, M. R.; AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY TUMOR MARKERS EXPERT, P. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1865-1878, 2001.

BECKHAM, T. H.; ELOJEIMY, S.; CHENG, J. C.; TURNER, L. S.; HOFFMAN, S. R.; NORRIS, J. S.; LIU, X. Targeting sphingolipid metabolism in head and neck cancer: rational therapeutic potentials. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14, n. 5, p. 529-539, 2010.

BECKHAM, T. H.; CHENG, J. C.; LU, P.; SHAO, Y.; TROYER, D.; LANCE, R.; MARRISON, S. T.; NORRIS, J. S.; LIU, X. Acid ceramidase induces sphingosine kinase 1/S1P receptor 2-mediated activation of oncogenic Akt signaling. **Oncogenesis**, v. 2, n., p. e49, 2013.

BEKTAS, M.; JOLLY, P. S.; MULLER, C.; EBERLE, J.; SPIEGEL, S.; GEILEN, C. C. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. **Oncogene**, v. 24, n. 1, p. 178-187, 2005.

BERNSTEIN, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 3-15, 2002.

BERRY, D. A.; CRONIN, K. A.; PLEVITIS, S. K.; FRYBACK, D. G.; CLARKE, L.; ZELEN, M.; MANDELBLATT, J. S.; YAKOVLEV, A. Y.; HABBEMA, J. D.; FEUER, E. J.; COLLABORATORS, F. T. C. I. A. S. M. N. C. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, n. 17, p. 1784-1792, 2005.

BOATH, A.; GRAF, C.; LIDOME, E.; ULLRICH, T.; NUSSBAUMER, P.; BORNANCIN, F. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. **J Biol Chem**, v. 283, n. 13, p. 8517-8526, 2008.

BUCHHOLZ, T. A.; WEIL, M. M.; STORY, M. D.; STROM, E. A.; BROCK, W. A.; MCNEESE, M. D. Tumor suppressor genes and breast cancer. **Radiat Oncol Investig**, v. 7, n. 2, p. 55-65, 1999.

BUTLER, J. R. G.; FURNIVAL, C. M.; HART, R. F. G. Estimating treatment cost functions for progressive diseases: a multiproduct approach with an application to breast cancer. **Journal of health economics**, v. 14, n. 3, p. 361-385, 1995.

CANCER, C. G. O. H. F. I. B. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. **Lancet**, v. 350, n. 9084, p. 1047-1059, 1997.

CANCER, C. G. O. H. F. I. B. C. C. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **Lancet**, v. 347, n. 9017, p. 1713-1727, 1996.

CHALFANT, C. E.; RATHMAN, K.; PINKERMAN, R. L.; WOOD, R. E.; OBEID, L. M.; OGRETMEN, B.; HANNUN, Y. A. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. **J Biol Chem**, v. 277, n. 15, p. 12587-12595, 2002.

CHALFANT, C. E.; SPIEGEL, S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 20, p. 4605-4612, 2005.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2013.

CHRISTOFFERSEN, C.; OBINATA, H.; KUMARASWAMY, S. B.; GALVANI, S.; AHNSTROM, J.; SEVVANA, M.; EGERER-SIEBER, C.; MULLER, Y. A.; HLA, T.; NIELSEN, L. B.; DAHLBACK, B. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate

provided by HDL-associated apolipoprotein M. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 23, p. 9613-9618, 2011.

CUVILLIER, O.; PIRIANOV, G.; KLEUSER, B.; VANEK, P. G.; COSO, O. A.; GUTKIND, S.; SPIEGEL, S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. **Nature**, v. 381, n. 6585, p. 800-803, 1996.

DATTA, A.; LOO, S. Y.; HUANG, B.; WONG, L.; TAN, S. S.; TAN, T. Z.; LEE, S. C.; THIERY, J. P.; LIM, Y. C.; YONG, W. P.; LAM, Y.; KUMAR, A. P.; YAP, C. T. SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 5920-5933, 2014.

DE JONG, M. M.; NOLTE, I. M.; TE MEERMAN, G. J.; VAN DER GRAAF, W. T.; OOSTERWIJK, J. C.; KLEIBEUKER, J. H.; SCHAAPVELD, M.; DE VRIES, E. G. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. **Journal of medical genetics**, v. 39, n. 4, p. 225-242, 2002.

DOUGHERTY, M. K.; MULLER, J.; RITT, D. A.; ZHOU, M.; ZHOU, X. Z.; COPELAND, T. D.; CONRAD, T. P.; VEENSTRA, T. D.; LU, K. P.; MORRISON, D. K. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. **Mol Cell**, v. 17, n. 2, p. 215-224, 2005.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 208-221, 2005.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE, G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v. 365, n. 9472, p. 1687-1717, 2005.

FRENCH, K. J.; SCHRECENGOST, R. S.; LEE, B. D.; ZHUANG, Y.; SMITH, S. N.; EBERLY, J. L.; YUN, J. K.; SMITH, C. D. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. **Cancer Res**, v. 63, n. 18, p. 5962-5969, 2003.

FUKASAWA, M.; NISHIJIMA, M.; HANADA, K. Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. **J Cell Biol**, v. 144, n. 4, p. 673-685, 1999.

GATT, S.; DAGAN, A. Cancer and sphingolipid storage disease therapy using novel synthetic analogs of sphingolipids. **Chem Phys Lipids**, v. 165, n. 4, p. 462-474, 2012.

GOMEZ-MUNOZ, A.; GANGOITI, P.; GRANADO, M. H.; ARANA, L.; OURO, A. Ceramide-1-phosphate in cell survival and inflammatory signaling. **Adv Exp Med Biol**, v. 688, n., p. 118-130, 2010.

GOPARAJU, S. K.; JOLLY, P. S.; WATTERSON, K. R.; BEKTAS, M.; ALVAREZ, S.; SARKAR, S.; MEL, L.; ISHII, I.; CHUN, J.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. The S1P2 receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 10, p. 4237-4249, 2005.

GRAELER, M.; GOETZL, E. J. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. **FASEB J**, v. 16, n. 14, p. 1874-1878, 2002.

GRANADO, M. H.; GANGOITI, P.; OURO, A.; ARANA, L.; GONZALEZ, M.; TRUEBA, M.; GOMEZ-MUNOZ, A. Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration Involvement of a specific C1P receptor. **Cell Signal**, v. 21, n. 3, p. 405-412, 2009.

GUILLEMET-GUIBERT, J.; DAVENNE, L.; PCHEJESKI, D.; SAINT-LAURENT, N.; BRIZUELA, L.; GUILBEAU-FRUGIER, C.; DELISLE, M. B.; CUVILLIER, O.; SUSINI, C.; BOUSQUET, C. Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. **Mol Cancer Ther**, v. 8, n. 4, p. 809-820, 2009.

HAIT, N. C.; ALLEGOOD, J.; MACEYKA, M.; STRUB, G. M.; HARIKUMAR, K. B.; SINGH, S. K.; LUO, C.; MARMORSTEIN, R.; KORDULA, T.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. **Science**, v. 325, n. 5945, p. 1254-1257, 2009.

HANADA, K.; KUMAGAI, K.; YASUDA, S.; MIURA, Y.; KAWANO, M.; FUKASAWA, M.; NISHIJIMA, M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 803-809, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANCOCK, C. N.; DANGI, S.; SHAPIRO, P. Protein phosphatase 2A activity associated with Golgi membranes during the G2/M phase may regulate phosphorylation of ERK2. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11590-11598, 2005.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. **J Biol Chem**, v. 277, n. 29, p. 25847-25850, 2002.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 139-150, 2008.

HERSCHKOWITZ, J. I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V. J.; MIKAELIAN, I.; USARY, J.; HU, Z.; RASMUSSEN, K. E.; JONES, L. P.; ASSEFNIA, S.; CHANDRASEKHARAN, S.; BACKLUND, M. G.; YIN, Y.; KHRAMTSOV, A. I.; BASTEIN, R.; QUACKENBUSH, J.; GLAZER, R. I.; BROWN, P. H.; GREEN, J. E.; KOPELOVICH, L.; FURTH, P. A.; PALAZZO, J. P.; OLOPADE, O. I.; BERNARD, P. S.; CHURCHILL, G. A.; VAN DYKE, T.; PEROU, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

HINDLE, W. H. **Breast Care: A Clinical Guidebook For Women's Primary Health Care Providers** New York: Springer, 1998

HLA, T.; MACIAG, T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. **J Biol Chem**, v. 265, n. 16, p. 9308-9313, 1990.

HLA, T.; DANNENBERG, A. J. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. **Cell Metab**, v. 16, n. 4, p. 420-434, 2012.

HUWILER, A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 2, p. 150-159, 2007.

IHLEFELD, K.; VIENKEN, H.; CLAAS, R. F.; BLANKENBACH, K.; RUDOWSKI, A.; TER BRAAK, M.; KOCH, A.; VAN VELDHoven, P. P.; PFEILSCHIFTER, J.; MEYER ZU HERINGDORF, D. Upregulation of ABC transporters contributes to chemoresistance of sphingosine 1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. **J Lipid Res**, v. 56, n. 1, p. 60-69, 2015.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. 124 p.
JAILLARD, C.; HARRISON, S.; STANKOFF, B.; AIGROT, M. S.; CALVER, A. R.; DUDDY, G.; WALSH, F. S.; PANGALOS, M. N.; ARIMURA, N.; KAIBUCHI, K.; ZALC, B.; LUBETZKI, C. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. **J Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 1459-1469, 2005.

JOHNSON-THOMPSON, M. C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 5 Suppl, p. 1224-1229, 2000.

