UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

RAPHAEL DOUGLAS DA SILVA MOURA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GNT-V DURANTE A EVOLUÇÃO DE LESÕES EM TECIDOS UTERINOS HUMANOS

RECIFE, 2015.

RAPHAEL DOUGLAS DA SILVA MOURA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GnT-V DURANTE A EVOLUÇÃO DE LESÕES EM TECIDOS UTERINOS HUMANOS

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

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

RECIFE, 2015

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Moura, Raphael Douglas da Silva
Avaliação da expressão e atividade de GnT-V durante a evolução de lesões em tecidos uterinos humanos / Raphael Douglas da Silva Moura. – Recife: O Autor, 2015.

81 folhas: il., fig., tab.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biologia Aplicada à Saúde, 2015.
Inclui bibliografia

1. Útero – Câncer 2. Biomarcadores 3. Lectinas 4. Histoquímica. I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro. II Título.

616.994 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2015-151

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Nome: Moura, Raphael Douglas da Silva

Título: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GnT-V DURANTE A EVOLUÇÃO DE LESÕES EM TECIDOS UTERINOS HUMANOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde

Aprovada em 31 de março de 2015

Banca examinadora

_____

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Medeios
Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Igor Teixeira Cavalcanti
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar até esse momento e por me privilegiar com saúde e disposição suficientes para que eu conseguisse finalizar esse trabalho, o qual vocês leem; aos meus pais, por sempre incentivarem e apoiarem a minha formação e por serem minha principal referência de amor e dedicação; ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Beltrão, por me receber mais uma vez como seu aluno, por partilhar seu vasto conhecimento sobre as ciências e a vida, por sua postura sempre respeitosa e por contribuir de forma fundamental para a conquista desse objetivo; ao meu, praticamente, "segundo orientador", Arthur Clark, por dispor de muito do seu tempo e conhecimento em prol de uma cooperação incalculável na construção dessse trabalho; aos meus colegas do grupo Biomarcadores no Câncer, pela colaboração e boa convivência diária, em especial a Ígor, Bruno e Aline pela contribuição direta em momentos oportunos; aos meus colegas de trabalho do Hospital das Clínicas, pela disposição solidária em assumir novas responsabilidades, ocorridas em momentos nos quais minha ausência se fez necessária, em especial à Geórgia, Patrícia, Andrew, Rosana e Rosário; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e o Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), por disponibilizarem suas estruturas físicas e organizacionais para elaboração desse trabalho; e finalmente, à minha namorada, aos meus familiares e aos meus amigos, por compreenderem a escassez da minha presença no período de redação dessa dissertação, na qual coloco agora a última pontuação e redijo a última expressão: Muito Obrigado!!!

RESUMO

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres. A superfície externa das células de mamíferos é composta de um glicocálix. Lectinas têm sido empregadas como sondas histoquímicas na avaliação da formação dessa estrutura de glicanos que é sintetizada por glicosiltransferases. Entre elas a N-acetil-glicosaminiltransferase V (GnT-V) atua na formação de uma ramificação de glicanos inserindo um resíduo de N-acetilglicosamina através de uma ligação β1,6 a uma manose, formando uma estrutura tetraantenária. Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão da GnT-V durante a progressão de lesões do colo uterino (Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) graus I, II e III e carcinoma de células escamosas (CCE)) utilizando imunohistoquímica contra MGAT5 e histoquímica com lectinas. Foram avaliadas 75 amostras (normal=15, NIC 1=15, NIC 2=15, NIC 3=15 e CCE=15). Os resultados mostraram que a GnT-V não apresentou diferenças significativas de expressão entre os diferentes diagnósticos, sendo majoritariamente classificada como de baixa expressão. L-PHA mostrou que 93,3% das amostras normais, 88,9% dos NICs e 60% dos CCE apresentaram alta expressão de ramificação do tipo β1,6. Foi observada uma maior expressão na região basal do epitélio escamoso normal, sendo a marcação de membrana e citoplasma. No carcinoma também observou-se uma marcação nuclear heterogênea e não significativa. DSA não mostrou diferenças significativas de marcação nos tecidos normais e transformados (NICs e CCE), porém tal diferença foi evidenciada pela PWM. Os resultados não demonstraram uma relação direta entre a expressão da GnT-V e as cadeias de polilactosamina (PoliLacNAc) nos tecidos do colo uterino humano, contudo eles revelaram uma significativa associação entre as PoliLacNAc e os diagnósticos das NICs e do CCE da cérvice.

Palavras chave: Câncer, útero, imunohistoquímica, GnT-V, polilactosamina.

ABSTRACT

Uterus colon cancer is the fourth type of cancer most common among women. Mamalian cell surface present a glycocalix. Lectins have been used as histochemistry probes to the evaluation of glycans structure which are synthesized by glycosyltransferases. One of them is the N-Acetyl-glucosaminyltransferase V (GnT-V) which catalyzes the formation of branching glycans adding residues of N-Acetyl-glucosamine via a β-1,6 bond with a mannose. This action results in a glycan with a tetraantenary structure. The present work aimed to evaluate the expression of GnT-V during the progression of uterus colon lesions (cervical intraepithelial neoplasias (CIN) grades I, II and III and squamous cell carcinoma, SCC) using immunohistochemistry agains MGAT5 and lectin histochemistry. Seventy five samples (normal=15, CIN 1=15, CIN 2=15, CIN 3=15 and SCC=15) were analyzed. GnT-V did not presented significative difference among all diagnosis being predominantly classified as of low expression. L-PHA lectin evidenced that 93.3% of normal samples, 88.9% of CINs and 60% of SCC presented a high expression of branching of β-1,6 bond. In normal squamous epithelium this expression was predominantly observed in the cytoplasm and membrane of its basal cell while in SCC it was observed in the nucleous with a heterogeneous pattern. DSA did not showed significtive differences in the staining of normal and transformed tissues (CIN and SCC), however this difference was evidenced by PWM. The results did not showed a relation between GnT-V expression and polilactosamine (PolyLacNAc) chains in human uterus colon tissues but they revealed a significant association between PolyLacNAc and transformed tissues of uterus colon (CIN and SCC).

Keywords: Cancer, uterus, immunohistochemistry, GnT-V, polilactosamine.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Processo de transferência "em bloco", na co-tradução, do precursor do oligossacarídeo Glc3Man9GlcNAc2 do dolicol pirofosfato para a asparagina, catalisada pela oligossacaril transferase (OST) no lúmen do RE. Glc-NAc: N-acetil-glicosamina. (Fonte: BIEBERICH, 2014). 23

Figura 2. Papel de glicanos em glicoproteína no dobramento protéico mediado por chaperonas. Glc: glicose; UDP: uracil difosfo nucleotídeo; RE: retículo endoplasmático (Fonte: http://images.slideplayer.es/1/85401/slides/slide_24.jpg em 15/02/2015). 24

Figura 3. Estrutura núcleo do glicanos em glicoproteínas. (Fonte: SUITS *et al*., 2010 modificado). 25

Figura 4. Carboidratos O-ligados comuns em mucinas. O núcleo 1 é formado por um antígeno Tn ligado a uma galactose. O núcleo 2 é formado por um núcleo 1 ligado a uma N-acetilglicosamina. A via comum dos tipos de núcleo são indicadas por setas pretas. (FONTE: STANSELL et al., 2011). 27

Figura 5: Estrutura típica de glicanos tipo polilactosamina em (a) N-glicanos e em (b) O-glicanos. Gal: galactose; GlcNAc: N-Acetil-glicosamina; Man: manose; GalNAc: N-Acetil-galactosamina. (Fonte: MITSUE et al., 2012). 28

Figura 6: Representação das dobras estruturais de (a) GT-A, (b) GT-B e (c) GT-C. (Fonte: adaptado de Gloster, 2014). 31

Figura 7. Cooperação entre GnT-V e EGF na proliferação celular através do aumento de suas expressões e função. (Fonte: MIYOSHI *et al*., 2012 modificado). 34

Figura 8: Progressão morfológica de NIC para Carcinoma Escamoso Invasivo. (Fonte: INCA 2014, modificado). 40

ARTIGO

Figura 1: Gráfico correspondente ao número de casos: (a) positivos e negativo para o anticorpo anti-MGAT5; (b) apresentando alta ou baixa expressão de ramificações β(1,6) GlcNAc, sendo a alta expressão significativamente diferente do conjunto normal/NICs para o carcinoma (p=0,0111)*; (c) positivos ou negativos para a lectina DSA; (d) positivos e negativos para a lectina PWM, comparando a diferença entre os tecidos normais e as NICs reunidas (p=0,0059)** e a diferença quando comparados os tecidos normais com os transformados (NICs + CCE) (p=0,083)**. 76

Figura 2: Imunohistoquímica para GnT-V. (a) Controle positivo em tecido normal gástrico (100x), (b) amostra de NIC 1 negativa para GnT-V (100x), (c) amostra de NIC 1 positiva apresentando marcações citoplasmaticas (100x), (d) amostra com CCE positiva apresentando marcações citoplasmáticas (400x). 77

Figura 3: : Gráfico mostrando o score da imunomarcação da GnT-V. Evidencia-se que o score referente a alta expressão (3-5) esteve presente apenas nas amostras transformadas (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CA) do colo uterino. 78

Figura 4: Histoquímica com L-PHA. (a) Amostra de tecido normal positiva com marcações em todo epitélio escamoso, com maior intensidade no citoplasma das células da camada basal (100x), (b) e (d) Amostra de tecido com NIC 1 positiva, apresentando maior intensidade de marcação nas células transformadas (100x), (c) Amostra de tecido com NIC 2 positiva, apresentando maior intensidade de marcação nas células transformadas (100x), (e) Amostra de tecido com NIC 3, mostrando a diferença de marcação da L-PHA no epitélio normal do epitélio adjacente da NIC (100x), (f) Amostra com CCE apresentando marcação citoplasmática para a L-PHA (400x). 79

Figura 5: Histoquímica com DSA. (a) epitélio escamoso normal apresentando marcações citoplasmáticas e nucleares (400x), (b) Amostra de epitélio com NIC 3 positiva para DSA, apresentando marcações nucleares (400x), (c) Amostra de tecido com NIC 1, com epitélio negativo para a DSA (100x), (d) Amostra de tecido com CCE apresentando marcações nucleares para a DSA (100x). 80

Figura 6: Histoquímica com PWM. (a) amostra de tecido normal mostrando epitélio escamoso negativo (100x). (b) Amostra de tecido com NIC 3 apresentando marcações nucleares (400x), (c) Amostra com CCE apresentando marcações nucleares (400x). 81

Figura 7: Marcação nuclear para a lectina PWM, comparando os tecidos normais com o conjunto dos tecidos transformados (NICs + carcinoma) (p=0,0386)*. 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn: Asparagina

BSA: Albumina de soro bovino

CA-125: Antígeno 125 do câncer

CAZy: Carbohydrate Active enZyme

CCE: Carcinoma de células escamosas

CEA: Antígeno carcinoembrionário

Cys: Cisteína

DAB: Diaminobenzidina

Dol-PP: Dolicolpirofosfato

DSA: *Datura stramonium*

dsT: Disialil-T

Fuc: Fucose

Futs: Fucosiltransferases

GAG: Glicosaminoglicanos

Gal: Galactose

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GalTs: Galactosiltransferases

Glc: Glicose

GlcNAc: N-acetilglicosamina

GnTs: N-acetilglucosaminiltransferases

GnT-V: N-acetilglucosaminiltransferase V

GT: glicosiltransferase

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HPV: Vírus do papiloma humano

HSIL: Lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau

LacNac: N-acetillactosamina

L-PHA: *Phaseolus vulgaris*

LSIL: Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau

Man: Manose

Neu5Ac: Ácido siálico

NIC: neoplasia intraepitelial cervical

OST: Oligossacaril transferase

PBS: Tampão fosfato sódio

PoliLacNAc: Poli N-acetil lactosamina

Pro: Prolina

PSA: Antígeno prostático-específico

PWM: *Phytolacca americana*

RE: Retículo endoplasmático

R-EGF: Receptor do fator de crescimento epidermal

RNA: Ácido ribonucléico

Ser: Serina

sLe^x: Sialil-$Lewis^x$

sT: Sialil-T

sTn: Sialil-Tn

STs: sialiltransferases

Thr: Treonina

β3GnT: β1,3-N-acetilglucosaminiltransferase

β4GalT: β1,4-galactosiltransferase

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1 INTRODUÇÃO **13**
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **17**
2.1 CARBOIDRATOS DE SUPERFÍCIE CELULAR **17**
2.2 SÍNTESE DE GLICANOS E GLICOPROTEÍNAS **20**
2.2.1 N-GLICOSILAÇÃO **20**
2.2.2 O-GLICOSILAÇÃO **25**
2.3 POLI-N-ACETIL LACTOSAMINAS **27**
2.4 GLICOSILTRANSFERASES **29**
2.4.1 MANOSIL (α-1,6-)-GLICOPROTEÍNA β-1,6-N-ACETIL GLUCOSAMINILTRANSFERASE (GnT- V) **31**
2.5 CÂNCER **34**
2.6 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO **37**
2.6.1 CARBOIDRATOS COMO BIOMARCADORES NO CÂNCER **40**
2.7 LECTINAS **42**
3 OBJETIVOS **45**
3.1 GERAL **45**
3.2 ESPECÍFICOS **45**
4 REFERÊNCIAS **46**
5 ARTIGO **59**

1. INTRODUÇÃO

A superfície externa das células de mamíferos, incluindo as malignas, é composta por um glicocálice, rico em carboidratos, o qual está envolvido na interação célula-célula e célula-matriz extra-celular (THÖM *et al*, 2007; CHEN *et al*, 2007). Portanto, as glicoproteínas de superfície celular têm um papel importante em vários eventos celulares que ocorrem na embriogênese, desenvolvimento do tecido, diferenciação de células-tronco e doenças, tais como o câncer (PASZEK *et al*., 2014).

A glicosilação é uma modificação pós-tradução frequente que resulta na adição de sacarídeos (em uma sequência determinada) a proteínas e lipídeos de superfície celular, ou ainda a glicanos complexos ou outro composto orgânico, através de uma ligação covalente (REIS *et al.*, 2010; GLAVEY *et al.*, 2015). Este processo é catalisado por enzimas, glicosiltransferases, que utilizam doadores de açúcares específicos como substratos. Desta maneira, os glicanos estão presentes em diversos tipos de biomoléculas classificadas em diferentes famílias de glicoconjugados, dentre elas as glicoproteínas. Existem dois tipos de glicano em glicoproteínas: *O*-glicanos e *N*-glicanos. Os dois tipos de glicosilação podem coexistir na mesma célula e na mesma proteína (REIS *et al*., 2010).