KAWAHARA, A.; NISHI, T.; HISANO, Y.; FUKUI, H.; YAMAGUCHI, A.; MOCHIZUKI, N. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. **Science**, v. 323, n. 5913, p. 524-527, 2009.

KEUL, P.; LUCKE, S.; VON WNUCK LIPINSKI, K.; BODE, C.; GRALER, M.; HEUSCH, G.; LEVKAU, B. Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. **Circ Res**, v. 108, n. 3, p. 314-323, 2011.

LEE, H.; DENG, J.; KUJAWSKI, M.; YANG, C.; LIU, Y.; HERRMANN, A.; KORTYLEWSKI, M.; HORNE, D.; SOMLO, G.; FORMAN, S.; JOVE, R.; YU, H. STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. **Nat Med**, v. 16, n. 12, p. 1421-1428, 2010.

LI, C. I.; ANDERSON, B. O.; DALING, J. R.; MOE, R. E. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **JAMA**, v. 289, n. 11, p. 1421-1424, 2003.

LI, W.; YU, C. P.; XIA, J. T.; ZHANG, L.; WENG, G. X.; ZHENG, H. Q.; KONG, Q. L.; HU, L. J.; ZENG, M. S.; ZENG, Y. X.; LI, M.; LI, J.; SONG, L. B. Sphingosine kinase 1 is

associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. 1393-1399, 2009.

LINN, S. C.; KIM, H. S.; KEANE, E. M.; ANDRAS, L. M.; WANG, E.; MERRILL, A. H., JR. Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption. **Biochem Soc Trans**, v. 29, n. Pt 6, p. 831-835, 2001.

LIU, B.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Sphingomyelinases in cell regulation. **Semin Cell Dev Biol**, v. 8, n. 3, p. 311-322, 1997.

MACEYKA, M.; SANKALA, H.; HAIT, N. C.; LE STUNFF, H.; LIU, H.; TOMAN, R.; COLLIER, C.; ZHANG, M.; SATIN, L. S.; MERRILL, A. H., JR.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. **J Biol Chem**, v. 280, n. 44, p. 37118-37129, 2005.

MACEYKA, M.; HARIKUMAR, K. B.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 1, p. 50-60, 2012.

MACEYKA, M.; SPIEGEL, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 58-67, 2014.

MALHOTRA, G. K.; ZHAO, X.; BAND, H.; BAND, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, n. 7261, p. 624-628, 2000.

MERRILL, A. H., JR.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 142, n. 1, p. 208-225, 1997.

OHOTSKI, J.; LONG, J. S.; ORANGE, C.; ELSBERGER, B.; MALLON, E.; DOUGHTY, J.; PYNE, S.; PYNE, N. J.; EDWARDS, J. Expression of sphingosine 1-phosphate receptor 4 and sphingosine kinase 1 is associated with outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. **Br J Cancer**, v. 106, n. 8, p. 1453-1459, 2012.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**, 2014. 536 p.
PAHO. **Cancer in the Americas**: secondary title. Washington, 2012.

PASCHALL, A. V.; ZIMMERMAN, M. A.; TORRES, C. M.; YANG, D.; CHEN, M. R.; LI, X.; BIEBERICH, E.; BAI, A.; BIELAWSKI, J.; BIELAWSKA, A.; LIU, K. Ceramide targets XIAP and cIAP1 to sensitize metastatic colon and breast cancer cells to apoptosis induction to suppress tumor progression. **BMC Cancer**, v. 14, n., p. 24, 2014.

PATWARDHAN, G. A.; LIU, Y. Y. Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. **Prog Lipid Res**, v. 50, n. 1, p. 104-114, 2011.

PCHEJETSKI, D.; DOUMERC, N.; GOLZIO, M.; NAYMARK, M.; TEISSIE, J.; KOHAMA, T.; WAXMAN, J.; MALAUDAUD, B.; CUVILLIER, O. Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. **Mol Cancer Ther**, v. 7, n. 7, p. 1836-1845, 2008.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LONNING, P. E.; BORRESENDALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. I.; HE, X.; PEROU, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PYNE, N. J.; PYNE, S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 7, p. 489-503, 2010.

RAHAMAN, M.; COSTELLO, R. W.; BELMONTE, K. E.; GENDY, S. S.; WALSH, M. T. Neutrophil sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors in pneumonia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 34, n. 2, p. 233-241, 2006.

RASTELLI, F.; CRISPINO, S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. **Tumori**, v. 94, n. 3, p. 370-383, 2008.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet**, v. 378, n. 9805, p. 1812-1823, 2011.

RING, A. E.; SMITH, I. E.; ASHLEY, S.; FULFORD, L. G.; LAKHANI, S. R. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. **Br J Cancer**, v. 91, n. 12, p. 2012-2017, 2004.

RIVERA, J.; PROIA, R. L.; OLIVERA, A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 10, p. 753-763, 2008.

ROSEN, H.; GONZALEZ-CABRERA, P. J.; SANNA, M. G.; BROWN, S. Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. **Annu Rev Biochem**, v. 78, n., p. 743-768, 2009.

ROSS, R. K.; PAGANINI-HILL, A.; WAN, P. C.; PIKE, M. C. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 4, p. 328-332, 2000.

RUCKHABERLE, E.; RODY, A.; ENGELS, K.; GAETJE, R.; VON MINCKWITZ, G.; SCHIFFMANN, S.; GROSCH, S.; GEISLINGER, G.; HOLTRICH, U.; KARN, T.; KAUFMANN, M. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 112, n. 1, p. 41-52, 2008.

RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 16, n. 3, p. 221-233, 2011.

RUTHERFORD, C.; CHILDS, S.; OHOTSKI, J.; MCGLYNN, L.; RIDDICK, M.; MACFARLANE, S.; TASKER, D.; PYNE, S.; PYNE, N. J.; EDWARDS, J.; PALMER, T. M. Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1. **Cell Death Dis**, v. 4, n., p. e927, 2013.

SANCHEZ, T.; HLA, T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. **J Cell Biochem**, v. 92, n. 5, p. 913-922, 2004.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1472 p. (Mama)

SCHULZE, T.; GOLFIER, S.; TABELING, C.; RABEL, K.; GRALER, M. H.; WITZENRATH, M.; LIPP, M. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P(4)) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. **FASEB J**, v. 25, n. 11, p. 4024-4036, 2011.

SINGLETERY, K. W.; GAPSTUR, S. M. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. **JAMA**, v. 286, n. 17, p. 2143-2151, 2001.

SIVARAMAN, L.; MEDINA, D. Hormone-induced protection against breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 77-92, 2002.

SKOURA, A.; MICHAUD, J.; IM, D. S.; THANGADA, S.; XIONG, Y.; SMITH, J. D.; HLA, T. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 1, p. 81-85, 2011.

SOBUE, S.; NEMOTO, S.; MURAKAMI, M.; ITO, H.; KIMURA, A.; GAO, S.; FURUHATA, A.; TAKAGI, A.; KOJIMA, T.; NAKAMURA, M.; ITO, Y.; SUZUKI, M.; BANNO, Y.; NOZAWA, Y.; MURATE, T. Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. **Int J Hematol**, v. 87, n. 3, p. 266-275, 2008.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P. E.; BORRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 5, p. 397-407, 2003.

SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 6, p. 403-415, 2011.

SUGIURA, M.; KONO, K.; LIU, H.; SHIMIZUGAWA, T.; MINEKURA, H.; SPIEGEL, S.; KOHAMA, T. Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. **J Biol Chem**, v. 277, n. 26, p. 23294-23300, 2002.

SUKOCHEVA, O.; WADHAM, C.; XIA, P. Estrogen defines the dynamics and destination of transactivated EGF receptor in breast cancer cells: role of S1P(3) receptor and Cdc42. **Exp Cell Res**, v. 319, n. 4, p. 455-465, 2013.

TAKABE, K.; PAUGH, S. W.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 2, p. 181-195, 2008.

TAKABE, K.; SPIEGEL, S. Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. **J Lipid Res**, v. 55, n. 9, p. 1839-1846, 2014.

THANGADA, S.; KHANNA, K. M.; BLAHO, V. A.; OO, M. L.; IM, D. S.; GUO, C.; LEFRANCOIS, L.; HLA, T. Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. **J Exp Med**, v. 207, n. 7, p. 1475-1483, 2010.

THUY, A. V.; REIMANN, C. M.; HEMDAN, N. Y.; GRALER, M. H. Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. **Cell Physiol Biochem**, v. 34, n. 1, p. 158-171, 2014.

VADAS, M.; XIA, P.; MCCAUGHAN, G.; GAMBLE, J. The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? **Biochim Biophys Acta**, v. 1781, n. 9, p. 442-447, 2008.

VELIE, E.; KULLDORFF, M.; SCHAIRER, C.; BLOCK, G.; ALBANES, D.; SCHATZKIN, A. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: a prospective cohort study. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 10, p. 833-839, 2000.

VERZIJL, D.; PETERS, S. L.; ALEWIJNSE, A. E. Sphingosine-1-phosphate receptors: zooming in on ligand-induced intracellular trafficking and its functional implications. **Mol Cells**, v. 29, n. 2, p. 99-104, 2010.

WALZER, T.; CHIOSSONE, L.; CHAIX, J.; CALVER, A.; CAROZZO, C.; GARRIGUE-ANTAR, L.; JACQUES, Y.; BARATIN, M.; TOMASELLO, E.; VIVIER, E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. **Nat Immunol**, v. 8, n. 12, p. 1337-1344, 2007.

WANG, F.; OKAMOTO, Y.; INOKI, I.; YOSHIOKA, K.; DU, W.; QI, X.; TAKUWA, N.; GONDA, K.; YAMAMOTO, Y.; OHKAWA, R.; NISHIUCHI, T.; SUGIMOTO, N.; YATOMI, Y.; MITSUMORI, K.; ASANO, M.; KINOSHITA, M.; TAKUWA, Y. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3979-3995, 2010.

WATSON, C.; LONG, J. S.; ORANGE, C.; TANNAHILL, C. L.; MALLON, E.; MCGLYNN, L. M.; PYNE, S.; PYNE, N. J.; EDWARDS, J. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. **Am J Pathol**, v. 177, n. 5, p. 2205-2215, 2010.

WHO. **World Cancer Report 2008**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. 512 p.

WHO. **World Cancer Report 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. 630 p.

XU, R.; SUN, W.; JIN, J.; OBEID, L. M.; MAO, C. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. **FASEB J**, v. 24, n. 7, p. 2507-2515, 2010.

ZEIDAN, Y. H.; HANNUN, Y. A. Translational aspects of sphingolipid metabolism. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 8, p. 327-336, 2007.

ZEPEDA-CASTILLA, E. J.; RECINOS-MONEY, E.; CUELLAR-HUBBE, M.; ROBLES-VIDAL, C. D.; MAAFS-MOLINA, E. [Molecular classification of breast cancer]. **Cir Cir**, v. 76, n. 1, p. 87-93, 2008.

ZHANG, H.; DESAI, N. N.; OLIVERA, A.; SEKI, T.; BROOKER, G.; SPIEGEL, S. Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. **J Cell Biol**, v. 114, n. 1, p. 155-167, 1991.

Capítulo II

Profiling the expression of major genes of the sphingolipid pathway and effects of S1P receptors signaling in breast cancer immunity

Esse capítulo foi escrito de acordo com as
normas da revista Cancer Letters.

Abstract

The present study investigated the effects of the sphingolipid pathway on breast cancer (BC) immunity, analyzing receptors, the major functional genes of the pathway and cytokines to characterize the involvement of the sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling in the immunological response of breast cancer. To the best of our knowledge, there is no characterization of the sphingolipid pathway in whole blood from breast cancer patients in literature. This study demonstrates a skewed profile of genes favoring high *SPHK1* expression and production of S1P in tissues and blood during BC development, which was reversed by chemotherapy treatment (BCC) and reached levels similar to those found in benign disease. Such levels were also correlated with high levels of pro-inflammatory cytokines. This study also shows for the first time the characterization of all five S1P receptors in lymphocytes, granulocytes and monocytes from both BC and BCC patients. Although cells express all five receptors, they vary in their surface expression, and this differential expression seem to play major roles in the tumor immune system that may lead to immune evasion, cell infiltration, proliferation, survival and dissemination.

Keywords: S1P, immune response, breast cancer, S1P receptors.

1. Introduction

Cancer is characterized by the accumulation of genetic and cellular alterations, which generate immune response to tumor antigens [1]. Effective responses against cancer cells depend on several steps, including tumor antigens capture by dendritic cells and presentation to T cells, which are then activated.

The effector T cells traffic and infiltrate in the tumor bed, recognize and bind to cancer cells, and kill them [2, 3]. Although T cells have significant function in tumor antigens' recognition, all immune cell types also play important roles in tumors [4]. Monocytes are recruited to tumor tissues and differentiate into tumor-associated macrophages, performing pro-tumor functions with increased production of factors that support tumors' initiation, neoplastic transformation and distant metastasis onset [5]. Neutrophils are also recruited and differentiate into tumor-associated neutrophils (TANs), but their functions are unclear, since TANs produce pro-inflammatory and anti-inflammatory factors [6].

Tumor cells will also lead to the production of metabolites that will function as secondary signals to all immune cells. Among these, the sphingolipid metabolites and their receptors have emerged as an important signaling pathway implicated in cell differentiation, apoptosis, and proliferation [7]. However, the role of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors and the sphingolipids' pathway in breast cancer immunity has not been well characterized.

S1P is a bioactive sphingolipid generated through the activation of an enzymatic cascade that originates ceramide, and subsequently sphingosine, which is phosphorylated in S1P by two sphingosine kinases (SPHK) [8, 9]. This lipid regulates important biological processes, both intracellular as a second messenger, and extracellular by the interaction with five G protein-coupled receptors (GPCR), S1P1-5, whose functions differ according to the cell type [10, 11].

S1P is involved in cell proliferation, survival, angiogenesis, and has an important role in cancer and immune response [12]. S1P receptors are present in all immune cells. Dendritic cells express all five receptors, whereas T cells express

S1P1 and 4, B cell express S1P1 and 3, macrophages express S1P1 and 2 [13], and eosinophil express S1P1, 2 and 3 [14]. Each receptor promote a different role in each cell type, including chemotaxis, migration, cell survival, egress, tissue infiltration, and others [15].

This study aimed to characterize S1P receptors in lymphocytes, monocytes and granulocytes from breast cancer patients undergoing chemotherapy treatment (BCC) and without (BC), the expression behavior of major genes involved in the sphingolipid pathway, and the cytokines profile under S1P stimuli in whole blood.

2. Materials and methods

2.1 Patients and Controls

Peripheral blood (PB) and tissue samples were obtained from patients of the Clinics' Hospital of Federal University of Uberlandia (UFU). All procedures were approved by the Ethics Committee on Human Research of UFU (N. 064/2008) and all participants provided formal informed consent. Blood samples were obtained from 8 BC patients, 8 patients with BCC and 8 healthy donors (HD), in 5-mL Lithium Heparin Vacutainer tubes (BD vacutainer, USA), whereas tissue samples were collected from 12 BC patients, 4 breast benign disease (BBD) and 4 HD. Patient's characteristics are described in **Table 1**.

2.2 Cytotoxicity assays

In order to measurement the S1P cytotoxicity, the mitochondrial function assay was performed in whole blood cells of 4 health donors. Whole blood were diluted (1:3) in pre-warmed in RPMI-1640 medium (Gibco, USA) and 1%

gentamicin (Sigma-Aldrich, USA), within 2h post-collection. The diluted blood was seeded into 96-well plates (TPP, Switzerland), and exposed to different concentrations (10 nM, 100nM, 500nM, 1 μ M and 10 μ M) of S1P or 0,002% DMSO for 24h. After treatment, 0.5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Calbiochem, Germany) was added to cell cultures, and incubated for 4h at 37°C, followed by 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50% N, N-dimethyl formamide supplementation, incubated overnight. The amount of viable cells in each well was determined by the absorbance of solubilized formazan. Absorbance was measured in a wavelength of 570 nm (Thermo Plate, TP-Reader, USA). All tests were performed in triplicates.

2.3 Whole Blood Cell Culture and Treatment

Blood cell dilutions (1:3) were cultured in duplicate in 24-well culture plates (TPP, Switzerland) within 2h post-collection, at a volume of 0.5 mL/well, and submitted to the following stimuli: 100 ng/mL of ultra-pure LPS (*E. coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA), or 100 nM S1P (Avanti Polar Lipids, USA), or 0,002% DMSO as vehicle (Sigma-Aldrich, USA), and untreated. The incubation was performed under standard culture conditions (37°C, 95% humidified air, and 5% CO₂) for 4h, and post- processed for mRNA analysis, and cytokines analysis for 4 and 18h. After incubation, cells were transferred to microtubes and centrifuged at 200 x g for 10 min at room temperature. Supernatants were collected and stored at -80°C for cytokine measurements, and cell pellets were diluted in 1:1 with diethylpyrocarbonate (DEPC) water, lysed with 0.75 mL TRIzol® LS (Life Technologies, USA), and stored at -80°C for mRNA extraction.

2.4 Cytokines Assays

The cytometric bead array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit (BD Biosciences, USA) was used to measure supernatant levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN- γ and IL-17A according to the manufacturer's protocols. Briefly, samples and human recombinant cytokines (standards curve) were incubated for 3h at room temperature with a suspension of cytokines capture beads and a phycoerythrin (PE)-conjugated detection reagent. After incubation, the mixture was washed and measurements were performed on the Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, USA). Cytokine quantification was performed using the FCAP Array Software (BD Biosciences, USA) to obtain the Median fluorescence intensity (MFI) values. The amount of leukocytes found in complete blood count collected on the same day of the assay was used to normalize cytokine levels.

2.5 Gene expression analysis for *SphK1*, *SphK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER*

RNA from tissue samples was extracted using TRIzol® Reagent (Life Technologies, USA), according to manufacturer's protocol. RNA from blood was extracted using the TRIzol® LS (Life Technologies, USA) until phase separation and then proceeded with the aqueous phase using the RNeasy mini kit (Qiagen, USA) both according to the manufacturer's protocols. The concentration and quality of the RNA were determined by ultraviolet absorbance and electrophoresis. Complementary DNA (cDNA) was generated by reverse transcription (MMLV, Life Technologies, USA) using 0.5 μ g of RNA, according to the manufacturer's protocol. qPCR was performed on an ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, USA) using TaqMan Universal PCR Master Mix in a relative quantification assay for SPHK1,

SPHK2, ceramide kinase (CERK), ceramide synthase 2 (CERS2), and ceramidase 3 (ACER3) in both tissue and blood samples. The reaction was conducted in a final volume of 12 μ L, including 6 μ L of master mix (Applied Biosystems, USA), 5 μ L of cDNA template and 0,2 μ L of probe. The following probes were used: SPHK1: Hs01116530_g1, SPHK2: Hs00219999_m1, CERK: Hs00368483_m1, ACER3: Hs00218034_m1, CERS2: Hs00371958_g1, and the endogenous control GAPDH: Hs03929097_g1 (Applied Biosystems, USA). Cycling conditions were 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were performed in duplicates. The expression of the target gene transcripts was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and relative quantification was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method, using the control group (HD) as calibrator.