Neste contexto, Poli-*N*-acetil lactosaminas (PoliLacNAc) são cadeias de glicanos formadas por unidades repetidas de N-acetillactosamina (LacNac) (Galβ1-4GlcNAcβ1-3)n as quais podem ser formadas tanto em glicolipídios como nos glicanos O- ou N-ligados a proteínas (Figura 5). Sua síntese é realizada de maneira coordenada pela ação alternada de uma β1,4-galactosiltransferase (β4GalT) e uma β1,3-N-Acetil-glucosaminiltransferase (β3GnT) (TOGAYACHI *et al*., 2007; GUO *et al*., 2008).

A PoliLacNAc é preferencialmente sintetizada nas ramificações β(1,6) de N-glicanos tetraantenários (GUO *et al*., 2008). Suas cadeias são frequentemente ramificadas no carbono 6 do resíduo de galactose. Uma vez ramificadas, essas cadeias se tornam volumosas e consequentemente passam a ser bons suportes para epítopos de carboidratos, reconhecidos por seus respectivos receptores. PoliLacNAc$_s$ ramificadas são amplamente expressas em células multipotentes de embriões, diminuindo durante a embriogênese, e transportam consigo antígenos relacionados ao oncodesenvolvimento (CHEN *et al.*, 2005).

Ramificações de N-glicanos são sintetizadas por diversas glicosiltransferases, tais como galactosiltransferases (GalTs), fucosiltransferases (Futs), sialiltransferases (STs) e N-acetilglicosaminiltransferases (GnTs). As GnTs, classificadas como de I a VI, atuam em uma estrutura núcleo comum de Manα1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn (TANIGUCHI & KOREKANE, 2011). Essa enzima tem sido diretamente relacionada ao câncer, tanto no crescimento como na metástase, em diversos tipos de tumores (LAU & DENNIS, 2008; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015). Dentre estes podemos citar o câncer de mama, cólon, endométrio, hepatocelular, e tumores mucinosos do ovário (GRANOVSKY *et al*., 2000; MURATA *et al*., 2000;. YAMAMOTO *et al*., 2007; MEHTA *et al*., 2012; TAKAHASHI *et al*., 2009).

Sharon e Lis (2004) definem lectinas como um grupo de proteínas ou glicoproteínas naturais e ubíquas, sem atividade catalítica, capazes de se ligar, a partir de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, a carboidratos livres ou conjugados. Devido às interações lectina-carboidratos serem reversíveis e altamente específicas, elas têm sido amplamente empregadas em diferentes áreas científicas como ferramentas para análise do perfil glicídico de glicoconjugados, glicoproteínas na sua maioria (CLARK *et al.*, 2014). Destaca-se então que, enquanto os açúcares são capazes de carrear uma

informação biológica, lectinas são capazes de decifrar esse glicocódigo (BELTRÃO *et al.*, 2003). Assim, lectinas são sondas que identificam modificações nos padrões de expressão de carboidratos de glicoproteínas e contribuem no diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos (SHARON & LIS, 2004). Um grande número de lectinas tem sido empregado como sonda histoquímica no diagnóstico histopatológico em tecidos da cavidade oral (REGO *et al.*, 2005); cérebro humano (BELTRÃO *et al.*, 2003); mama (BELTRÃO *et al.*, 1998, 2001; CAMPOS *et al*., 2006, SANTOS *et al.*, 2006a,b) entre outros.

Entre as mulheres, o câncer do colo do útero ocupa atualmente, no mundo, a quarta posição dentre os tipos de cânceres mais incidentes no gênero, sendo responsável por 7,9% da incidência total de neoplasias no sexo feminino, ficando atrás dos cânceres de mama (25,2%), colorretal (9,2%) e pulmão (8,7%). 87% dos 265 mil óbitos causados pelo câncer do colo uterino em 2012 ocorreram nos em países em desenvolvimento (WHO, 2014). Para o Brasil, foram estimados 15.590 casos novos do câncer do colo uterino para o ano de 2014, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Biomarcador é definido como uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos que sejam um sinal de um processo normal ou alterado ou ainda de uma condição ou doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Carboidratos têm se mostrado biomarcadores promissores e alterações nos padrões de glicosilação são frequentemente um resultado de atividades alteradas de glicosiltransferases e glicosidases sendo associadas com várias doenças humanas (KINOSHITA *et al*., 2014), dentre elas o desenvolvimento neoplásico, que provoca glicosilações aberrantes, levando na maioria das vezes, a um encurtamento das cadeias de glicanos ou a uma super-expressão das mesmas na superfície de células, nas quais,

normalmente, são ausentes ou discretas (GUILLOT *et al.*, 2004). Esses carboidratos têm sido identificados tanto qualitativa como quantitativamente através da histoquímica com lectinas (GHAZARIAN *et al.*, 2010).

O fenótipo maligno das células do câncer tem como parte de sua modulação a alteração da glicosilação onde os glicanos se mostram extensivamente alterados, todavia, os mecanismos que regulam os genes implicados nessas alterações ainda não são bem compreendidos. Os estudos a cerca dos mecanismos pelos quais os glicanos alterados provocam modificações na biologia celular do câncer têm um maior grau de dificuldade devido à complexidade e heterogeneidade dos glicanos, contudo o uso de lectinas, entre outras sondas, tem possibilitado a avaliação e entendimento do glicocódigo em diversos tecidos (GLAVEY *et al.*, 2015).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARBOIDRATOS DE SUPERFÍCIE CELULAR

O termo carboidrato surgiu do fato de que a maioria dos açúcares simples são identificados pela fórmula empírica CnH2nOn, onde n é ≥ 3, sugerindo que os átomos de carbono são de alguma maneira combinados com a água. Desta forma os químicos passaram a designar estes compostos como hidratos de carbono e finalmente carboidratos (WADE, 1999).

Por mais de um século, os ácidos nucléicos, proteínas e lipídios têm capturado a atenção de pesquisadores de todo o mundo, porém mais recentemente (a partir da década de 1950), possivelmente pela sua complexidade, e pelo fato de não serem codificados no genoma, os carboidratos têm recebido uma maior atenção, traduzida pela grande expansão da glicobiologia (GHAZARIAN *et al*.,2011).

Estudos em microscopia de células eucarióticas e bactérias demonstraram a presença de uma estrutura comum, descrita inicialmente como um "revestimento celular açucarado", que se apresentava na forma de membranas basais ou paredes celulares, sendo posteriormente designada glicocálice. Inicialmente foi sugerido que esse revestimento polissacarídico tivesse como funções principais, a proteção da célula e a atuação como dispositivo de filtração e ligação seletiva, moldando desta forma o microambiente acima da membrana plasmática (GABIUS *et al.*, 2011).

Posteriormente, verificou-se que o glicocálice também desempenha um papel chave na condução do fluxo de informação desse microambiente para as vias de transdução de sinais na membrana plasmática (PASZEK *et al*., 2014). O glicocálice juntamente com a matriz extracelular formam plataformas bioquímicas para uma

infinidade de processos regulatórios e de reconhecimento, consequentemente atuando na manutenção da integridade e correta operacionalidade do ambiente celular (GABIUS *et al.*, 2011).

O glicocálice é composto por uma complexa rede de glicoconjugados com ampla glicosilação, tanto na frequência como no tamanho das cadeias polissacarídicas (GABIUS *et al.*, 2011). A composição dos glicanos e glicoproteínas da superfície celular muda notavelmente e de forma conjunta com as transições do desenvolvimento celular que ocorrem na embriogênese, desenvolvimento do tecido, diferenciação de células-tronco e doenças, tais como o câncer (PASZEK *et al*., 2014).

A complexidade dos glicanos de superfície celular e sua diversidade estrutural permitem que eles atuem não só na sinalização e desenvolvimento, mas também como moléculas de reconhecimento e adesão. Como tais, esses glicanos estão envolvidos em uma série de funções que incluem a inibição por contato, o reconhecimento célula-célula, a interação patógeno-hospedeiro durante a infecção, a resposta imune, o tráfego intracelular, a rigidez da membrana e a metástase (WANG & HUANG, 2009; GHAZARIAN *et al*., 2011; PASZEK *et al*., 2014; GLAVEY *et al*., 2015).

A maior parte dos oligossacarídeos existe na forma de glicoproteínas e glicolipídeos, muitos dos quais se localizam na superfície das células. Tais oligossacarídeos possuem uma riqueza em variações estruturais de acordo com a espécie, tecido e grau de diferenciação celular (SHIMMA *et al.*, 2006). A formação de pelo menos 41 ligações entre açúcar e proteína, das quais participam os aminoácidos (com conhecidamente 8 locais diferentes de receptores de carboidratos) e 13 açúcares (conhecidamente participantes de conjugados), evidencia a grande diversidade destes tipos de conjugação na natureza (GABIUS & KAYSER, 2014; SOLÍS *et al*., 2015).

Algumas características estruturais dos açúcares os identificam como moléculas de grande potencial de variabilidade estrutural. São elas, o status anomérico (α ou β); as possíveis posições de ligação quanto ao carbono de dois anéis de piranoses (por exemplo, 1-2, 1-3, 1-4 ou 1-6); o tamanho do anel; as substituições local-específicas como fosforilação, sulfatação ou acetilação ou ainda a introdução de ramificações. Tais características juntas formam uma extensa fonte de produção de isômeros, o que faz dos carboidratos ideais para a geração de unidades compactas com propriedades informativas explícitas (GABIUS *et al.*, 2011, SOLÍS *et al*., 2015).

Em números, a extensão da formação de arranjos sacarídicos supera em muito a capacidade equivalente dos nucleotídeos e aminoácidos (SOLÍS *et al.*, 2015). Quando comparados diretamente, enquanto são potencialmente formados 4096 oligonucleotídeos e $64x10^6$ peptídeos, o número de isômeros de oligossacarídeos produzidos é de 1.44×10^{15} (GABIUS *et al.*, 2011).

As cadeias de carboidratos são capazes de modular a interação da proteína glicosilada com o seu ambiente influenciando fatores-chave tais como: a meia-vida da proteína, solubilidade, atividade de ligação e especificidade. Diferentes estruturas de glicanos podem ser encontradas em proteínas que possuem a mesma sequência de aminoácidos, produzindo, consequentemente, diferentes glicoformas da mesma proteína. Tais glicoformas podem ser distintas quanto as suas propriedades como estabilidade, localização, dobramento e especificidade do ligante, causando implicações em diversos processos biológicos (GLAVEY *et al*., 2015).

Bioquimicamente os carboidratos são mais do que o combustível ou o concreto para as paredes celulares. Analisando suas propriedades químicas fica perceptível sua capacidade de transformar suas unidades básicas (monossacarídeos) em unidades complexas e diversificadas. Apesar do papel central dessa complexidade na imensa

diversidade de codificação baseada em glicanos, ela representa um grande desafio no que se refere à análise desses compostos (GABIUS E KAYSER, 2014).

2.2 **SÍNTESE DE GLICANOS E GLICOPROTEÍNAS**

A glicosilação é uma modificação pós-tradução frequente que resulta na adição de sacarídeos (em uma sequencia determinada) a proteínas e lipídeos de superfície celular, ou ainda a glicanos complexos ou outro composto orgânico, através de uma ligação covalente (GLAVEY *et al.*, 2015). Este processo é catalisado por enzimas, glicosiltransferases, que utilizam doadores de açúcares específicos como substrato. Desta maneira os glicanos estão presentes em diversos tipos de biomoléculas classificadas em diferentes famílias de glicoconjugados, dentre elas as glicoproteínas. Existem dois tipos de glicano em glicoproteínas: O-glicanos e N-glicanos. Os dois tipos de glicosilação podem coexistir na mesma célula e na mesma proteína (REIS *et al.*, 2010).

2.2.1 **N-GLICOSILAÇÃO**

Os N-glicanos são, por sua natureza química, oligossacarídeos - cadeias ramificadas de resíduos de açúcar conectados entre si por ligações α- e β-glicosídicas - que são ligados, via N-Acetilglicosamina (GlcNAc), ao nitrogênio do grupo amida da asparagina (Asn) dentro de uma sequência receptora de N-glicosilação específica (Asn)-X-Serina/Treonina (Ser/Thr) (BIEBERICH, 2014; SOLÍS *et al.*, 2015), ou em casos raros (Asn)-X-Cisteína (Cys), de cadeias polipeptídicas nascentes, onde X é qualquer aminoácido que não a Prolina (Pro), em ambos os casos (REIS *et al.*, 2010).

A estrutura inicial do N-glicano é formada por 14 resíduos de açúcar: três glicoses (Glc), nove manoses (Man) e duas GlcNac (Glc3Man9GlcNAc2) que são primeiro sintetizadas em um lipídeo ancorador, dolicolpirofosfato (Dol-PP), no retículo endoplasmático (RE) (BIEBERICH, 2014).

Em eucariotos a montagem do oligossacarídeo precursor é realizada por glicosiltransferases (GTs) altamente específicas. Inicialmente essas GTs transferem os primeiros sete açúcares (2 GlcNAc e 5 Man) no lado citosólico do RE, formando o Dol-PP-GlcNAc2Man5. Posteriormente esse intermediário é translocado para o lúmen dessa organela onde recebe mais quatro resíduos de manose e três de glicose (Figura 1) (FREEZE & AEBI, 2005; BIEBERICH, 2014). As GTs atuantes nessas ligações são respectivamente N-acetilglicosiltransferases, manosiltransferases e glicosiltransferases que obtêm seus substratos a partir dos nucleotídeos (uracil-difosfo nucleotídeo) doadores ativados UDP-GlcNAc, GDP-Man, e UDP-Glc, respectivamente, presentes nos lados citosólico e luminal do RE (BIEBERICH, 2014).

A translocação do oligossacarídeo precursor do lado citosólico para o lúmen do RE acontece a partir da atuação de um complexo enzimático multimérico conhecido como oligossacaril transferase (OST), formado, nos eucariotos superiores, por quatro subunidades distintas, nas quais as funções específicas ainda são temas de pesquisas (BIEBERICH, 2014).

Em um segundo momento do processo de glicosilação inicia-se uma remoção ordenada de monossacarídeos selecionados, presentes na ligação oligossacarídeo-proteína recém-formada, e posteriormente uma adição de outros monossacarídeos, tanto no RE como também no aparelho de Golgi. As modificações ocorridas no oligossacarídeo refletem uma diversidade de funções relacionadas com o dobramento da

glicoproteína, controle de qualidade, triagem, degradação e secreção no RE (HELENIUS & AEBI, 2004; FREEZE & AEBI, 2005).