2.6 Flow cytometry analysis of S1P receptors on blood cells

Flow cytometric assays using the fluorescence staining of human cells by lysed whole blood method (Becton Dickinson, USA) with modifications was performed to determine the presence of S1PRs on lymphocytes, monocytes and granulocytes, simultaneously. Samples were aliquoted into 100 μ L portions and incubated with Pharm Lyse (BD Biosciences, USA) for erythrocytes lyse, according to manufacturer's protocol. For direct assays, cells were labeled with monoclonal antibodies (mAbs) specific for human leukocytes cell-surface markers: anti-CD3 (Alexa Fluor; AF647), anti-CD14 (PE), anti-CD16 (AF647), anti-CD66b (peridinin chlorophyll protein cyochrome conjugated; PerCP/Cy5.5), all from BioLegend, USA. For indirect assays, cells were labeled in the same conditions with the following anti-human antibodies: anti-S1PR1, anti-S1PR2, anti-S1PR3,

anti-S1PR4 and anti-S1PR5, all from Sigma-Aldrich, USA, and with fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) goat anti-mouse IgG(ab) (Life Technologies, USA) as the secondary antibody. Cells were also labeled with appropriate isotype control antibodies. For each tube, 60000 events corresponding to viable leucocytes were collected on the Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, USA).

2.7 Flow Cytometry Gating Strategy

Subpopulations analysis were accomplished according to distinct gating strategy using the FlowJo software v7.4.10. An acquisition threshold was set such that any unwanted events like platelets, dead cells and debris were not recorded. Quadrants were defined using isotype controls and compensation. First, leukocytes were visualized in a forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) plot, so three leukocyte subsets were identified: granulocytes, lymphocytes, and monocytes. S1PRs were identified in T lymphocytes from CD3 versus S1PRs plot and in granulocytes from CD66b versus S1PR plot, for each receptor individually. S1PRs in monocytes were defined by sequential gating. First monocytes were classified based on CD14 and CD16 expression in classical ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediate ($CD14^{++}CD16^{+}$) and non-classical monocytes ($CD14^{+}CD16^{++}$), and then S1PRs were identified in each population. Nomenclature of monocytes subsets followed the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies. Data were shown as percentage of absolute value of subpopulations.

2.8 Statistical Analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's Multiple Comparison test. For all statistics data, the level of significance was $p < 0.05$.

3. Results

3.1 S1P Cytotoxicity

Cytotoxicity assay using blood cells of 4 HD showed that the S1P tested (10 nM, 100nM, 500nM, 1 μ M and 10 μ M concentrations) did not affect cells viability negatively when compared to control cells (**Fig. 2**).

3.2 Cytokine production by whole blood cells

Cytokines levels were assessed by CBA in supernatant of blood cells from BC and BCC patients after 4 h and 18 h treatments. The same conditions were used for HD samples. All groups expressed the seven cytokines analyzed (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A) (**Fig. 3**). For BC supernatants, TNF α and IFN γ cytokine levels were significant higher than control after a 4h-treatment in ($P < 0.05$) (**Fig. 3A**). IL-6 and TNF α levels were also higher in BC after 18h-treatment ($P < 0.05$), whereas IL-10 showed a small increase. For BCC only IL-6 was relatively higher after 18h compared to HD. IL-2, IL-4 and IL-17A expressed lower levels in all groups (**Fig. 3B**). There was no detectable effect of S1P on cytokine levels on any of the groups (**Supplementary Fig. 1**).

3.3 Relative mRNA expression of major genes of the sphingolipid pathway in blood

The relative mRNA expression of five major genes was performed in PB from BC and BCC patients after 4h-treatment. HD samples were used as controls. Analysis revealed that all groups exhibited varying levels of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *ACER3* and *CERS2* expression (**Fig. 4**). For BC samples, the relative *SPHK1* mRNA expression levels were 3.8-fold higher than that in BCC ($P<0.05$). *CERK* showed a small increase in BC (0.9-fold), as well as *CERS2* (0.5-fold) and *ACER3* (0.2-fold) compared to HD ($P>0.05$). *SPHK2* levels were similar to the control group. For BCC, gene expressions of *SPHK1*, *SPHK2*, and *CERK* were lower than in controls (0.5-fold, 0.5-fold and 0.4-fold, respectively), whereas there was no significant data for *CERS2* and *ACER3* (**Fig. 4A**). Interestingly, when analyzing invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive ductal carcinoma (IDC), all from BC group, *SPHK1* was 8.0-fold higher ($P<0.05$) in ILC when compared to IDC. Furthermore, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* levels were 0.5-fold, 2.5 ($P<0.01$), 1.5 ($P<0.05$) and 6.9-fold higher in ILC than that IDC (**Fig. 4B**). No significant effect on mRNA levels were observed for treatment with S1P (**Supplementary Fig. 2**).

3.4 Relative mRNA expression of major genes of the sphingolipid pathway in breast tissues

The relative mRNA levels of five genes of the sphingolipid pathway were also investigated in tissue from HD and women with BBD and BC. Four genes analyzed were higher in BBD or control, with *CERS2* levels 2.5-fold higher ($P<0.001$) in BBD than that in BC. *SPHK1* is the only transcript that presented the

highest levels in BC when compared to BBD (**Fig. 5A**). When the BC group was stratified, the *CERS2* transcripts were still higher compared to BC subgroups. *CERS2* expression was lower in DCIS (3-fold) ($P<0.001$), IDC-II (2-fold) ($P<0.05$), and IDC-III (3.5-fold) ($P<0.001$) in comparison with BBD (**Fig. 5B**). However, considering tumor types, mRNA levels were higher in IDCII. In ductal carcinoma in situ (DCIS), the levels of *ACER3* were the highest while *SPHK1* was increased in the more aggressive cancer group, IDC-III. *SPHK1* mRNA levels have gradually increased between the BBD to IDC, whereas *SPHK2* levels presented an opposite behavior (**Fig. 5C**).

3.5 S1P receptors characterization in blood cells

S1P receptors were examined in blood cells from BC and BCC patients, and healthy donors, with specific staining for T lymphocytes, granulocytes and monocytes (classical, intermediate and non-classical). Results revealed that all these cells express the five receptors in a disease-independent manner (**Fig. 6**). S1P1 and S1P5 were significant higher in T lymphocytes from BCC group ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively), although all the five receptors were more expressed in this patients. Moreover, BC also showed higher expression levels of receptors compared to controls, except for S1P5 (**Fig. 6A**). Considering granulocytes, BC showed the high expression of S1P receptors, and S1P2 and S1P4 were 2-fold higher than those in controls ($P<0.05$) (**Fig. 6B**). Interestingly, BCC showed lower levels in this cell type. In classical monocytes, the highest expression of receptors was observed in the control group with no significant differences between the other groups (**Fig. 6C**). The same profile was identified in intermediate monocytes, with S1P1 and S1P4 2-fold and 4-fold higher than in control, respectively ($P<0.05$)

(Fig. 6D). S1P receptors in non-classical monocytes are more expressed in BC than in BCC, with higher surface expressions of S1P2 and S1P3 in BC ($P<0.05$) (Fig. 6E).

4. Discussion

We have investigated the sphingolipid pathway on breast cancer immune response through the analyses of the expression of the major functional genes of the pathway, all five S1P receptors, and cytokines secretion, especially characterizing the involvement of the S1P signaling in the immunological response. This is the first characterization of the sphingolipid pathway profile in whole blood from breast cancer patients with and without chemotherapy. We have observed a skewed profile of genes that favor high *SPHK1* expression and production of S1P in tissues and blood during BC development. Such levels were correlated with high levels of pro-inflammatory cytokines production. However, after chemotherapy treatment (BCC) patients presented diminished expression levels reaching those observed in benign disease (BBD) and controls. We have also characterized of all five S1P receptors in lymphocytes, granulocytes and monocytes from both BC and BCC patients. Although cells express all five receptors, they vary in their surface expression, and this differential expression seem to play major roles in the tumor immune system and immune evasion.

Increased mRNA levels of *SPHK1* in BC blood cells are comparable with profiles in tissue and cell lines, with overexpression associated with breast cancer progression and resistance to therapy. It was identified several proteins that interact with *SPHK1* in MCF-7, a breast cancer cell line, demonstrating its

involvement with cell migration, adhesion and cytoskeletal remodeling [16]. Decreased levels of *SPHK1* in BCC comparing with BC was similar to a study with prostate cancer cells, in which chemotherapy treatment inhibited this enzyme, and in mice this inhibition resulted in a smaller tumor volume and reduced occurrence and number of metastases [17]. The differences found on cytokine levels in BC and BCC patients is explained by the immune status, since simultaneous immune stimulation and immunosuppression are present in cancer patients without treatment [18] as well as in some patients under cancer chemotherapy with cyclophosphamide that also present immunosuppression [19]. We found increased levels of $\text{TNF}\alpha$ and IL-6 in BC, which act in tumor cell survival through activation of the NF- κ B and STAT3 signaling pathways [20]. Similarly, we have also observed high levels IFN- γ in BC patients, which acts as tumor suppressor by inhibiting tumor establishment and growth, corroborating the dual role of certain pleiotropic cytokines in tumor immune responses [21]. BCC did not show difference in cytokines levels, possibly due to the alkylating agent cyclophosphamide that promote tumor cell death through apoptosis, and because it is not immunogenic [22].

Relative mRNA levels of genes of the sphingolipid pathway on tissue differ from blood cells, since *CERS2* was lower in BC, although non-significant. This enzyme was reported to inhibit migration and invasion, and overexpression in MDA-MB-231 cells, a highly invasive breast cancer cell line, significantly reduced VAMP activity, an important pH regulatory complex in tumor cells and positively correlated to cancer invasion and metastasis [23]. However, *SPHK1* remains at high concentrations in both tissue and blood cells, which is related with malignant

transformation and cancer proliferation, among other functions that are linked to cell survival [24], activities also demonstrated in MCF-7 cells [25].

The characterization of all five S1P receptors in lymphocytes, granulocytes and monocytes of BC and BCC patients demonstrated that all cell types express the five receptors in both groups, differently from what has been recently reported elsewhere [15]. Indeed, S1P receptor can promote different functions on immune cells [13]. Decreased S1P1 levels in BC lymphocytes is possible due to high concentrations of S1P in blood, proven by high levels of SPHK1 in blood cells, as an exaggerated production of S1P can promote S1P1 internalization and influence lymphocyte egress [26]. Furthermore, S1P4 appears do not have influence on lymphocytes migration, but suppress T cells proliferation [27], which is in agreement with high levels in BCC. S1P4 receptor acts on pro-inflammation and migration from blood into tissue in neutrophil [28], and in this study BC shows higher levels of S1P4 in granulocytes, as a pro-inflammatory profile. In monocytes and macrophages, S1P2 is involved with cell survival and inhibition of chemotaxis and S1P3 promotes chemotaxis [15]. These receptors are increased in BC non-classical monocytes, and pro-survival activity is in accord to the cancer behavior, while opposite chemotaxis effect is probably for homeostasis maintenance. S1P1 induce migration in monocytes [15], and was found in high levels in healthy donors intermediate monocytes, as S1P4, despite there is no function described of this cell type.

In brief, all S1P receptors were more expressed in T lymphocytes of BCC patients, whereas higher levels of these receptors were observed in granulocytes of BC patients. Interestingly, the classical and intermediate monocyte populations presented the highest expression of receptors in the control group.

Taken together, the present data revealed an important role of the sphingolipid pathway in the breast cancer immune response, demonstrating the S1P and its receptors skewed signaling favor cancer occurrence and development, and these molecules may be targets for co-adjuvant cancer immunotherapy in order to achieve durable antitumor immunity during cancer treatment.

5. Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

6. Acknowledgements

This work was supported by grants from Brazilian research funding agencies: Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

7. References

- [1] T. Tian, S. Olson, J.M. Whitacre, A. Harding, The origins of cancer robustness and evolvability, *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 3 (2011) 17-30.
- [2] X.S. Chen, C.D. Ma, C.M. Chen, [A study on the relationship between breast cancer molecular classification and prognosis], *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 46 (2008) 1400-1403.
- [3] G.T. Motz, G. Coukos, Deciphering and reversing tumor immune suppression, *Immunity*, 39 (2013) 61-73.

- [4] W.H. Fridman, F. Pages, C. Sautes-Fridman, J. Galon, The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome, *Nature reviews. Cancer*, 12 (2012) 298-306.
- [5] D.M. Richards, J. Hettinger, M. Feuerer, Monocytes and macrophages in cancer: development and functions, *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 6 (2013) 179-191.
- [6] E.B. Eruslanov, P.S. Bhojnagarwala, J.G. Quatromoni, T.L. Stephen, A. Ranganathan, C. Deshpande, T. Akimova, A. Vachani, L. Litzky, W.W. Hancock, J.R. Conejo-Garcia, M. Feldman, S.M. Albelda, S. Singhal, Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer, *The Journal of clinical investigation*, 124 (2014) 5466-5480.
- [7] A.J. Melendez, Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets, *Biochimica et biophysica acta*, 1784 (2008) 66-75.
- [8] M. Maceyka, K.B. Harikumar, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease, *Trends in cell biology*, 22 (2012) 50-60.
- [9] T. Hla, A.J. Dannenberg, Sphingolipid signaling in metabolic disorders, *Cell metabolism*, 16 (2012) 420-434.
- [10] T. Sanchez, T. Hla, Structural and functional characteristics of S1P receptors, *Journal of cellular biochemistry*, 92 (2004) 913-922.
- [11] N.J. Pyne, S. Pyne, Sphingosine 1-phosphate and cancer, *Nature reviews. Cancer*, 10 (2010) 489-503.
- [12] K. Takabe, S.W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets, *Pharmacological reviews*, 60 (2008) 181-195.

- [13] J. Rivera, R.L. Proia, A. Olivera, The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity, *Nature reviews. Immunology*, 8 (2008) 753-763.
- [14] M. Rahaman, R.W. Costello, K.E. Belmonte, S.S. Gendy, M.T. Walsh, Neutrophil sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors in pneumonia, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34 (2006) 233-241.
- [15] V.A. Blaho, T. Hla, An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors, *Journal of lipid research*, 55 (2014) 1596-1608.
- [16] D. Yagoub, M.R. Wilkins, A.J. Lay, D.C. Kaczorowski, D. Hatoum, S. Bajan, G. Hutvagner, J.H. Lai, W. Wu, R. Martiniello-Wilks, P. Xia, E.M. McGowan, Sphingosine kinase 1 isoform-specific interactions in breast cancer, *Molecular endocrinology*, 28 (2014) 1899-1915.
- [17] D. Pchejetski, M. Golzio, E. Bonhoure, C. Calvet, N. Doumerc, V. Garcia, C. Mazerolles, P. Rischmann, J. Teissie, B. Malavaud, O. Cuvillier, Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models, *Cancer research*, 65 (2005) 11667-11675.
- [18] B.E. Lippitz, Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review, *The Lancet. Oncology*, 14 (2013) e218-228.
- [19] H.L. Weiner, J.A. Cohen, Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects, *Multiple sclerosis*, 8 (2002) 142-154.
- [20] V. De Simone, E. Franze, G. Ronchetti, A. Colantoni, M.C. Fantini, D. Di Fusco, G.S. Sica, P. Sileri, T.T. MacDonald, F. Pallone, G. Monteleone, C. Stolfi, Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-alpha synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth, *Oncogene*, (2014).

- [21] V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, R.D. Schreiber, IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature*, 410 (2001) 1107-1111.
- [22] L. Zitvogel, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, G. Kroemer, Immunological aspects of cancer chemotherapy, *Nature reviews. Immunology*, 8 (2008) 59-73.
- [23] S.H. Fan, Y.Y. Wang, J. Lu, Y.L. Zheng, D.M. Wu, Z.F. Zhang, Q. Shan, B. Hu, M.Q. Li, W. Cheng, CERS2 suppresses tumor cell invasion and is associated with decreased V-ATPase and MMP-2/MMP-9 activities in breast cancer, *Journal of cellular biochemistry*, 116 (2015) 502-513.
- [24] S. Ponnusamy, M. Meyers-Needham, C.E. Senkal, S.A. Saddoughi, D. Sentelle, S.P. Selvam, A. Salas, B. Ogretmen, Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance, *Future oncology*, 6 (2010) 1603-1624.
- [25] S. Sarkar, M. Maceyka, N.C. Hait, S.W. Paugh, H. Sankala, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells, *FEBS letters*, 579 (2005) 5313-5317.
- [26] S. Thangada, K.M. Khanna, V.A. Blaho, M.L. Oo, D.S. Im, C. Guo, L. Lefrancois, T. Hla, Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics, *The Journal of experimental medicine*, 207 (2010) 1475-1483.
- [27] W. Wang, M.H. Graeler, E.J. Goetzl, Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19 (2005) 1731-1733.

[28] M.L. Allende, M. Bektas, B.G. Lee, E. Bonifacino, J. Kang, G. Tuymetova, W. Chen, J.D. Saba, R.L. Proia, Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking, *The Journal of biological chemistry*, 286 (2011) 7348-7358.

Figure Legends

Fig. 1. Leukocyte-gating strategy for the measurement of S1PRs in cells subpopulations. Leukocytes were identified in a SSC/FSC plot for granulocytes, lymphocytes, and monocytes selection. (1). The lymphocyte gate was copied to a CD3/S1PR plot to identify T-cells expressing S1PRs (CD3+/S1PR+) (2). The granulocyte population was copied to a CD66b/S1PR plot identifying granulocytes that present S1PRs (CD66b+/S1PR+) (3). To identify monocytes subsets, monocytes were copied to a CD14/CD16 plot and divided into three populations: classical monocytes (CD14++/CD16-), intermediate monocytes (CD14++/CD16+) and non-classical monocytes (CD14+/CD16++) (4). Each monocyte population were copied to a CD14/S1PR plot to evaluate the presence of S1PRs in these monocytes (5, 6 and 7, respectively).

Fig. 2. Cytotoxicity analysis of S1P in whole blood. S1P cytotoxicity was evaluated in whole blood from healthy donors by MTT assay. The S1P showed statistical difference when compared with control (whole blood without treatment) in 100nM and 500nM, although did not influence the cytotoxicity. Data are expressed as means + SD. Vehicle: 0.02% DMSO. * $P > 0.05$.

Fig. 3. Cytokine analysis in BC and BCC whole blood supernatant. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A levels were measured by Cytometric bead array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit in whole blood supernatant of patients with breast

cancer (BC) with or without chemotherapy treatment (BCC) after (A) 4 h and (B) 18 h of S1P exposure. Presented results are of the cells without treatment, expressed in Median Fluorescence Intensity (MFI). * $P > 0.05$.