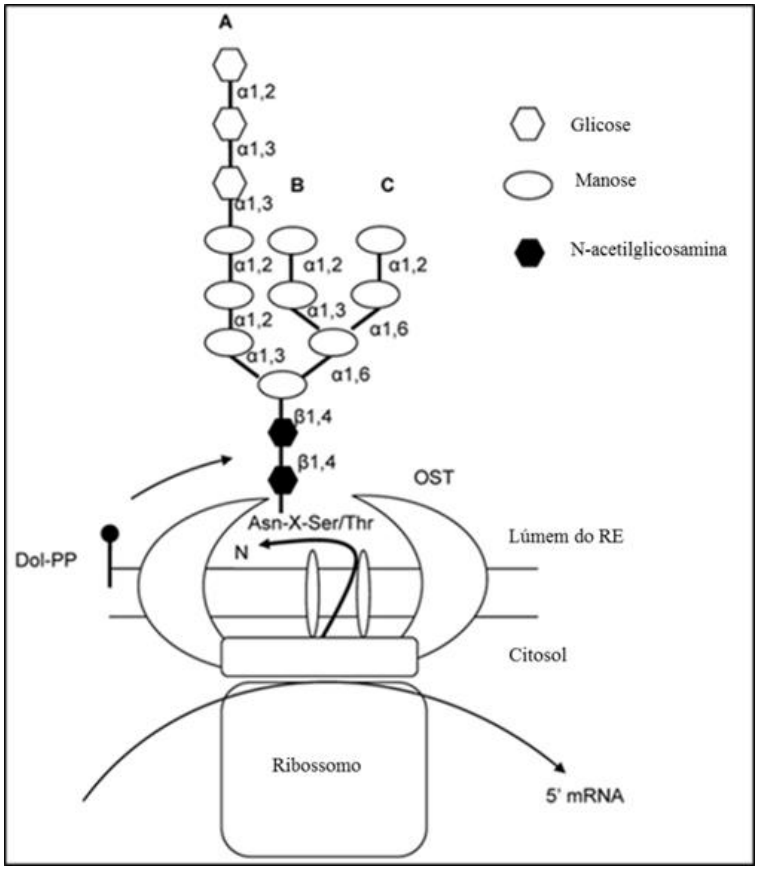

Figura 1. Processo de transferência "em bloco", na co-tradução, do precursor do oligossacarídeo Glc3Man9GlcNAc2 do dolicol pirofosfato para a asparagina, catalisada pela oligossacaril transferase (OST) no lúmen do RE. Glc-NAc: N-acetil-glicosamina. (Fonte: BIEBERICH, 2014).

Existem duas vias através das quais os oligossacarídeos Glc3Man9GlcNAc2 N-ligados são processados: a via glicosidase-independente, a qual é catalisada por endomanosidase, que retira um resíduo Glc1-3Man1 no aparelho de Golgi, mas tem sua função e regulação ainda desconhecida; e a via glicosidase-dependente, a qual é mediada por uma clivagem hidrolítica sequencial, dos resíduos de glicose terminal, pelas glicosidases I e II. Esta sequência é incorporada em uma revisão do dobramento de proteínas acompanhada por chaperonas: o ciclo calnexina/calreticulina (ALONZI *et al.*, 2013) (Figura 2).

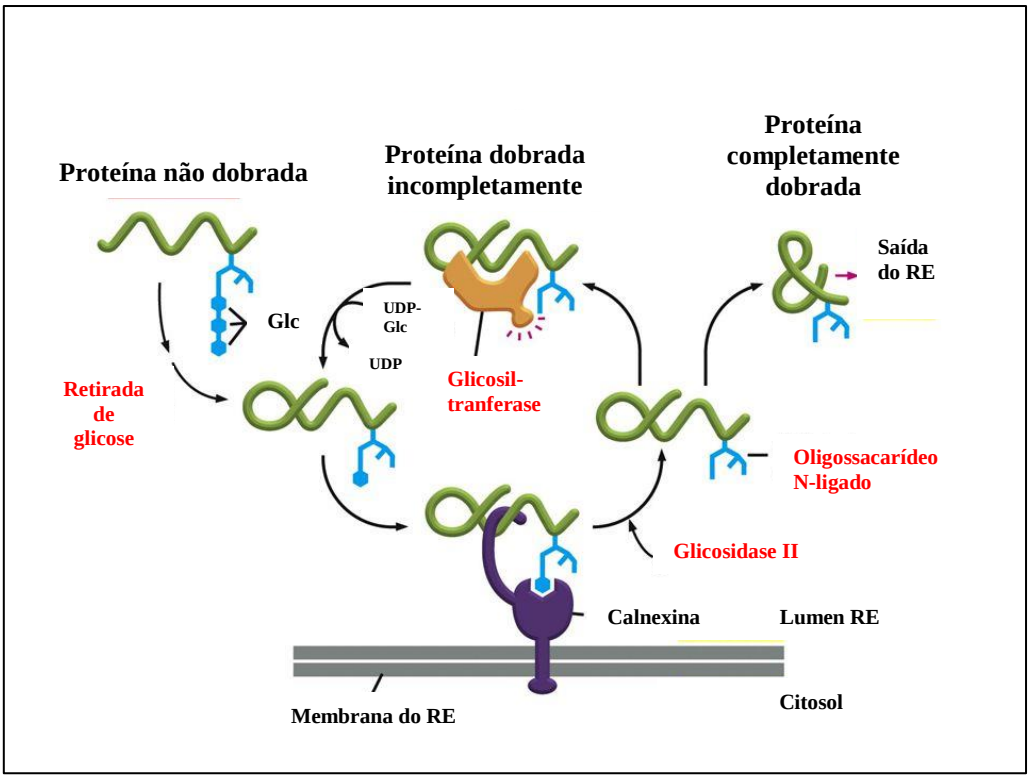

Figura 2. Papel de glicanos em glicoproteína no dobramento protéico mediado por chaperonas. Glc: glicose; UDP: uracil difosfo nucleotídeo; RE: retículo endoplasmático (Fonte: http://images.slideplayer.es/1/85401/slides/slide_24.jpg em 15/02/2015).

Primeiro as glicosidases I e II removem as duas primeiras glicoses do Glc3Man9GlcNAc2 N-ligado, formando assim o N-glicano monoglucosilado (PARODI, 2000; VOLKER *et al*., 2002). Depois de formado o GlcMan9GlcNAc2 é ligado à calnexina ou à calreticulina e à proteína em formação. Posteriormente há a remoção do resíduo de glicose mais interno pela glicosidase II. Depois o N-glicano é transitoriamente reglicosilado para evitar mais aparamento da glicoproteína que ainda não está dobrada de forma apropriada. Após nova clivagem pela glicosidase II o oligossacarídeo formado (Man9GlcNAc2) entra novamente no ciclo re-glicosilação/re-dobramento/aparamento até que a N-glicoproteína tenha atingido sua conformação nativa. Uma vez a proteína corretamente dobrada, as chaperonas (calnexina ou calreticulina) não se ligam mais e o Man9GlcNAc2 é processado por uma série de manosidases (BIEBERICH, 2014).

Após a atuação das manosidases é gerado o Man5GlcNAc2 que por sua vez recebe um resíduo de GlcNAc, catalisado pela UDP-GlcNAc transferase I, formando o oligossacarídeo GlcNAcMan5GlcNAc2. Este é então alongado pela adição de resíduos açúcar-derivados, tais como N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou ácido siálico (Neu5Ac), ou é submetido a remoção de dois resíduos de manose pela enzima Golgi manosidase II, gerando o GlcNAcMan3GlcNAc2 N-ligado, a estrutura núcleo dos glicanos (Figura 3), que representa o bloco de construção inicial para todas as N-glicoproteínas complexas (BIEBERICH, 2014).

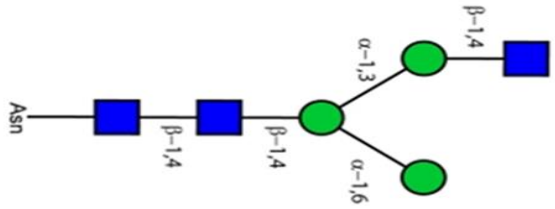

Figura 3. Estrutura núcleo do glicanos em glicoproteínas. (Fonte: SUITS *et al*., 2010 modificado).

Os oligossacarídeos complexos são glicosilados com resíduos tais como GalNAc, Neu5Ac e L-fucose (Fuc). Estes N-glicanos complexos surgem com uma grande variedade de estruturas altamente ramificadas que podem exceder a estrutura biantenária inicial do núcleo de glicanos (BIEBERICH, 2014).

Cada adição requer doadores ativados que são transferidos para o aparelho de Golgi por transportadores açúcar-nucleotídeos. A ordem é prescrita, mas não é molde-dirigida, o que gera uma diversidade de estruturas de N-glicanos, já que as células diversificam a expressão e organização deste conjunto de enzimas biosintéticas. Além disso, algumas das enzimas concorrem pela utilização do mesmo substrato. Dependendo da quantidade, afinidade e localização, glicosiltransferases podem impedir como também favorecer a síntese de glicanos selecionados quando as proteínas se movem através do aparelho de Golgi (FREEZE & AEBI, 2005).

2.2.2 **O-GLICOSILAÇÃO**

O outro tipo de glicosilação é a formada por O-glicanos. Esta se refere à adição de um resíduo de N-acetilgalactosamina (Gal-NAc) à hidroxila de resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) pela enzima UDP-N-Acetilgalactosamina transferase. Este resíduo é posteriormente seguido pela adição de outros carboidratos tais como galactose, N-acetilglicosamina, L-fucose ou ácido siálico (CYLWIK *et al*., 2013; GLAVEY *et al*., 2015). A frequência de O-glicosilação nas glicoproteínas é elevada, particularmente em mucinas secretadas ou ligadas à membrana, já que estas são ricas em Ser e Thr (REIS *et al*., 2010).

Este processo ocorre no lado cis do aparelho de Golgi após a N-glicosilação e dobramento das proteínas. Além de ser essencial na formação de mucinas ele também contribui para a produção de proteoglicanos através da adição de cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) à proteína do núcleo (CYLWIK *et al*., 2013). GAGs consistem de repetições de unidades de dissacarídeo compostas de uma hexosamina N-acetilada ou N-sulfatada e um ácido urônico ou uma galactose, e atuam na adesão celular via interações entre os conjuntos de carboidratos complexos na matriz extracelular (VARKI *et al*., 2009).

Assim como para os N-glicanos, a biossíntese dos O-glicanos pode ser dividida em três etapas: 1- biossíntese e ativação de monossacarídeos no citoplasma, 2- transporte de resíduos de açúcar-nucleotídeo para o RE ou Golgi e 3- ligação de resíduos de açúcar a uma proteína ou glicano por transferases específicas (CYLWIK *et al.*, 2013). Porém, diferentemente da N-glicosilação, a O-glicosilação não passa por processamento, consistindo apenas de montagem, a qual ocorre principalmente no aparelho de Golgi (SPIRO, 2002).

Após a adição da GalNAc O-ligada é formado o antígeno Tn que, posteriormente a adição de uma Gal, forma uma estrutura núcleo tipo 1, o antígeno T. Esses antígenos podem ou não ser sializados por sialiltransferases formando antígenos sialil-Tn (sTn), sialil-T (sT) e disialil-T (dsT) (Figura 4). Outra estrutura núcleo comum é a que contém uma ramificação de GlcNAc ligada ao núcleo tipo 1, denominada núcleo tipo 2. Tal estrutura é produzida em uma extensa quantidade de células epiteliais e hematopoiéticas. Antígenos de Lewis e de grupos sanguíneos baseados em glicanos são estruturas terminais comuns que se apresentam nos glicoconjugados, como nas mucinas (REIS *et al*., 2010).

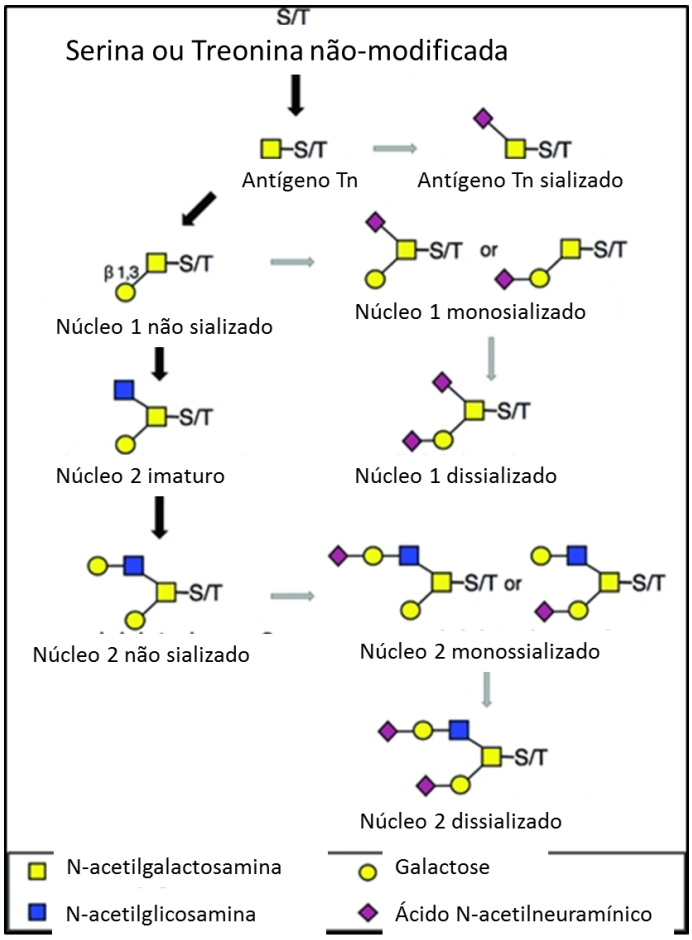

Figura 4. Carboidratos O-ligados comuns em mucinas. O núcleo 1 é formado por um antígeno Tn ligado a uma galactose. O núcleo 2 é formado por um núcleo 1 ligado a uma N-acetilglicosamina. A via comum dos tipos de núcleo são indicadas por setas pretas. (FONTE: STANSELL et al., 2011).

Em glicoproteínas, tanto N-glicanos como O-glicanos podem ser sintetizados, e ambos podem ser afetados durante a progressão do câncer. Modificações nos glicoconjugados são universalmente relacionados com o câncer e muitos dos biomarcadores utilizados, tanto para tecidos como para ensaios com soro, se baseiam nestas modificações do padrão de carboidratos (REIS et al., 2010).

2.3 **POLI-*N*-ACETIL LACTOSAMINAS**

Poli-*N*-acetil lactosaminas (PoliLacNAc) são cadeias de glicanos formadas por unidades repetidas de N-acetil lactosamina (LacNac) (Galβ1-4GlcNAcβ1-3)n as quais podem ser formadas tanto em glicolipídios como nos glicanos O- ou N-ligados a proteínas (Figura 5). Sua síntese é realizada de maneira coordenada pela ação alternada de uma β1,4-galactosiltransferase (β4GalT) e uma β1,3-N-Acetil-glucosaminiltransferase (β3GnT) (TOGAYACHI *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2008).