Fig. 4. Expression levels of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* mRNA in BC and BCC whole blood. (A) Relative quantification of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* messenger RNA (mRNA) in whole blood of patients with breast cancer (BC) with or without chemotherapy treatment (BCC) after 4 h of 100nM S1P treatment (B) and after stratifying BC group in lobular and ductal. Data were normalized with GAPDH and calibrated with the control group. Presented results are of the cells without treatment, calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data are expressed as means + SD. * $P > 0.05$ and ** $P > 0.01$.

Fig. 5. Expression levels of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* mRNA in BC and BBD tissues. (A) Relative quantification of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* messenger RNA (mRNA) in tissues from patients with breast cancer (BC) and benign breast disease (BBD) (B) and in stratified BC: DCIS – ductal carcinoma in situ, IDC-GII and III – invasive ductal carcinoma grade II and III. (C) Relative mRNA levels comparison of *SPHK1* and *SPHK2* in tissue from BBC and stratified BC. Data were normalized with GAPDH and calibrated with the control group. Expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Data are expressed as means + SD. * $P > 0.05$ and *** $P > 0.001$.

Fig. 6. Characterization of S1P receptors in BC and BCC blood cells. Expression of S1P receptors was analyzed in (A) T lymphocytes (CD3⁺), (B) Granulocytes (CD66b⁺), (C) classical monocytes (CD14, CD16⁻), (D) intermediate monocytes (CD14^{high}, CD16^{low}) and (E) non-classical monocytes (CD14^{low}, CD16^{high}) from patients with breast cancer (BC) with or without chemotherapy treatment (BCC). Data are expressed as means + SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 1. Clinical parameters of patients with breast cancer

	Blood Cell		Tissue	
	(n = 16)		(n = 12)	
Age (years)				
<49	6	37.50 %	6	50.00 %
≥50	10	62.50 %	6	50.00 %
Lymph node status				
cN0	5	31.25 %	4	33.33 %
cN1-3	3	18.75 %	5	41.66 %
cNx	4	25.00 %	3	25.00 %
NA	4	25.00 %	0	00.00 %
Tumor Stage				
cT1	4	25.00 %	2	16.66 %
cT2	5	31.25 %	6	50.00 %
cT3	4	25.00 %	0	00.00 %
cT4	0	00.00 %	2	16.66 %
cTX	0	00.00 %	2	16.66 %
NA	3	18.75 %	0	00.00 %
Histological grading				
DCIS	0	00.00 %	4	33.33 %
IDC-GI	1	6.25 %	0	00.00 %
IDC-GII	8	50.00 %	4	33.33 %
IDC-GIII	4	25.00 %	4	33.33 %
ILC-GI	1	6.25 %	0	00.00 %
ILC-GII	2	12.50 %	0	00.00 %
ER status				
Negative	4	25.00 %	1	8.33 %
Positive	11	68.75 %	9	75.00 %
NA	1	6.25 %	2	16.66 %
PgR status				
Negative	6	37.50 %	2	16.66 %
Positive	9	56.25 %	8	66.66 %
NA	1	6.25 %	2	16.66 %
HER-2 status				
Negative	11	68.75 %	4	33.33 %
Positive	4	25.00 %	6	50.00 %
NA	1	6.25 %	2	16.66 %
Molecular subtypes				
Luminal	12	75.00 %	9	75.00 %
HER-2-enriched	1	6.25 %	1	8.33 %
Triple negative	2	12.50 %	0	00.00 %
NA	1	6.25 %	2	16.66 %
Chemotherapy				
No	8	50.0 %	12	100.0 %
Yes	8	50.0 %	0	00.00 %

Table 1. Patients' characteristics. Abbreviations: DCIS, ductal carcinoma in situ; IDC-GI, II, III, invasive ductal carcinoma-grade I, II, III; ILC-GI, II, III, invasive lobular carcinoma-grade I, II, III; ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PgR, progesterone receptor; NA = not available. Subtypes were classified as luminal (ER + and/or PgR + with HER-2-), HER2-enriched (ER-/PgR-/HER2+), and triple negative (ER-/PgR-/HER2-).

Figure 1

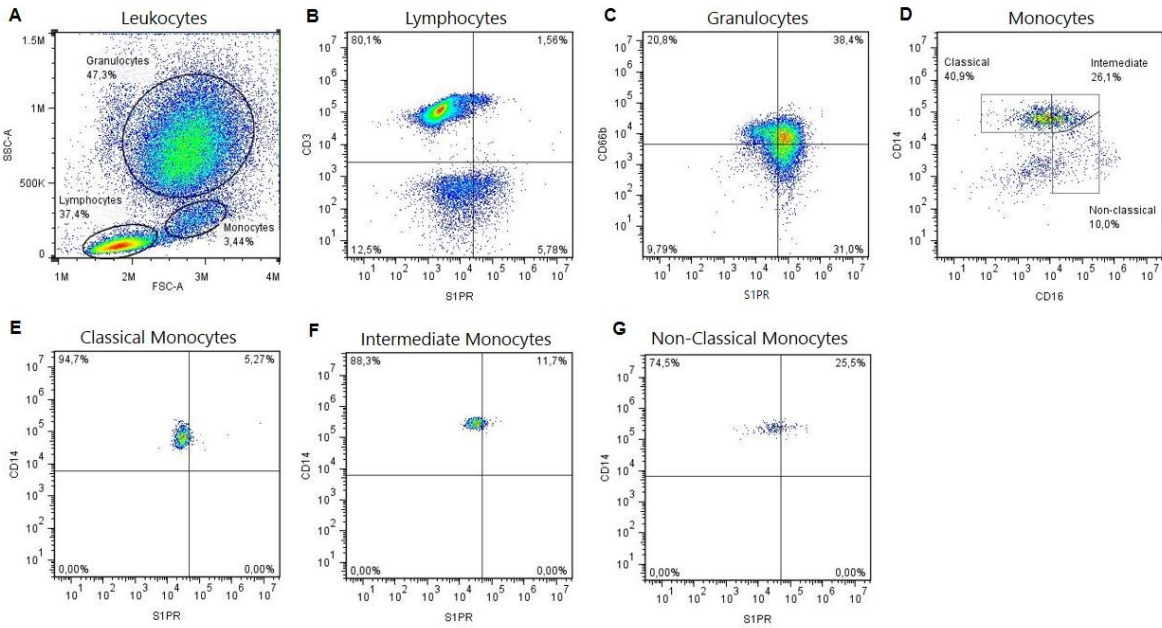


Figure 2

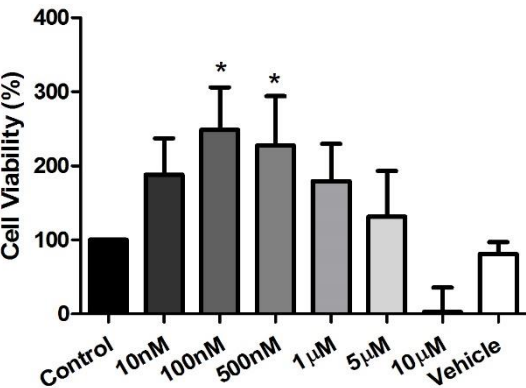


Figure 3

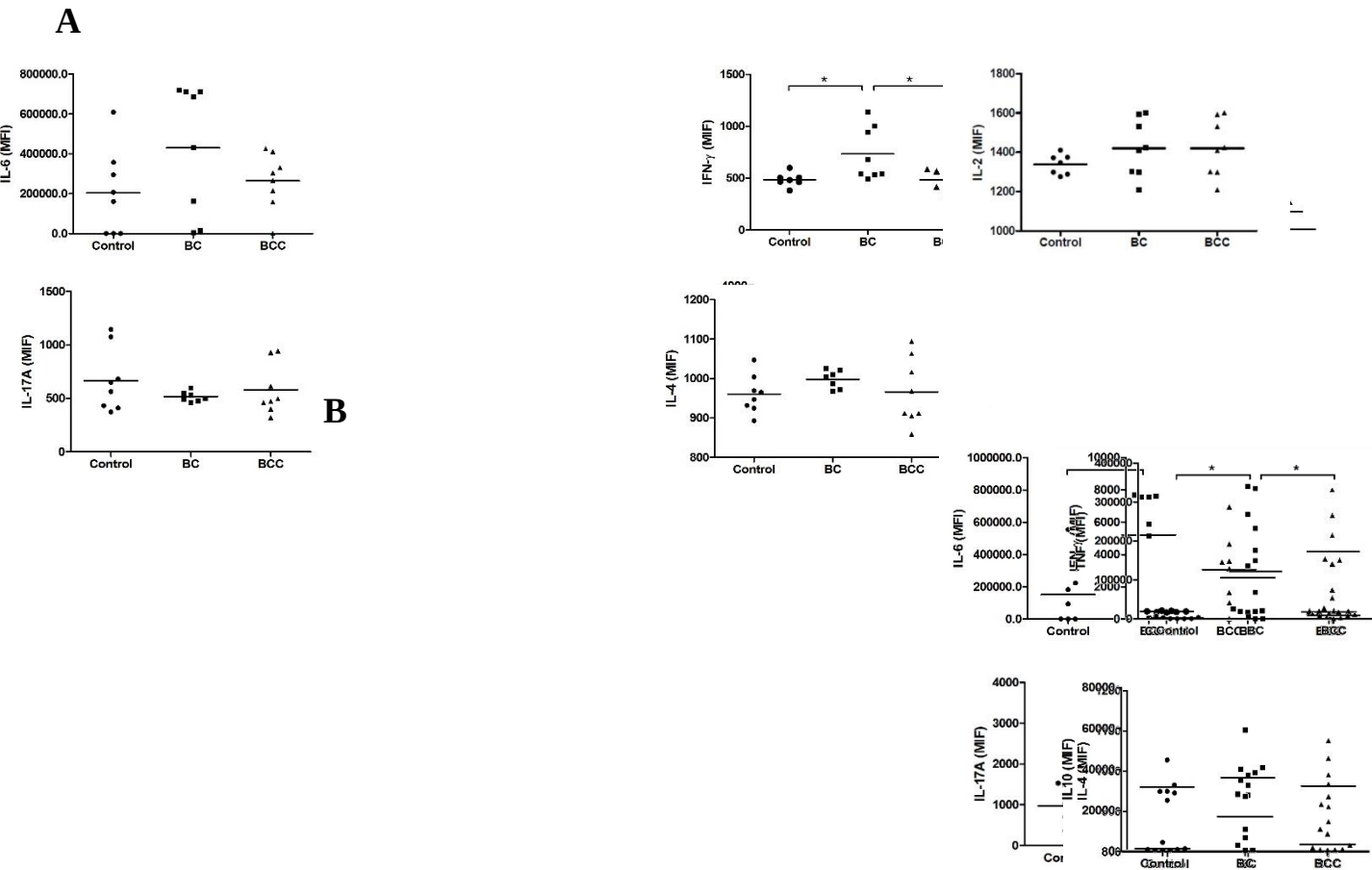
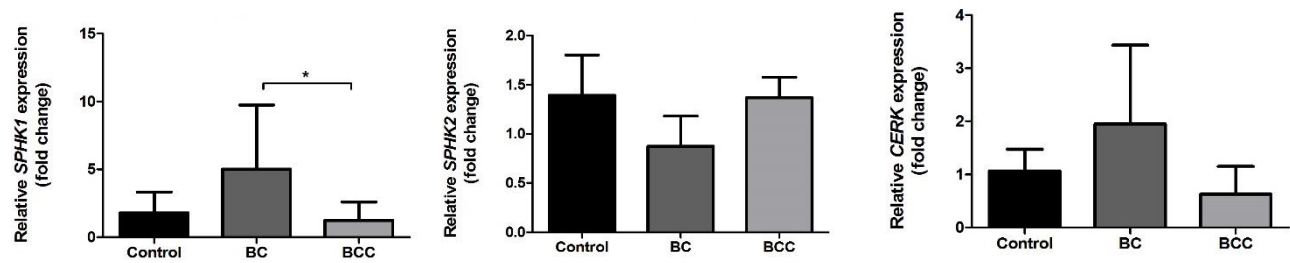