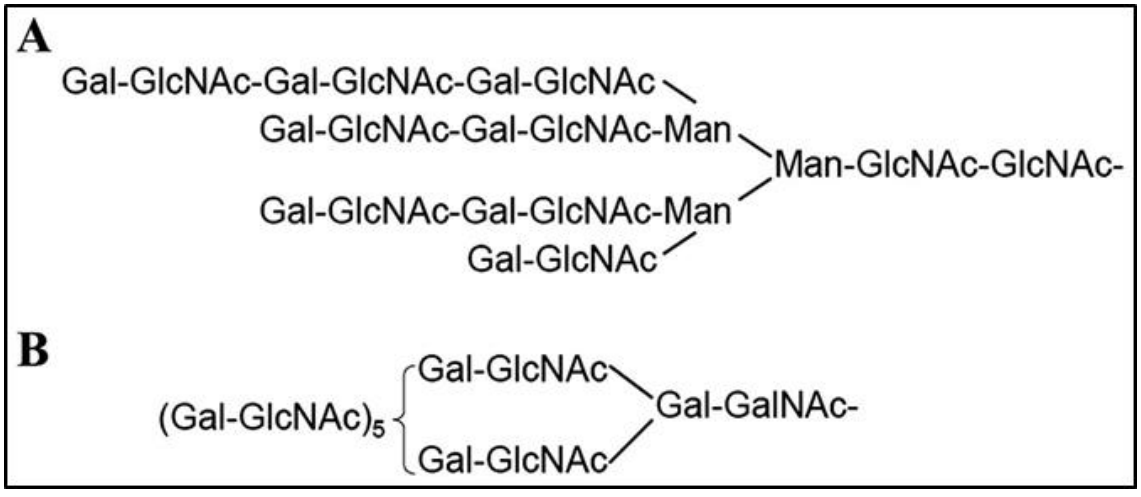

Figura 5: Estrutura típica de glicanos tipo polilactosamina em (a) N-glicanos e em (b) O-glicanos. Gal: galactose; GlcNAc: N-Acetil-glicosamina; Man: manose; GalNAc: N-Acetil-galactosamina. (Fonte: MITSUE et al., 2012)

Modificações por adição de carboidratos, tais como antígenos Lewis (Le) e sialil-Lewis^{x} (sLe^{x}), são encontradas nas PoliLacNAc. O sLe^{x} consiste da combinação de resíduos de sialil e fucosil com a PoliLacNAc (NeuAc-α2-3Galβ1-4[Fuc-α1-3] GlcNAc-R) (TOGAYACHI *et al*., 2007; KINOSHITA *et al*., 2014). A PoliLacNAc pode se configurar tanto como cadeia linear como ramificada. Exemplo das duas situações são, respectivamente, os antígenos dos grupos sanguíneos i e I (TOGAYACHI *et al*., 2007).

A PoliLacNAc é preferencialmente sintetizada nas ramificações β(1,6) de N-glicanos tetraantenários (GUO *et al*., 2008). Suas cadeias são frequentemente ramificadas no carbono 6 do resíduo de galactose. Uma vez ramificadas, essas cadeias se tornam volumosas e consequentemente passam a ser bons suportes para epítopos de carboidratos, reconhecidos por seus respectivos receptores. PoliLacNAc$_{s}$ ramificadas são amplamente expressas em células multipotentes de embriões, diminuindo durante a embriogênese, e transportam consigo antígenos relacionados ao oncodesenvolvimento (CHEN *et al.,* 2005). O comprimento da cadeia de PoliLacNAc tem influência em respostas do sistema imune. Tal estrutura possui a característica de inibir a citotoxicidade mediada por células NK pelos seus efeitos no processo de ligação à célula. Assim, células NK reconhecem células tumorais alvo que possuem antígenos sLe^{x} em N-glicanos com cadeias de polilactosaminas muito curtas (TOGAYACHI *et al*., 2007).

A PoliLacNAc é associada ao desenvolvimento e reconhecimento celular fisiológico e na carcinogênese, inclusive na determinação da capacidade metastática, em células e tecidos específicos (CLARK *et al*., 2014). Sua expressão em grande quantidade tem sido demonstrada em diversas linhagens de células tumorais como em linfoma histiocítico (células U937), câncer glandular renal (células ACHN), câncer

gástrico (células MKN45), câncer de pulmão (células A549) e leucemia aguda de células-T (células Jurkat) (MITSUE *et al*., 2012) e em tecidos humanos também demonstrando que a compreensão do papel dessa cadeia de glicanos no câncer é importante (CLARK *et al*., 2014).

2.4 **GLICOSILTRANSFERASES**

As glicosiltransferases (GTs) são enzimas ubíquas que atuam na formação de um complexo e diversificado conjunto de oligossacarídeos e glicoconjugados presentes na natureza. Essa complexidade e diversidade química como observado, por exemplo, nas diferentes posições de ligação e ramificação desses carboidratos, predispõe a necessidade de que essas enzimas sejam altamente específicas. Elas são responsáveis por catalisar a formação das ligações glicosídicas, mais precisamente adicionando monossacarídeos às cadeias de glicanos presentes em glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos, se contrapondo ao papel das glicosidases, as quais desempenham a remoção de monossacarídeos desses glicanos (GLOSTER, 2014).

A atuação intracelular das GTs ocorre fundamentalmente no RE, no aparelho de Golgi e no citosol. Sua ação é dependente de vários fatores, tais como a disponibilidade de precursores de monossacarídeos, os níveis de açúcares-nucleotídeos, substratos receptores, transportadores de açúcares-nucleotídeos, chaperonas e lectinas endógenas (GLAVEY *et al*., 2015; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015).

As GTs têm sido classificadas, quanto à homologia da sequência de aminoácidos, em 97 famílias, de acordo com o banco de dados Carbohydrate Active EnZyme (CAZy) (LOMBARD, 2014). Porém, essa similaridade quanto aos aminoácidos pode não ser um preditor confiável do mecanismo catalítico. Desta forma,

as GTs foram agrupadas em grupos baseados nesses mecanismos e na dobra estrutural dessas proteínas. Em relação ao primeiro critério, essas enzimas são classificadas como GTs de inversão ou de retenção da configuração anomérica. Já quanto ao segundo se classificam como GT-A, GT-B ou GT-C (figura 6) (MALIK & BLACK, 2012; GLOSTER, 2014).

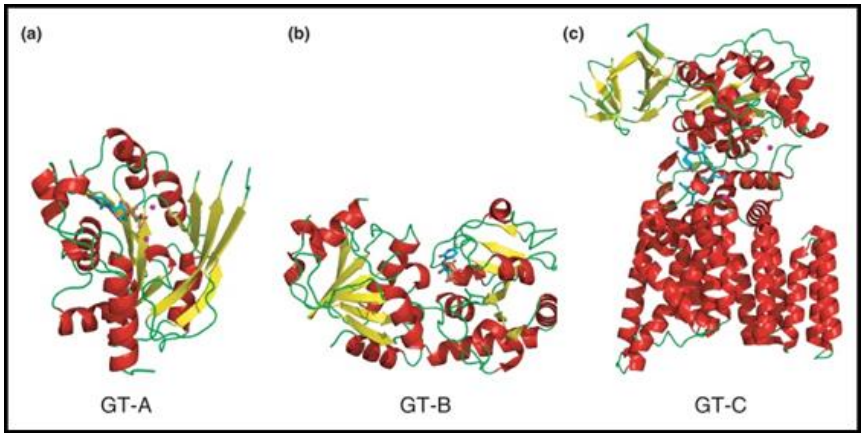

Figura 6: Representação das dobras estruturais de (a) GT-A, (b) GT-B e (c) GT-C. (Fonte: adaptado de Gloster, 2014)

Modificações específicas na maquinaria celular das GTs acabam por definir os perfis finais de glicosilação dos glicoconjugados (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2006). A atividade e expressão gênica dessas enzimas estão alteradas em diversas situações, tanto fisiológicas como patológicas, dentre as quais podemos citar o tráfego e sinalização celular, interações patógeno-hospedeiro, diferenciação, migração, invasão tumoral e metástase (TANIGUCHI & KIZUKA, 2015).

O fato de que os níveis de atividade de glicosiltransferases se apresentam alterados em células cancerosas leva a crer que as estruturas alvo podem ser selecionadas, considerando a especificidade destas enzimas quanto a sua atuação na montagem dos de carboidratos complexos, para revelar informações valiosas sobre as estruturas susceptíveis a serem expressas, permitindo, desta forma, a identificação e

seleção de melhores epítopos de carboidratos para a detecção imunohistoquímica (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2006).

Estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar as glicosiltransferases envolvidas nas vias de glicosilação do câncer. A maioria deles realiza a medição da expressão de RNA mensageiro de glicosiltransferases específicas, ou fazem uma análise transcriptômica total, enquanto outros avaliam diretamente a expressão da enzima. Um fato interessante destes estudos é o de que a correlação entre a expressão de glicanos específicos e sua regulação na via de síntese enzimática nem sempre é consistente (CHRISTIANSEN *et al.*, 2014).

2.4.1 MANOSIL (α-1,6-)-GLICOPROTEÍNA β-1,6-N-ACETIL GLUCOSAMINILTRANSFERASE (GnT- V)

Ramificações de N-glicanos são sintetizadas por diversas glicosiltransferases, tais como galactosiltransferases (GalTs), fucosiltransferases (Futs), sialiltransferases (STs) e N-acetilglicosaminiltransferases (GnTs). As GnTs, classificadas como de I a VI, atuam em uma estrutura núcleo comum de Manα1-6(Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-Asn (TANIGUCHI & KOREKANE, 2011). Essas GnTs são dependentes da disponibilidade de um substrato doador comum, o UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), formado comumente na via da hexosamina a partir de frutose-6-fosfato, glutamina, acetil-CoA e UTP (LAU et al., 2007).

Também chamada de N-acetilglicosaminiltransferase V, a GnT-V, purificada inicialmente de tecido renal de rato e de uma linhagem de células de câncer de pulmão humano (SHOREIBAH et al., 1993; GU et al., 1993) é caracterizada como uma proteína (glicosiltransferase) de membrana tipo II (MACNAUGHTAN et al., 2007), de 73kD

(GU et al., 1993), codificada pelo gene Mgat5. Ela catalisa a formação de ramificações β1,6-GlcNAc que ocorrem nos N-glicanos tanto tri- como tetraantenários (MIYOSHI et al., 2012), sendo então considerada a enzima limitante da velocidade de síntese de PoliLacNac (KINOSHITA et al., 2014).

Essa enzima tem sido diretamente relacionada ao câncer, tanto no crescimento como na metástase, em diversos tipos de tumores (LAU & DENNIS, 2008; TANIGUCHI & KIZUKA, 2015). Dentre estes podemos citar o câncer de mama, cólon, endométrio, hepatocelular, e tumores mucinosos do ovário (GRANOVSKY et al., 2000; MURATA et al., 2000;. YAMAMOTO et al., 2007; MEHTA et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2009).

Receptores quinases que promovem o crescimento têm maior quantidade de locais de adição de N-glicanos em potencial do que os receptores do mesmo tipo que atuam na parada do crescimento e início da diferenciação. Desta maneira, glicoproteínas com várias moléculas de N-glicanos exibem uma maior e mais rápida ligação da galectina e um aumento gradual de sua expressão na superfície celular, em resposta ao aumento da concentração de UDP-GlcNAc. Isto sugere que as ramificações dos N-glicanos podem agir como sensores metabólicos para o balanço dos sinais de iniciação, continuidade ou interrupção do crescimento celular (ZHAO *et al*., 2008).

Acredita-se que três vias distintas estão envolvidas na promoção da metástase pela GnT-V. Uma delas envolve uma regulação positiva do receptor do fator de crescimento epidermal (R-EGF), que através da formação de uma rede entre polilactosamina e seu ligante (galectina-3) teria sua endocitose inibida (Figura 7). Em outra via, a adição de ramificações β1,6GlcNAc causaria uma inibição na degradação do R-EGF pela ação de protease. A terceira via envolve a inibição da função do

complexo E-caderina/β-catenina, o que traz como consequência a liberação de células cancerosas de seu tecido original (MIYOSHI *et al*., 2012).

Diferentemente da GnT-V, a N-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) catalisa a formação de uma estrutura conhecida como "bissetriz" GlcNAc e tem sua atuação ligada a supressão da metástase a partir da indução da estabilização da E-caderina na membrana celular. Desta forma a GnT-III mostra um efeito biológico e funcional antagônico ao mostrado pela GnT-V, já que esta promove a desestabilização da E-caderina e a invasão tumoral (PINHO et al., 2013).

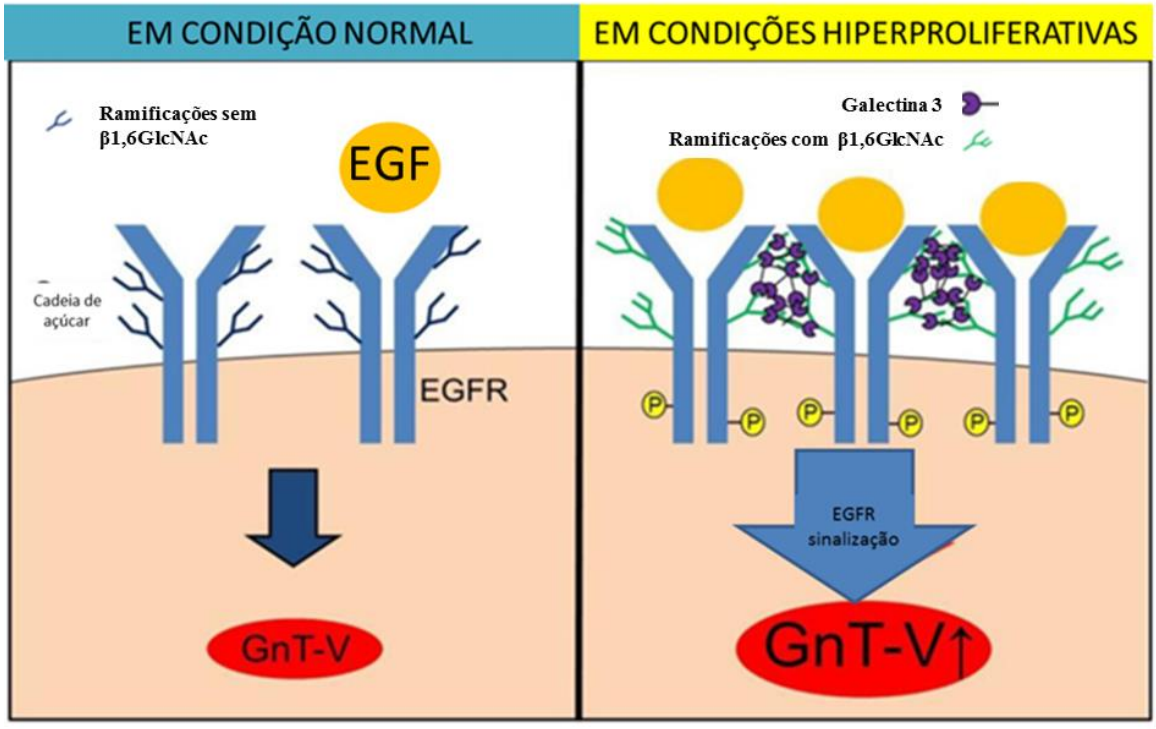

Figura 7. Cooperação entre GnT-V e EGF na proliferação celular através do aumento de suas expressões e função. (Fonte: MIYOSHI *et al*., 2012 modificado).