Figure 4

A



B

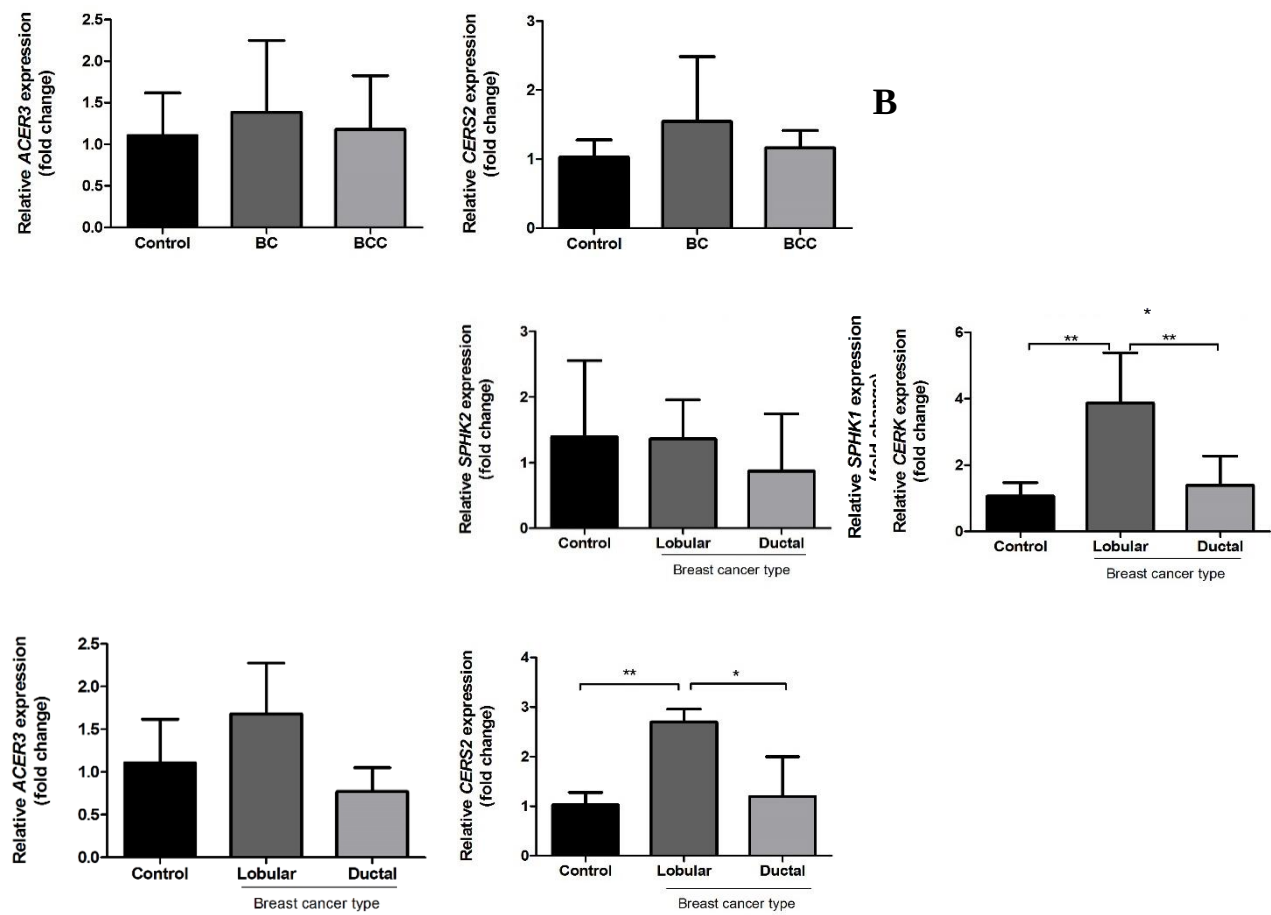


Figure 5

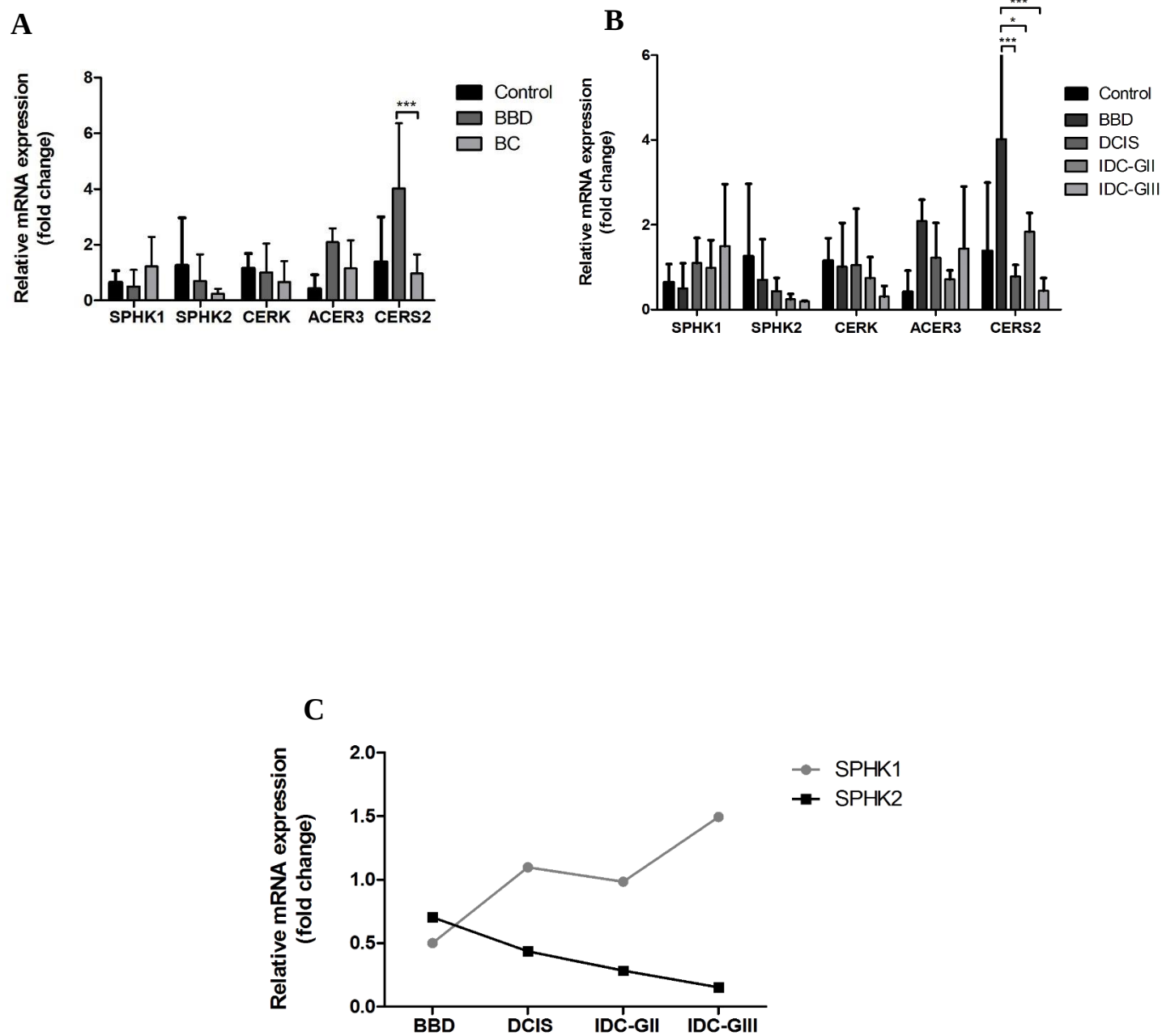
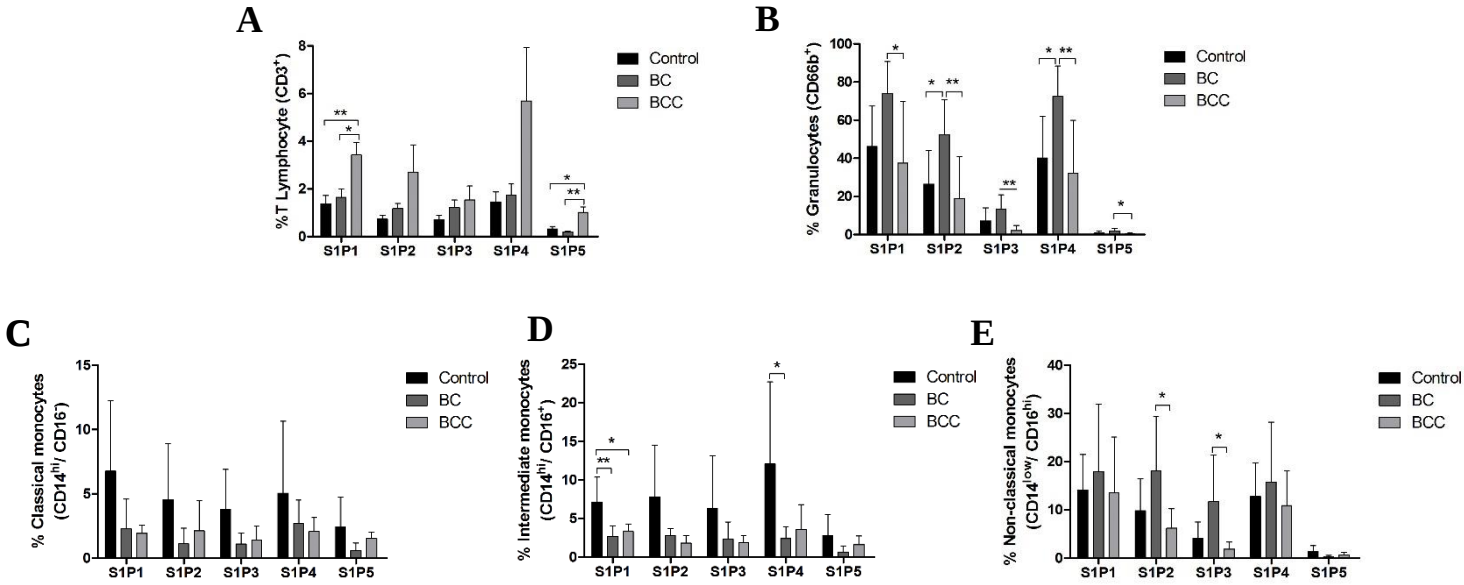