Foi visto também que a GnT-V é uma proteína bifuncional que atua não só como uma glicosiltransferase, mas também como fator indutor de angiogênese tumoral. Ela contém um domínio de ligação de heparina que é bastante semelhante ao encontrado em outros fatores angionênicos. Além disso, verificou-se que a GnT-V poderia ser clivada por proteinases, incluindo γ-secretase, e posteriormente liberada em uma forma solúvel

que também funcionaria como um fator de indução da angiogênese. Deleções no gene da GnT-V, impondo falta da atividade catalítica, mantiveram a atividade angiogênica. Esses dados sugerem que a atividade desta enzima como indutora de angiogênese não está envolvida com seu domínio catalítico (TANIGUCHI & KOREKANE, 2011; SAITO *et al*.. 2002).

2.5 **CÂNCER**

Neoplasia significa, literalmente, o processo de um novo crescimento e esse crescimento é chamado de neoplasma (KUMAR *et al.*, 2005). O termo câncer é usado genericamente para nomear um conjunto de mais de 200 tipos diferentes de doenças que possuem como característica comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo (INCA, 2014). Apesar de a origem deste termo ser relativamente incerta, ele provavelmente deriva da palavra em latim para caranguejo, ‘‘cancer’’ (KUMAR *et al.*, 2005). Quando as neoplasias ocorrem em órgãos sólidos denominamos de tumor. Este termo foi originalmente aplicado ao edema causado por uma inflamação, mas já há muito tempo o emprego não-neoplásico de tumor saiu de uso (KUMAR *et al.*, 2005).

A origem do câncer é multifatorial. A atuação desses fatores pode ser conjunta ou sequencial na iniciação e promoção do câncer (carcinogênese). O desenvolvimento da maior parte dos cânceres se dá através de múltiplas etapas que ocorrem em um longo período (anos). Desta maneira, a prevenção de certos tipos de cânceres pode ocorrer pela eliminação de exposição aos fatores determinantes. Caso a condição de descoberta de um câncer seja anterior ao momento em que as células se tornem malignas, ou ainda

numa fase inicial da doença, a possibilidade de tratamento e evolução para uma cura se apresenta como condição mais favorável (INCA, 2014).

As neoplasias podem ser divididas em benignas ou malignas. Quando benignas, apresentam crescimento expansivo, obtendo normalmente formas macroscópicas esféricas, ovais ou similares. Seu lento desenvolvimento possibilita tanto a formação de uma estrutura capilar ao redor do tumor, que se encarrega da nutrição do mesmo, como a apresentação de um padrão morfológico do tipo nodular, normalmente delimitado por uma cápsula fibrosa, resultante da proliferação do tecido conjuntivo adjacente (HANAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Esse tipo de neoplasia geralmente é inofensivo, exceto quando a expansão dessas massas localizadas causa uma pressão em um tecido ou órgão vital, ou ainda, quando esses tumores liberam altos níveis de hormônios que geram desequilíbrios fisiológicos no organismo (WEINBERG, 2008).

Quando malignas, as neoplasias apresentam um rápido crescimento e não formam cápsula fibrosa e, a depender do tipo, formam uma estrutura capilar, contudo podem apresentar regiões de necrose. O crescimento dessas neoplasias possibilitam seu padrão invasivo e o comportamento metastático, característica marcante que permite que células tumorais permeiem vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, ampliando assim sua disseminação (HANAHAN & WEINBERG, 2000; HANAHAN & WEINBERG, 2011). Essa disseminação e colonização de órgãos distantes representa a principal causa da morte dos pacientes com câncer (FERNANDEZ *et al*., 2009).

O processo da carcinogênese é explicado, com maior aceitação, pelo modelo da iniciação/promoção. Nele, a primeira etapa (iniciação) ocorre quando uma única célula de característica aparentemente normal sofre o efeito de agentes cancerígenos ou carcinógenos que promovem alterações genotípicas específicas. A segunda etapa

(promoção) é caracterizada pela proliferação descontrolada, irreversível e autônoma da célula alterada que conduz a formação de um agrupamento de células-filhas, as quais terão as mesmas características fenotípicas da célula-mãe. Neste agrupamento podem surgir fenótipos com potencial de invasão tecidual e metástase, definindo agora a terceira etapa (progressão) (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

O câncer pode surgir como consequência da mutação espontânea ou de mutação induzida pelo ambiente, com ou sem uma interação entre o ambiente e predisposição genética (KNUDSON, 2002). Essas mutações podem ser do tipo ganho-de-função nos oncogenes ou do tipo perda-de-função nos genes supressores de tumor (ORTEGA *et al*., 2009). Na sua progressão para a malignidade, as células adquirem seis características principais: potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, evasão de apoptose, auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais anti-crescimento e invasão de tecidos acompanhada de metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Os cariótipos de células tumorais raramente são normais, e a maioria apresenta anormalidades múltiplas tanto na estrutura como no número. Estudos de translocações tumor-específicas em leucemias e linfomas foram a primeira evidência para este conceito, revelando a importância de oncogenes e a regulação da expressão gênica no câncer (KNUDSON, 2002). A heterogeneidade genética e epigenética são elementos chave na progressão do câncer e na resistência à drogas (HENG *et al.*, 2009).

Em 2012, aproximadamente 14 milhões de novos casos (excluindo-se o câncer de pele não-melanoma) e 8 milhões de mortes relacionadas a este diagnóstico mantiveram o câncer como a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, afetando populações em todos os países e regiões do globo. Devido ao crescimento e envelhecimento da população e da diminuição dos índices tanto de mortalidade infantil como de mortes por doenças infecciosas a previsão para o ano de 2030 é de 21,4

milhões de casos novos com uma mortalidade de 13,2 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2014). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014/2015 apontam para a ocorrência de 395 mil casos novos (sem considerar os de pele tipo não-melanoma) (INCA, 2014).

Observando esses dados epidemiológicos vemos a importância de se diagnosticar o câncer nas suas fases iniciais, pois quando um tumor é clinicamente detectável ele já completou uma porção importante de seu ciclo de vida, o que pode ser um grande impedimento no tratamento. Portanto enfatiza-se a necessidade da investigação de novos marcadores para diagnóstico, visando a detecção precoce, e terapias médicas singulares que usem novas fontes não-tradicionais de tratamento (DASARI et al., 2015 DE MEJIA *et al.*, 2003).

2.5.1 **CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

Entre as mulheres, o câncer do colo do útero ocupa atualmente, no mundo, a quarta posição dentre os tipos de cânceres mais incidentes no gênero, sendo responsável por 7,9% da incidência total de neoplasias, ficando atrás dos cânceres de mama (25,2%), colorretal (9,2%) e pulmão (8,7%). No conjunto dos países em desenvolvimento esse tipo de tumor ocupa a segunda posição, mantendo a sua frente apenas o câncer de mama. Nesse mesmo grupo de países, ocorreram 87% dos 265 mil óbitos causados pelo câncer do colo uterino em 2012 (WHO, 2014). De forma geral, a incidência desse câncer começa a partir dos 30 anos, elevando substancialmente seu risco até um pico na faixa etária de 50 a 60 anos (INCA, 2014).

Para o Brasil, foram estimados 15.590 casos novos do câncer do colo uterino para o ano de 2014, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres.

Desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma, este câncer é o de maior incidência na região Norte (23,57/100 mil), o segundo nas regiões Centro-Oeste (22,19/100 mil) e Nordeste (18,79/100 mil), quarto na região Sudeste (10,15/100 mil), e quinto na região Sul (15,87 /100 mil) (INCA, 2014).

O câncer do colo uterino pode ser classificado, microscopicamente, em duas formas principais: carcinoma de células escamosas (CCE), originado no epitélio escamoso e responsável por 80 a 90% dos diagnósticos; e adenocarcinoma, originado no epitélio colunar, com incidência entre 2 e 8% (BASTOS, 2006). Porém existem outras formas menos comuns como os carcinomas adenoescamosos e os tumores neuro-endócrinos (SELLORS & SANKARANARAYANAN, 2003; TILTMAN, 2005).

Geralmente, o carcinoma da cérvice uterina é precedido por uma longa fase de doença pré-invasiva, caracterizada de maneira microscópica, como um espectro de eventos, progredindo de atipia celular para vários graus de displasia, conhecida como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (SELLORS & SANKARANARAYANAN, 2003). Usando essa nomenclatura, a fase pré-invasiva do CCE foi graduada em três grupos denominados NIC I, II e III, estes se diferenciam de acordo com a intensidade das alterações celulares e com a extensão da espessura do epitélio acometida por elas (Figura 8) (INCA, 2002).

De acordo com o sistema de Bethesda, a NIC I deve ser denominada como lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL). Já as NICs II e III são denominadas lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) (SIMÕES, 2004; SUWANNARURK *et al.*, 2009). Após essas etapas a progressão ao câncer invasor está presente em cerca de 1% dos casos de NIC I (INCA, 2014). Em média, 5 anos é o tempo teórico de evolução de NIC I para NIC III. A regressão espontânea nos casos de NIC II e III é bastante improvável, e caso não seja tratada, a possibilidade de progressão

para o câncer invasivo aumenta substancialmente, tornando justificada a necessidade do diagnóstico precoce aliado ao tratamento imediato (SIMÕES, 2004; KIETPEERAKOOL & SRISOMBOON, 2009).

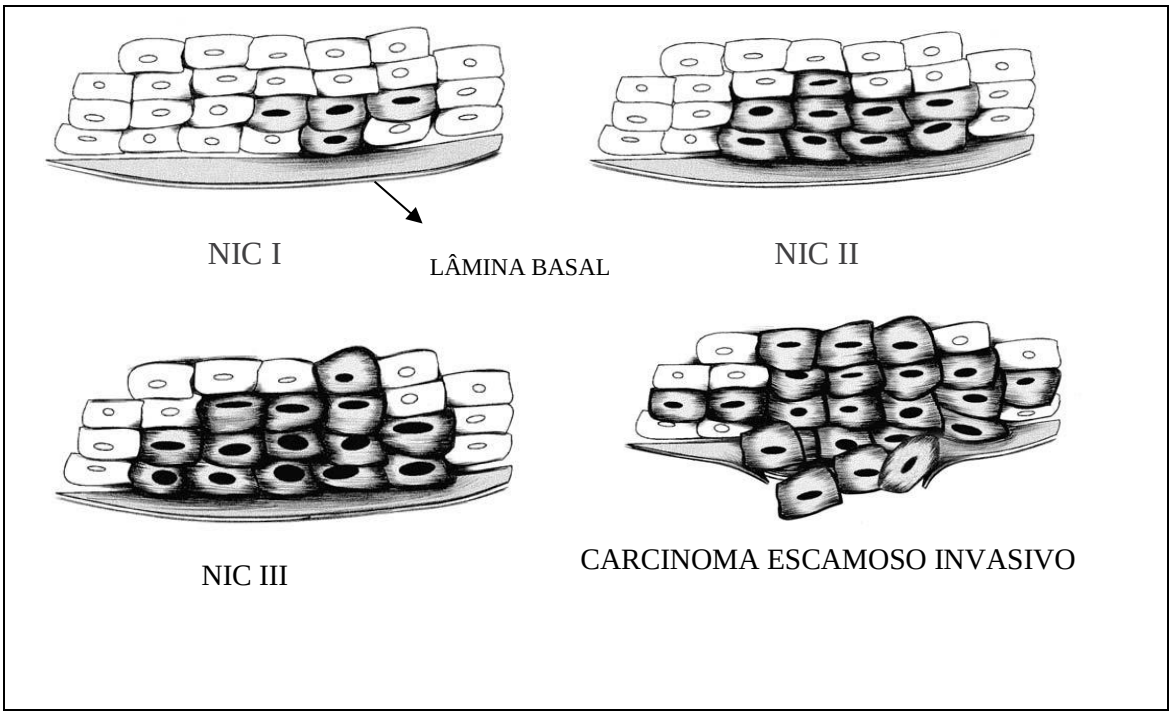

Figura 8: Progressão morfológica de NIC para Carcinoma Escamoso Invasivo. (Fonte: INCA 2002, modificado).

O vírus do papiloma humano (HPV) é conhecido como o mais importante agente etiológico na patogênese do carcinoma do colo do útero (FENG et al., 2007). Atualmente 13 tipos de HPV são reconhecidos como oncogênicos. Dois deles, o HPV 16 e o 18, são responsáveis por cerca de 70% dos casos desse câncer (INCA, 2014). Porém, nem todas as mulheres infectadas por um HPV de alto risco desenvolvem o carcinoma cervical, sugerindo que outros co-fatores devem estar presentes na via de patogenicidade entre displasia cervical e carcinoma (FENG *et al*., 2007; Berlin Grace, 2009; INCA, 2014).

Acredita-se que entre os co-fatores ligados ao câncer do colo uterino estejam o tabagismo, a carência alimentar e o início precoce da vida sexual (SILVA et al, 2009).

A idade também reflete um papel importante nesse processo, já que mulheres com menos de 30 anos apresentam uma regressão espontânea na maioria das infecções por HPV, diferente das que estão acima desta idade, nas quais a persistência da infecção é mais frequente (INCA, 2014).

A vacina contra o HPV se apresenta como ferramenta promissora no combate ao câncer da cérvice uterina, porém, não descarta as ações preventivas e de detecção precoce, pelo fato de que esse tipo de câncer, com exceção do câncer de pele, apresenta o maior potencial de prevenção, diagnóstico precoce e cura. Dentre as ações preventivas, o teste citopatológico convencional (Papanicolaou), ainda é a principal estratégia de rastreamento desse tipo de câncer no mundo, inclusive no Brasil, onde é recomendado pelo Ministério da Saúde, á mulheres de 25 a 64 anos (INCA, 2014).

2.6 **CARBOIDRATOS COMO BIOMARCADORES NO CÂNCER**

Biomarcador é definido como uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos que sejam um sinal de um processo normal ou alterado, ou ainda de uma condição ou doença (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Sua busca no câncer visa à detecção precoce da doença com o intuito fundamental de evitar a progressão para o estado de invasão e metástase (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2006). Várias glicoproteínas são utilizadas clinicamente como biomarcadores do câncer. Dentre elas podemos citar o antígeno carcinoembrionário (CEA), utilizado como marcador de tumores do cólon e reto, o antígeno 125 do câncer (CA-125), marcador de câncer dos ovários, e o antígeno prostático-específico (PSA) (MITSUE *et al.*, 2012).

As alterações nos padrões de glicosilação são frequentemente um resultado de atividades alteradas de glicosiltransferases e glicosidases (BLOMME *et al*., 2009). Essas alterações estão associadas com várias doenças humanas (KINOSHITA *et al*., 2014), dentre elas o desenvolvimento neoplásico, que provoca glicosilações aberrantes, levando na maioria das vezes, a um encurtamento das cadeias de glicanos ou a uma super-expressão das mesmas na superfície de células, nas quais, normalmente, são ausentes ou discretas (GUILLOT *et al.*, 2004). Esses carboidratos têm sido identificados tanto qualitativa como quantitativamente através da histoquímica com lectinas (GHAZARIAN *et al.*, 2010).