Figure 6



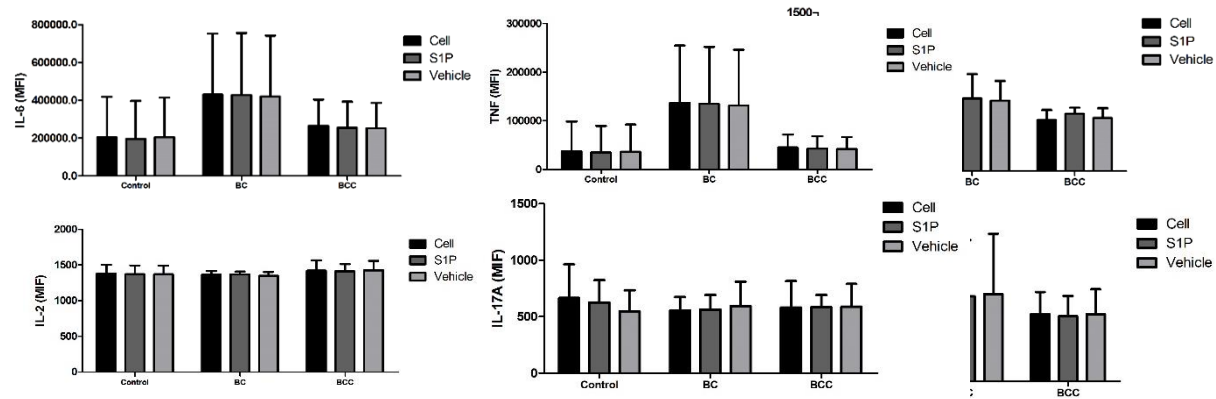
Supplementary Material

Supplementary Fig. 1. Cytokine analysis in BC and BCC whole blood supernatant. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A levels were measured by Cytometric bead array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Kit in whole blood supernatant of patients with breast cancer (BC) with or without chemotherapy treatment (BCC) after (A) 4 h and (B) 18 h of S1P exposure. Results expressed in Median Fluorescence Intensity (MFI). * $P > 0.05$.

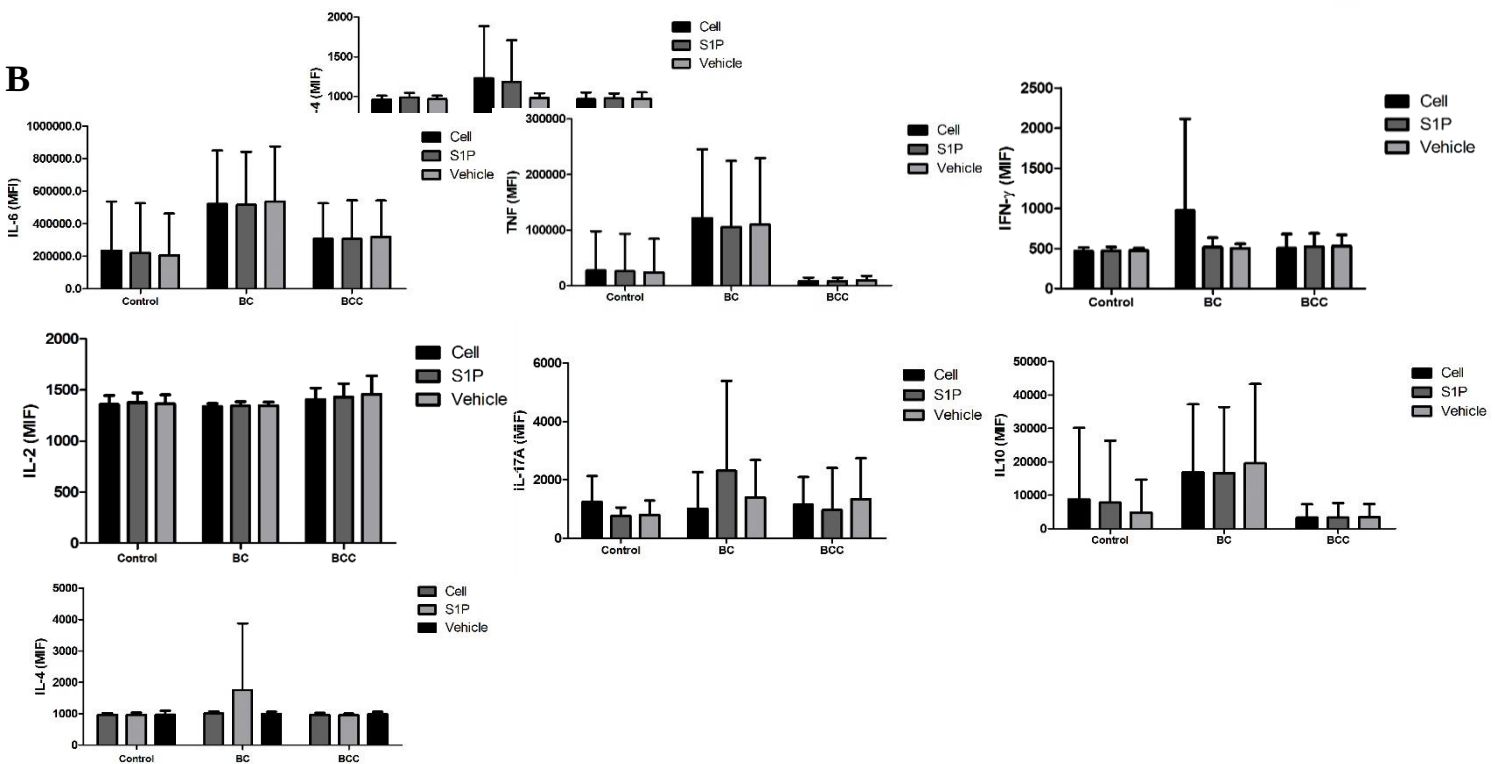
Supplementary Fig. 2. Expression levels of *SPHK1*, *SPHK2*, *CERK*, *CERS2* and *ACER3* mRNA in BC and BCC whole blood. Relative quantification of (A) *SPHK1*, (B) *SPHK2*, (C) *CERK*, (D) *ACER3* and (E) *CERS2* messenger RNA (mRNA) after 4 h of 100nM S1P treatment by qPCR. Data were normalized with GAPDH and calibrated with the control group. Results were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data are expressed as means + SD.

Supplementary Fig. 1.

A



B



Supplementary Fig. 2.