O fenótipo maligno das células do câncer tem como parte de sua modulação a alteração da glicosilação. Neste fenótipo, a interação entre as células e o microambiente tumoral é modificada com o intuito de facilitar processos como a metástase e a resistência a drogas. Mudanças na glicosilação de ligantes de selectinas, integrinas e mucinas relacionam essas moléculas de adesão à patogênese de malignidades hematológicas e tumores sólidos com frequente implicação no prognóstico dessas neoplasias (GLAVEY *et al.*, 2015)

A glicosilação alterada pode ocorrer por várias formas nas células malignas, incluindo modificações na quantidade, ligação e acetilação do ácido siálico, mudanças nas ramificações dos N-glicanos, na expressão de glicosaminoglicanos e na glicosilação de mucinas (VARKI *et al.*, 2009; GLAVEY *et al.*, 2015). As mucinas possuem grande quantidade de resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), possibilitando então, alta taxa de O-glicosilação, e são altamente expressas em carcinomas contribuindo para uma parte substancial dos biomarcadores de câncer (REIS *et al.*, 2010).

Os glicanos se mostram extensivamente alterados no câncer, todavia, os mecanismos que regulam os genes implicados nessas alterações ainda não são bem

compreendidos. Provavelmente essa modulação genética não seja regulada por um processo qualquer, mas sim por uma interação de vários fatores que ocorrem de forma mais complexa no estado maligno. Avanços em estudos nesse sentido vêm evidenciando que estes genes podem ser alterados por condições de hipóxia no microambiente local ou ainda regulados por metilação (GLAVEY *et al.*, 2015).

2.7 **LECTINAS**

Sharon e Lis (2004) definem lectinas como um grupo de proteínas ou glicoproteínas naturais e ubíquas, sem atividade catalítica, capazes de se ligar, a partir de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, a carboidratos livres ou conjugados.

O primeiro relato sobre lectina se deu por Stilmark, em 1888, que através de estudos sobre a toxicidade do extrato de *Ricinus communis* (mamona), observou a presença de uma proteína (ricina) que possuía a capacidade de aglutinar eritrócitos (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004; SHARON & LIS, 2004). Subsequentemente, Hellin, através do extrato de *Abrus precatorius*, demonstrou a presença de outra proteína (a abrina) com a mesma capacidade de hemaglutinação. Com essas lectinas Paul Ehrlich estabeleceu vários princípios da imunologia (SHARON & LIS, 2003, 2004).

As lectinas podem ser classificadas em um número pequeno de grupos de acordo com seus carboidratos específicos (SADIK & YAN, 2007). A ligação das lectinas a esses carboidratos ocorre em sítios específicos dessas proteínas. Em 1988, Kurt Drickamer denominou esses sítios de “domínio de reconhecimento de carboidrato” (CRD – do inglês *carbohydrate-recognition domain*), os quais eram formados por uma

limitada sequencia de aminoácidos em um peptídeo ou polipeptídeos (SHARON & LIS, 2004).

No final dos anos 90, evidenciou-se que o padrão de glicosilação de proteínas é influenciado por várias mudanças fisiológicas, incluindo a ocorrência de doenças e que a população de carboidratos de glicoproteínas alteradas podem ser utilizadas para diagnóstico de doenças (GABIUS et al., 2004; KELLY et al.; 2007). Alguns estudos com lectinas mostraram aglutinação de células malignamente transformadas, mas essa mesma aglutinação não se fazia presente nas células normais correspondentes. Estes relatos forneceram evidências da associação do câncer com mudanças na expressão de carboidratos da superfície celular (SHARON, 2008).

Alterações ocorridas na extremidade das cadeias de carboidratos, presentes em antígenos ligados ao câncer, levou ao uso de lectinas na detecção da mudança do perfil de glicosilação ocorrida nos glicoconjugados associados a tumores. De forma que a compreensão do papel exercido pelos carboidratos no que se refere aos glicoconjugados de superfície de células normais e transformadas impulsionou a glicobiologia destacando significativamente sua importância (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2006; WANG & HUANG, 2009).

Devido às interações lectina-carboidratos serem reversíveis e altamente específicas, elas têm sido amplamente empregadas em diferentes áreas científicas como ferramentas para análise do perfil glicídico de glicoconjugados, glicoproteínas na sua maioria (CLARK *et al.*, 2014). Destaca-se então que, enquanto os açúcares são capazes de carrear uma informação biológica, lectinas são capazes de decifrar esse glicocódigo (BELTRÃO *et al.*, 2003). Assim, lectinas são sondas que identificam modificações nos padrões de expressão de carboidratos de glicoproteínas e contribuem no diagnóstico e prognóstico de processos neoplásicos (SHARON & LIS, 2004). Um grande número de

lectinas tem sido empregado como sonda histoquímica no diagnóstico histopatológico em tecidos da cavidade oral (REGO *et al.*, 2005); cérebro humano (BELTRÃO *et al.*, 2003); mama (BELTRÃO *et al.,* 1998, 2001; CAMPOS *et al*., 2006, SANTOS *et al.*, 2006a,b) entre outros.

Os estudos a cerca dos mecanismos pelos quais os glicanos alterados provocam modificações na biologia celular do câncer têm um maior grau de dificuldade devido à complexidade e heterogeneidade dos glicanos, todavia avanços recentes em glicômica, incluindo a análise glicogenômica, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a espectrometria de massa e o perfil de ligação à lectina, têm diminuído esta dificuldade e disponibilizado uma caracterização abrangente do glicoma de diversos tecidos (GLAVEY *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 **GERAL**

Avaliar o comportamento da expressão da GnT-V durante a progressão das lesões do colo uterino, desde tecidos normais, passando pelas neoplasias intraepiteliais cervicais até lesões malignas invasivas.

3.2 **ESPECÍFICOS**

- Avaliar a expressão da GnT-V em tecidos de colo uterino humano normais e transformados;
- Avaliar a formação da ramificação β(1,6) GlcNAc e de estruturas tetraantenárias nos tecidos em estudo utilizando a lectina L-PHA (*Phaseolus vulgaris*);
- Avaliar a presença de estruturas de polilactosaminas com as lectinas DSA (*Datura stramonium*) e PWM (*Phytolacca americana*).

4. REFERÊNCIAS

Alonzi, D. S., Kukushkin, N. V., Allman, S. A., Hakki, Z., Williams, S. J., Pierce, L., . . . Butters, T. D. (2013). Glycoprotein misfolding in the endoplasmic reticulum: identification of released oligosaccharides reveals a second ER-associated degradation pathway for Golgi-retrieved proteins. *Cell Mol Life Sci, 70*(15), 2799-2814.

Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. Organic & biomolecular chemistry. 2005 May 7;3(9):1593-608.

Arnold, J. N., Saldova, R., Hamid, U. M., & Rudd, P. M. (2008). Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics, 8*(16), 3284-3293.

Bastos AC. Ginecologia. ed, editor: Ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

Beltrão, E. I. C. ; Cabral, T. ; Silva, J. F. ; Coelho, L. C. B. B. ; Carvalho Jr, L. B. . Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. Anais da Faculdade Medicina Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, v. 46, n.1, p. 32-35, 2001.

Beltrão, E. I. C. ; Correia, M. T. S. ; Silva, J. F. ; Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso. Binding evaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 74, p. 125-134, 1998.

Beltrão, E. I. C. ; Medeiros, P L ; Rodrigues, O G ; Silva, J. Figueredo ; Valença, M. M. ; Coelho, L. C. B. B. ; Carvalho Jr, L. B. . Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. European Journal of Histochemistry, v. 47, n.2, p. 139-142, 2003.

Berlin Grace, V. M. (2009). HPV type 18 is more oncopotent than HPV16 in uterine cervical carcinogenesis although HPV16 is the prevalent type in Chennai, India. *Indian J Cancer, 46*(3), 203-207.

Bieberich, E. (2014). Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. *Adv Neurobiol, 9*, 47-70.

Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. Journal of hepatology. 2009 Mar;50(3):592-603.

Campos, L. M. ; Cavalcanti, C. L. B. ; Lima-Filho, J. L. ; Carvalho, L. B. ; Beltrão, E. I. C. . Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. Biomarkers (London. Print), v. 11, p. 480-484, 2006.

Chandrasekaran, E. V., Xue, J., Neelamegham, S., & Matta, K. L. (2006). The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr Res, 341*(8), 983-994.

Chen GY, Kurosawa N, Muramatsu T. Functional analysis of promoter activity of murine beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Gene. 2001 Sep 19;275(2):253-9.

Chen S, Zheng T, Shortreed MR, Alexander C, Smith LM. Analysis of cell surface carbohydrate expression patterns in normal and tumorigenic human breast cell lines using lectin arrays. Analytical chemistry. 2007 Aug 1;79(15):5698-702.

Christiansen, M. N., Chik, J., Lee, L., Anugraham, M., Abrahams, J. L., & Packer, N. H. (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics, 14*(4-5), 525-546.

Clark, A. T., Guimaraes da Costa, V. M., Bandeira Costa, L., Bezerra Cavalcanti, C. L., De Melo Rego, M. J., & Beltrao, E. I. (2014). Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polylactosamines in uterine lesions. *Eur J Histochem, 58*(2), 2334.

Cylwik, B., Lipartowska, K., Chrostek, L., & Gruszewska, E. (2013). Congenital disorders of glycosylation. Part II. Defects of protein O-glycosylation. *Acta Biochim Pol, 60*(3), 361-368.

Dasari, S., Wudayagiri, R, Valluru, L (2015). Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clinica Chimica Acta, 445,*7-11.

de Mejia EG, Bradford T, Hasler C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. Nutrition reviews. 2003 Jul;61(7):239-46.

Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., & Dennis, J. W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature, 409*(6821), 733-739.

Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE, Liu J, et al. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2007 Sep;20(9):961-6.

Fernadez SMJ, Alvarez Merino JC, Martinez Zubiaurre I, Fernandez Garcia A, Sanchez Rovira P, Lorente Acosta JA. Clinical relevance associated to the analysis of circulating tumour cells in patients with solid tumours. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico. 2009 Oct;11(10):659-68.

Freeze, H. H., & Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol, 15*(5), 490-498.

Gabius HJ, Andre S, Jimenez-Barbero J, Romero A, Solis D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. Trends in biochemical sciences. 2011 Jun;36(6):298-313.

Gabius HJ, Kayser K. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. Diagnostic pathology. 2014;9:4.

Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H. Chemical biology of the sugar code. Chembiochem : a European journal of chemical biology. 2004 Jun 7;5(6):740-64.

Gemeiner P, Mislovicova D, Tkac J, Svitel J, Patoprsty V, Hrabarova E, et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. Biotechnology advances. 2009 Jan-Feb;27(1):1-15.

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Acta histochemica. 2011 May;113(3):236-47.

Glavey, S. V., Huynh, D., Reagan, M. R., Manier, S., Moschetta, M., Kawano, Y., . . . O'Dwyer, M. E. (2015). The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev*.

Gloster, T. M. (2014). Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Curr Opin Struct Biol, 28*, 131-141.

Granovsky, M., Fata, J., Pawling, J., Muller, W. J., Khokha, R., & Dennis, J. W. (2000). Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med, 6*(3), 306-312.

Gu, J., Nishikawa, A., Tsuruoka, N., Ohno, M., Yamaguchi, N., Kangawa, K., & Taniguchi, N. (1993). Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine: alpha-6-D-mannoside beta 1-6N-acetylglucosaminyltransferase (N-acetylglucosaminyltransferase V) from a human lung cancer cell line. *J Biochem, 113*(5), 614-619.

Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. Bulletin du cancer. 2004 Feb;91(2):141-58.

Guo, H. B., Nairn, A., Harris, K., Randolph, M., Alvarez-Manilla, G., Moremen, K., & Pierce, M. (2008). Loss of expression of N-acetylglucosaminyltransferase Va results in altered gene expression of glycosyltransferases and galectins. *FEBS Lett, 582*(4), 527-535.

Hamilton, S. R., Li, H., Wischnewski, H., Prasad, A., Kerley-Hamilton, J. S., Mitchell, T., . . . Gerngross, T. U. (2005). Intact {alpha}-1,2-endomannosidase is a typical type II membrane protein. *Glycobiology, 15*(6), 615-624.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell, 100*(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674.

Helenius, A., & Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem, 73*, 1019-1049.

Heng HH, Bremer SW, Stevens JB, Ye KJ, Liu G, Ye CJ. Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective. Journal of cellular physiology. 2009 Sep;220(3):538-47.

Hosie, M., Terry, V., Shaw, T., Dwarte, D., & Murphy, C. R. (2000). Expression of glucosamine trisaccharides on the rat uterine surface is altered by clomiphene citrate. II. Combination with ovarian hormones. *Acta Histochem, 102*(3), 309-321.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva CdPeV. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional do Câncer José Alenvar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA2014.

Kietpeerakool C, Srisomboon J. Medical treatment of cervical intraepithelial neoplasia II, III: an update review. International journal of clinical oncology. 2009 Feb;14(1):37-42.

Kinoshita, M., Mitsui, Y., Kakoi, N., Yamada, K., Hayakawa, T., & Kakehi, K. (2014). Common glycoproteins expressing polylactosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles. *J Proteome Res, 13*(2), 1021-1033.

Knudson AG. Cancer genetics. American journal of medical genetics. 2002 Jul 22;111(1):96-102.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. (2005). *Robbins e Cotran Patologia: Bases patológicas das doenças* (R. d. J. Elsevier Ed.).

Kuzmanov, U., Kosanam, H., & Diamandis, E. P. (2013). The sweet and sour of serological glycoprotein tumor biomarker quantification. *BMC Med, 11*, 31.

Lau, K. S., & Dennis, J. W. (2008). N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology, 18*(10), 750-760.

Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Silvescu, C. I., Reinhold, V. N., Demetriou, M., & Dennis, J. W. (2007). Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell, 129*(1), 123-134.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res, 42*(Database issue), D490-495.

Macnaughtan, M. A., Kamar, M., Alvarez-Manilla, G., Venot, A., Glushka, J., Pierce, J. M., & Prestegard, J. H. (2007). NMR structural characterization of substrates bound to N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Mol Biol, 366*(4), 1266-1281.

Malik, V., & Black, G. W. (2012). Structural, functional, and mutagenesis studies of UDP-glycosyltransferases. *Adv Protein Chem Struct Biol, 87*, 87-115.

Manoharan S, Padmanabhan M, Kolanjiappan K, Ramachandran CR, Suresh K. Analysis of glycoconjugates in patients with oral squamous cell carcinoma. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2004 Jan;339(1-2):91-6.

Mechref, Y., Hu, Y., Garcia, A., & Hussein, A. (2012). Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomics. *Electrophoresis, 33*(12), 1755-1767.

Mehta A, Norton P, Liang H, Comunale MA, Wang M, Rodemich-Betesh L, et al. Increased levels of tetra-antennary N-linked glycan but not core fucosylation are associated with hepatocellular carcinoma tissue. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2012 Jun;21(6):925-33.

Mills, P., Mills, K., Clayton, P., Johnson, A., Whitehouse, D., & Winchester, B. (2001). Congenital disorders of glycosylation type I leads to altered processing of N-linked glycans, as well as underglycosylation. *Biochem J, 359*(Pt 2), 249-254.

Ministério da Saúde SNdAàS, Instituto Nacional de Câncer CdPeVC. Falando sobre o câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: MS/INCA2002.

Mitsui, Y., Yamada, K., Hara, S., Kinoshita, M., Hayakawa, T., & Kakehi, K. (2012). Comparative studies on glycoproteins expressing polylactosamine-type N-glycans in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal, 70*, 718-726.

Miyoshi, E., Terao, M., & Kamada, Y. (2012). Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice. *BMB Rep, 45*(10), 554-559.

Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000 May;6(5):1772-7.

NCI, National Cancer Institute -. (2015). *Dictionary of Cancer Terms: Biomarker*.

Ortega AD, Sanchez-Arago M, Giner-Sanchez D, Sanchez-Cenizo L, Willers I, Cuezva JM. Glucose avidity of carcinomas. Cancer letters. 2009 Apr 18;276(2):125-35.

Parodi, A. J. (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J, 348 Pt 1*, 1-13.

Paszek, M. J., DuFort, C. C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J. K., Godula, K., . . . Weaver, V. M. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature, 511*(7509), 319-325.

Pinho S.S., Figueiredo J., Cabral J., Carvalho S., Dourado J., Magalhães A., . . . Reis, C. A. (2013). E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching

biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. *Biochim Biophys Acta*, 1830(3), 2690-700.

Rêgo, M. J. B. M., Santos, L. X., Carvalho Jr, L. B., Beltrão, E. I. C., Sobral, A. P. V. (2005). P. 108 Lectin histochemistry of micoepidermoidcarcinoma. *Oral Oncology Supplement, 1(*1), 178-179.

Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., & David, L. (2010). Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol*, *63*(4), 322-329.

Sadik OA, Yan F. Electrochemical biosensors for monitoring the recognition of glycoprotein-lectin interactions. Analytica chimica acta. 2007 Apr 11;588(2):292-6.

Saito, T., Miyoshi, E., Sasai, K., Nakano, N., Eguchi, H., Honke, K., & Taniguchi, N. (2002). A secreted type of beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity. *J Biol Chem*, *277*(19), 17002-17008.

Santos, Beate Saegesser ; Farias, Patrícia Maria A De ; Menezes, Frederico Duarte De ; Ferreira, Ricardo De Carvalho ; Alves Júnior, Severino ; Figueiredo, Regina C B Q ; Beltrão, E. I. C. . Lectin functionalized quantum dots for recognition of mammary tumours. Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering, v. 6096, p. 1J-8J, 2006a.

Santos, Beate Saegesser ; Farias, Patrícia Maria A De ; Menezes, Frederico Duarte De ; Ferreira, Ricardo De Carvalho ; Alves Júnior, Severino ; Figueiredo, Regina C B Q ; Carvalho Junior, Luiz Bezerra De ; Beltrão, E. I. C. . CdS-Cd(OH)2 Core Shell Quantum dots functionalized with Concanavalin A Lectin for Recognition

of Mammary Tumours. Physica Status Solidi. C, Conferences and Critical Reviews, v. 3, p. 4017-4022, 2006b.

Sellors JW. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual / Joh W. Sellors, R. Sankaranarayanan. Lyon, France: Internaticonal Agency for Research on Cancer; 2003.

Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 2004 Nov;14(11):53R-62R.

Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. The Journal of biological chemistry. 2007 Feb 2;282(5):2753-64.

Sharon, N. Lectins: past, present and future. Biochemical Society Transactions**.** v. 36, p. 1457–1460. 2008.

Shimma Y, Saito F, Oosawa F, Jigami Y. Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. Applied and environmental microbiology. 2006 Nov;72(11):7003-12.

Shoreibah, M., Perng, G. S., Adler, B., Weinstein, J., Basu, R., Cupples, R., . . . Pierce, M. (1993). Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V. *J Biol Chem, 268*(21), 15381-15385.

Silva KC, Rosa ML, Moyse N, Afonso LA, Oliveira LH, Cavalcanti SM. Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009 Sep;104(6):885-91.

Simões CB. Patologia do trato genital inferior: questões de qualificação em colposcopia: São Paulo, Rocca; 2004

Solis D, Bovin NV, Davis AP, Jimenez-Barbero J, Romero A, Roy R, et al. A guide into glycosciences: How chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code. Biochimica et biophysica acta. 2015 Jan;1850(1):186-235.

Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology, 12*(4), 43R-56R.

Stansell E, Canis K, Haslam SM, Dell A, Desrosiers RC. Simian immunodeficiency virus from the sooty mangabey and rhesus macaque is modified with O-linked carbohydrate. Journal of virology. 2011 Jan;85(1):582-95.

Suits, M. D., Zhu, Y., Taylor, E. J., Walton, J., Zechel, D. L., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2010). Structure and kinetic investigation of Streptococcus pyogenes family GH38 alpha-mannosidase. *PLoS One, 5*(2), e9006.

Sun, Q., Kang, X., Zhang, Y., Zhou, H., Dai, Z., Lu, W., . . . Liu, Y. (2009). DSA affinity glycoproteome of human liver tissue. *Arch Biochem Biophys, 484*(1), 24-29.

Suwannarurk K, Bhamarapravati S, Thaweekul Y, Mairaing K, Poomtavorn Y, Pattaraarchachai J. The accuracy of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia diagnosis with loop electrosurgical excisional procedure under colposcopic vision. Journal of gynecologic oncology. 2009 Mar;20(1):35-8.

Suzuki, O., Nozawa, Y., & Abe, M. (2007). Loss of L-PHA-, PNA-, or ConA-reactive oligosaccharides is associated with a poor prognosis in human Burkitt's lymphoma. *Oncol Rep, 17*(4), 775-779.

Takahashi N, Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Nagasaka T, Kajiyama H, et al. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. Oncology reports. 2009 Nov;22(5):1027-32.

Taniguchi N, Korekane H. Branched N-glycans and their implications for cell adhesion, signaling and clinical applications for cancer biomarkers and in therapeutics. BMB reports. 2011 Dec;44(12):772-81.

Taniguchi, N., & Kizuka, Y. (2015). Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res*, *126*, 11-51.

Thom I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I, Goern M, Andritzky B, Blonski K, et al. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands). 2007 Jun;56(3):391-7.

Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2005 Aug;19(4):485-500.

Togayachi, A., Kozono, Y., Ishida, H., Abe, S., Suzuki, N., Tsunoda, Y., . . . Narimatsu, H. (2007). Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(40), 15829-15834.

Varki, A.; Cumming, R.D.; Esko, J.D.; et al.; editors. (2009). *Essentials of GLycobiology* (C. S. H. N. C. S. H. L. Press Ed. 2nd edition ed.).

Vasconcelos IM, Oliveira JT. Antinutritional properties of plant lectins. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology. 2004 Sep 15;44(4):385-403.

Volker, C., De Praeter, C. M., Hardt, B., Breuer, W., Kalz-Fuller, B., Van Coster, R. N., & Bause, E. (2002). Processing of N-linked carbohydrate chains in a patient with glucosidase I deficiency (CDG type IIb). *Glycobiology*, *12*(8), 473-483.

Wade, L.G. (1999). *Organic Chemistry* (I. Prentice-Hall Ed.).

Wang, L. X., & Huang, W. (2009). Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, *13*(5-6), 592-600.

Weinberg RA. A biologia do câncer2008.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC) – WHO: World cancer report 2014.

Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Shibata K, Takahashi N, Kajiyama H, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in endometrial cancer correlates with poor prognosis. British journal of cancer. 2007 Dec 3;97(11):1538-44.

Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. The FEBS journal. 2008 May;275(9):1939-48.

5. ARTIGO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE GnT-V DURANTE A EVOLUÇÃO DE LESÕES EM TECIDOS UTERINOS HUMANOS

Moura, R.D.S., Clark, A.T.R., Cavalcanti, C.L.B., Beltrão, E.I.C.*

Raphael D S Moura, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brasil

Arthur T R Clark, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Carmelita L B Cavalcanti, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Eduardo I C Beltrão, Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brasil

*** Correspondência:**

EIC Beltrão. LIKA – UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – CDU – Recife, PE. Brasil. 51710-910. Fone: +55 81 21012504, Fax: +55 81 21258484, e-mail: ebeltrao@hotmail.com.br

Palavras-chave: câncer, lectina, N-acetilglucosaminiltransferase V, poli-N-acetillactosaminas.

ABSTRACT

Uterus colon cancer is the fourth type of cancer most common among women. Mamalian cell surface, including maligns ones, present a glycocalix. Lectins have been used as histochemistry probes to the evaluation of glycans structure which are synthesized by glycosyltransferases. One of them is the N-Acetyl-glucosaminyltransferase V (GnT-V) which catalyzes the formation of branching glycans adding residues of N-Acetyl-glucosamine via a β-1,6 bond with a mannose. This action results in a glycan with a tetraantenary structure. The present work aimed to evaluate the expression of GnT-V during the progression of uterus colon lesions (cervical intraepithelial neoplasias grades I, II and III and squamous cell carcinoma, SCC) using immunohistochemistry agains MGAT5 and lectin histochemistry. Seventy five samples (normal=15, CIN 1=15, CIN 2=15, CIN 3=15 and SCC=15) were analyzed. Results were described regarding the low or high expression of target molecules for antibody and lectins. GnT-V did not presented significative difference among all diagnosis being predominantly classified as of low expression. L-PHA lectin evidenced that 93.3% of normal samples, 88.9% of CINs and 60% of SCC presented a high expression of branching residues with β-1,6 bond. In normal squamous epithelium this expression was predominantly observed in the cytoplasm and membrane of its basal cell while in SCC it was observed in the nucleous with a heterogeneous pattern. DSA did not showed significtive differences in the staining of normal and transformed tissues (CIN and SCC). PWM evidenced a significative diference in the staining (p = 0.0167) among normal and transformed samples where normal ones presented the lowest expression. The results did not showed a relation between GnT-V expression and PolyLacNAc in

human uterus colon tosues but they revealed a significant association between PolylacNAc and transformed tissues of uterus colon (CIN and SCC).

INTRODUÇÃO

A superfície externa das células de mamíferos, incluindo as malignas, é composta de um glicocálix, uma camada rica em carboidratos a qual está envolvida na interação célula-célula e célula-matriz (Thom *et al*, 2007; Chen *et al*, 2007). A partir dessa informação foi observado que as glicoproteínas de superfície celular têm um papel importante na pinocitose, diferenciação, reconhecimento, adesão intercelular e carcinogênese (Manoharan *et al*., 2004).

A glicômica é a parte da ciência responsável pelo estudo de todos os componentes glicídicos, ou seja, os glicanos, de um sistema biológico. A síntese desses glicanos é dependente da atuação de enzimas dentre as quais se destacam as glicosiltransferases (GTs) (Clark et al., 2014). A expressão e atividade dessas GTs se mostram alteradas em diversas situações fisiológicas e patológicas, incluindo o câncer, o qual tem mostrado relação estreita com essas enzimas (Taniguchi e Kizuka, 2015).

Uma glicosiltransferase em atual evidência é a N-acetilglucosaminiltransferase V (GnT-V), a qual é responsável pela formação de ramificações β1,6 N-acetilglucosamina (β1,6 GlcNAc) em cadeias de carboidratos tri- ou tetraantenários (Miyoshi *et al*., 2012). A partir da ramificação formada, a GnT-V possibilita a construção de uma estrutura de poli-N-acetilactosamina (PoliLacNAc) (Kinoshita *et al*., 2014), esta estrutura vem sendo relacionada com a invasão e metástase de diversos cânceres (Clark et al., 2014; Mitsui *et al*., 2012).

A histoquímica com lectinas é amplamente utilizada para identificar os carboidratos de superfície celular, tanto quantitativamente como qualitativamente

(Ghazarian *et al*., 2011). As lectinas de *Phaseolus vulgaris* (L-PHA), *Datura stramonium* (DSA) *e Phytolacca americana* (PWM) têm sido usadas em diversos estudos com objetivo de avaliar a frequência das ramificações β1,6 GlcNAc, dos carboidratos tri- ou tetraantenários e das PoliLacNAcs, respectivamente (Takahashi *et al.*, 2009; Sun *et al*., 2009; Clark *et al*., 2014).

O carcinoma escamoso do colo uterino, por possuir uma longa fase pré-invasiva com graus bem definidos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) torna o colo do útero um sítio ideal para o estudo da carcinogênese (Sellors e Sankaranarayanan, 2003). Dessa forma, esse estudo tentou relacionar a expressão da GnT-V e sua atividade, a partir da fomação de estruturas específicas, com o desenvolvimento das lesões neoplásicas, ocorridas no epitélio escamoso da cérvice uterina, esperando encontrar diferentes níveis de expressão tanto da enzima como dos produtos decorrentes de sua atuação nos diferentes graus de lesão do colo uterino humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: Tripsina (T1005), polímero-estreptavidina-peroxidase (S2438), peroxidase (P8375), lectina de *Phytolacca americana* (PWM) (L9379), lectina de *Datura stramoniun* (DSA) (L2766) e anticorpos anti-MGAT5 produzidos em coelho (HPA010919) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Lectina de *Phaseolus vulgaris* (L-PHA) conjugada à biotina (B-11) foi adquirida da Vector Laboratories. O sistema de visualização, Advanced™ HRP (K406889-2), e o substrato cromogênico, diaminobenzidina líquida (DAB) e o substrato (K346811-2), foram obtidos da DAKO. O Entellan® (107960) foi obtido da Merck.

Amostras: Foram obtidas amostras de tecido de colo uterino humano pertencentes ao setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade

Federal de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 15 amostras de cada diagnóstico (epitélio normal, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CCE), totalizando setenta e cinco amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina. O trabalho foi conduzido após aprovação pelo Comitê em Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE Número CAAE 18972413.1.0000.5208).

Imunohistoquímica: Cortes de (4 µm) foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100-70%), tratados com solução de hidróxido de amônio 10% (v/v) por 10 min a 25ºC e com tampão citrato 10mM, pH 6,0 por 30 min a 100ºC em *steamer* (CLARK *et al.*, 2014). Após esta etapa, as amostras foram tratadas com solução de metanol-H_2O_2 (1:1) (v/v) por 15 min a 25ºC. Os tecidos foram então incubados com uma solução a 1% (w/v) de albumina de soro bovino (BSA) em PBS (tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,2, contendo 150mM de NaCl), por 1h a 25ºC e em seguida incubados com o anticorpo primário em PBS-BSA (anti-MGAT 5 1:200) overnight a 4ºC. Posteriormente os tecidos foram incubados com anticorpo secundário e terciário (Advanced™ HRP - um sistema de visualização livre de biotina) por 45 min cada a 25ºC e revelados com uma solução de DAB de acordo com instruções do fabricante. As secções foram finalmente contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em álcool etílico (70-100%) e montadas com Entellan®. Entre cada etapa, as amostras foram lavadas duas vezes (5 min cada) com PBS. Amostras de tecido gástrico foram utilizadas como controle positivo (Uhlén *et al.*, 2015). Para o controle negativo substitui-se o anticorpo primário por PBS.

Histoquímica com lectinas: Após desparafinização em xilol e hidratação em álcool etílico (100-70%) os cortes de 4µm de biópsias foram tratados com solução de tripsina 0,1% (p/v) a 37ºC, por 2 min e com uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em metanol na proporção de 1/1 (v/v), por 15min à 25ºC. Em seguida as secções

histológicas foram incubadas com a solução de lectina (L-PHA-biotina, 20µg/mL; DSA, 30µg/mL; e PWM, 30µg/mL) por 2h a 4ºC. A L-PHA biotinilada foi visualizada usando-se solução de polímero-estreptavidina-peroxidase (1:1000) por 45 min a 25ºC. Já para a PWM e para a DSA, lectinas não-conjugadas, foi realizada a conjugação com a peroxidase a partir da incubação dos tecidos com solução de 5% (p/v) desta enzima por 1h a 25ºC. Após cada etapa descrita, as lâminas foram lavadas duas vezes, por 5 minutos, com PBS (tampão fosfato de sódio 10 mM em pH 7,2 contendo 0,15 M de NaCl). Para todas as lectinas a marcação foi revelada de acordo com instruções do fabricante do DAB. As secções histológicas foram, então, contracoradas com hematoxilina de Harris e desidratadas em álcool etílico (70-100%) e montadas com Entellan® segundo Beltrão *et al*., 2003. O controle negativo para a marcação das lectinas foi realizado através da substituição destas por PBS durante a incubação com os tecidos.

Análise da marcação e captura de imagem: A captura de imagem e análise das secções histológicas foram realizadas através da utilização de um microscópio de luz Nikon Eclipse 50i (USA) com o software NIS-Elements F (versão 2.30). A marcação dos tecidos foi classificada inicialmente como positiva ou negativa, sendo posteriormente classificadas segundo Takahashi (2009), atribuindo uma pontuação para a quantidade de células marcadas (contagem visual ao microscópio) e outra para a intensidade da marcação (comparadas aos controles positivos e negativos):

Quantidade de células:

0 se < 5%	I se 5-30%	2 se 30-70%	3 se >70%

Intensidade de marcação:

0 se nenhuma	I se fraca ou moderada	2 se forte

Finalmente a expressão foi pontuada segundo a soma dos dois critérios. Quando entre 0 e 2, baixa expressão (revelando nenhuma, pouca ou fraca marcação da enzima ou do carboidrato alvo da lectina em questão), quando entre 3 e 5, alta expressão dos mesmos.

Análise estatística: O teste de Fischer foi usado para avaliar o relacionamento entre a marcação positiva e o diagnóstico das amostras. Diferenças de $p < 0.05$ foram consideradas significantes. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os scores da imunomarcação entre todos os diagnósticos. Para análise dos dados foi usado o software estatístico GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A GnT-V (codificada pela MGAT5) mostrou ser muito pouco expressa nos tecidos do colo do útero, tanto em amostras normais como nas transformadas (NIC I, NIC II, NIC III e CCE). Ela foi classificada como positiva em apenas 20% (15) (figura 1a) de todas as 75 amostras avaliadas, tendo como padrão a marcação citoplasmática (figura 2), e não mostrou nenhuma diferença significativa entre a positividade de marcação dos diferentes diagnósticos.

A presença do produto galactosilado da ação da GnT-V (Gal β(1,4)GlcNAc β(1,6)Man α(1,6)) foi reconhecido pela lectina L-PHA em 98,7% (74) dos 75 casos estudados. A alta expressão foi também observada nas amostras normais (98,7%) e pré-invasivas (89%), porém, o conjunto desses dois grupos de amostras foi, quanto à expressão, significativamente diferente das amostras de CCE ($p = 0.0111$), as quais apresentaram a alta expressão em 60% das amostras (figura 1b).

A localização da marcação da L-PHA se deu, de forma geral, em toda espessura do epitélio escamoso normal do colo uterino, todavia, foi evidenciada uma maior intensidade desta marcação no citoplasma das células da camada basal deste epitélio. Da

mesma forma, nas NICs e no CCE as células transformadas apresentaram maior intensidade de marcação citoplasmática enquanto as células normais mostraram uma marcação mais evidente na membrana (figura 4).

As polilactosaminas foram reconhecidas pela PWM em 52% (39) de todas as amostras, e essa positividade se apresentou mais marcante nos tecidos transformados (60%), comparados em conjunto, do que nos normais (20%) ($p < 0.001$) (figura 1d). Essa diferença se confirma ainda mais quando se observou que 100% (17) das amostras classificadas como de alta expressão para PoliLacNAc estão incluídas no conjunto dos tecidos transformados. Marcações nucleares pela PWM foram observadas em 71,8% (28) das 39 amostras positivas, dessas, 26 pertenciam ao conjunto dos tecidos transformados (figura 6). Esse resultado demonstrou uma diferença significativa da marcação nuclear da PWM quanto aos tecidos normais e transformados do colo do útero ($p = 0,0386$) (figura 7).

Para a DSA, a positividade das amostras se mostrou pequena. Dos 75 casos, apenas 28% (21) foram positivos, não apresentando diferença significativa entre os diagnósticos (figura 1c). A positividade dessa lectina se relaciona tanto com a presença de N-glicanos tri- ou tetraantenários como também com a presença de PoliLacNAc, porém os resultados obtidos para a DSA não se associaram com os da L-PHA, e somente se assemelharam aos da PWM pela elevada incidência de marcações nucleares nas amostras positivas, 61,9% (13) das 21 (figura 5), contudo não mostrando diferença significativa deste tipo de marcação para os diferentes diagnósticos.

Dos 15 casos positivos para GnT-V, 6 foram considerados como de alta expressão da enzima, sendo todos eles derivados de tecidos transformados (figura 3). Mesmo não sendo estatisticamente significativo, esse resultado mostra uma maior relação dessa glicosiltransferase com as amostras transformadas do colo uterino, em

comparação ao tecido normal, corroborando com relatos anteriores de que a regulação da expressão da GnT-V está elevada em estágios pré-câncer, sendo relatada em tumores como o carcinoma hepatocelular e o câncer esofágico (ISHIBASHI *et al.*, 2005; ITO *et al.*, 2001) e em estágios iniciais de quase todos os cânceres (MYOSHI *et al.*, 2012).

Nosso estudo encontrou uma alta negatividade para a expressão da GnT-V no carcinoma do colo do útero (CCE). De forma geral, a baixa expressão dessa enzima tem sido mais frequentemente encontrada em carcinomas de células escamosas do que em outros de células não-escamosas (AKITA, 2004), em concordância com nossos resultados. No carcinoma de células escamosas oral, a negatividade da expressão da GnT-V foi relacionada a um pior prognóstico (SETO *et al.*, 2013), porém a relação entre a expressão dessa glicosiltransferase e o prognóstico de um câncer parece depender do tipo histológico e do órgão de origem da neoplasia (TAKAHASHI *et al.*, 2009). Além disso, a importância da estrutura de oligossacarídeos formada por essa enzima como um precursor de malignidade difere entre órgãos, e o substrato alvo da GnT-V pode diferir entre os cânceres (SETO *et al.*, 2013), como o do colo uterino.

Em um estudo prévio, Takahashi e colaboradores (2009) mostraram, a partir da marcação da L-PHA, que a GnT-V catalisou a formação da ramificação β(1,6) em suas glicoproteínas-alvo, em tumores mucinosos do ovário. Da mesma forma, nosso estudo evidencia a mesma atuação da GnT-V nos tecidos normais e transformados do colo uterino. Porém, não houve correlação entre a expressão dessa enzima com a expressão dos glicoconjugados reativos a L-PHA, como também verificado, em um relato anterior, no linfoma de células B (SUZUKI *et al.*, 2003).

Foi visto uma maior intensidade da marcação da L-PHA nas células basais do epitélio normal do colo uterino, em relação ao restante do epitélio, sugerindo que glicanos de estruturas tetraantenárias parecem estar presentes em maior quantidade, nas

células menos diferenciadas. Comportamento semelhante foi também observado em um estudo anterior para células-tronco da medula óssea (HAMOUDA *et al.*, 2013).

O presente estudo encontrou um aumento significativo da frequência de marcação da PWM nos tecidos transformados da cérvice, com predileção pelo núcleo das células. Esses dados possibilitam a interpretação de que as PoliLacNAcs estão significativamente mais expressas nos núcleos das células dos tecidos transformados do colo uterino em comparação a qualquer outra região, nos tecidos normais do mesmo, corroborando com os achados de Clark e colaboradores (2014), que indicam ainda, que essa expressão nuclear pode está relacionada a um mau prognóstico nas lesões uterinas.

A complexidade da sequência de carboidratos de superfície celular, exibindo padrões diferentes de glicosilação no tecido normal e transformado (GABIUS *et al.*, 2002; BLOMME *et al.*, 2009) revelam uma possível relação com o desenvolvimento da malignidade, e participação nos processos tanto de invasão como de metástases (BROOKS & HALL, 2002). Tal relação, causada possivelmente por glicosilações aberrantes que levam a um encurtamento nas cadeias de glicanos, ou a uma super-expressão destas na superfície de células, nas quais normalmente são ausentes ou discretas, tem sido citada por diversos autores a partir da observação da presença/ausência ou aumento/diminuição da marcação efetuada pelas lectinas em tecido neoplásico maligno (Guillot *et al*., 2004; Ghazarian *et al*., 2011).

CONCLUSÕES

Nossos resultados não demonstraram diferença significativa da expressão da GnT-V entre os tecidos do colo uterino diagnosticados como normal, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CCE. Além disso, mostraram que não houve relação direta entre a expressão da GnT-V e as cadeias de PoliLacNAc nos tecidos do colo uterino humano, as quais

podem ser substrato de glicosidases que tenham sua expressão modulada durante o processo de desdiferenciação celular e que podem “desfazer” ou “competir” quanto a formação do glicano em questão. Contudo, os resultados revelaram uma significativa associação entre as PoliLacNAc e os diagnósticos das NICs e do CCE da cérvice, fazendo crer que estas estruturas estejam, de alguma forma, relacionadas ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e do carcinoma de células escamosas do colo uterino.

Tomados em conjunto, esses dados fornecem informações valiosas quanto ao perfil de glicosilação ocorrida nos tecidos normais, lesões pré-malígnas e CCE do colo do útero, porém, mais estudos são necessários a fim de elucidar de forma mais detalhada, o papel da GnT-V e das PoliLacNAc na progressão de neoplasias escamosas da cérvice.

REFERÊNCIAS

Akita H. [Molecular biology of lung cancer]. Nihon Kokyuki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society. 2004 May;42(5):378-86

Beltrão EI, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valenca MM, Coelho LC, et al. Parkia pendula lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. European journal of histochemistry : EJH. 2003;47(2):139-42

Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. Journal of hepatology. 2009 Mar;50(3):592-603.

Brooks SA, Hall DM. Investigations into the potential role of aberrant N-acetylgalactosamine glycans in tumour cell interactions with basement membrane components. Clinical & experimental metastasis. 2002;19(6):487-93.

Chen S, Zheng T, Shortreed MR, Alexander C, Smith LM. Analysis of cell surface carbohydrate expression patterns in normal and tumorigenic human breast cell lines using lectin arrays. Analytical chemistry. 2007 Aug 1;79(15):5698-702.

Clark, A. T., Guimaraes da Costa, V. M., Bandeira Costa, L., Bezerra Cavalcanti, C. L., De Melo Rego, M. J., & Beltrão, E. I. (2014). Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polylactosamines in uterine lesions. *Eur J Histochem, 58*(2), 2334.

Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. Biochimica et biophysica acta. 2002 Sep 19;1572(2-3):165-77

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Acta histochemica. 2011 May;113(3):236-47.

Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. Bulletin du cancer. 2004 Feb;91(2):141-58.

Hamouda H, Ullah M, Berger M, Sittinger M, Tauber R, Ringe J, et al. N-glycosylation profile of undifferentiated and adipogenically differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells: towards a next generation of stem cell markers. Stem cells and development. 2013 Dec 1;22(23):3100-13.

Ishibashi Y, Dosaka-Akita H, Miyoshi E, Shindoh M, Miyamoto M, Kinoshita I, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the development of human esophageal cancers: immunohistochemical data from carcinomas and nearby noncancerous lesions. Oncology. 2005; 69(4):301-10.

Ito Y, Miyoshi E, Sakon M, Takeda T, Noda K, Tsujimoto M, et al. Elevated expression of UDP-N-acetylglucosamine: alphamannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase is an early event in hepatocarcinogenesis. International journal of cancer Journal international du cancer. 2001 Mar 1;91(5):631-7.

Kinoshita, M., Mitsui, Y., Kakoi, N., Yamada, K., Hayakawa, T., & Kakehi, K. (2014). Common glycoproteins expressing polylactosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles. *J Proteome Res, 13*(2), 1021-1033.

Manoharan S, Padmanabhan M, Kolanjiappan K, Ramachandran CR, Suresh K. Analysis of glycoconjugates in patients with oral squamous cell carcinoma. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2004 Jan;339(1-2):91-6.

Mitsui, Y., Yamada, K., Hara, S., Kinoshita, M., Hayakawa, T., & Kakehi, K. (2012). Comparative studies on glycoproteins expressing polylactosamine-type N-glycans in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal, 70*, 718-726.

Miyoshi, E., Terao, M., & Kamada, Y. (2012). Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice. *BMB Rep, 45*(10), 554-559.

Sellors JW. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginner's manual / Joh W. Sellors, R. Sankaranarayanan. Lyon, France: Internaticonal Agency for Research on Cancer; 2003.

Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, et al. Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. SpringerPlus. 2013;2:657.

Sun, Q., Kang, X., Zhang, Y., Zhou, H., Dai, Z., Lu, W., . . . Liu, Y. (2009). DSA affinity glycoproteome of human liver tissue. *Arch Biochem Biophys, 484*(1), 24-29.

Suzuki O, Nozawa Y, Kawaguchi T, Abe M. Alpha-2,6-sialylation of L-PHA reactive oligosaccharides and expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in human diffuse large B cell lymphoma. Oncology reports. 2003 Nov-Dec;10(6):1759-64.

Takahashi N, Yamamoto E, Ino K, Miyoshi E, Nagasaka T, Kajiyama H, et al. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary. Oncology reports. 2009 Nov; 22(5):1027-32.

Taniguchi, N., & Kizuka, Y. (2015). Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Adv Cancer Res, 126*, 11-51.

Thom I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I, Goern M, Andritzky B, Blonski K, et al. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands). 2007 Jun;56(3):391-7.

Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science (New York, NY). 2015 Jan 23;347(6220):1260419.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

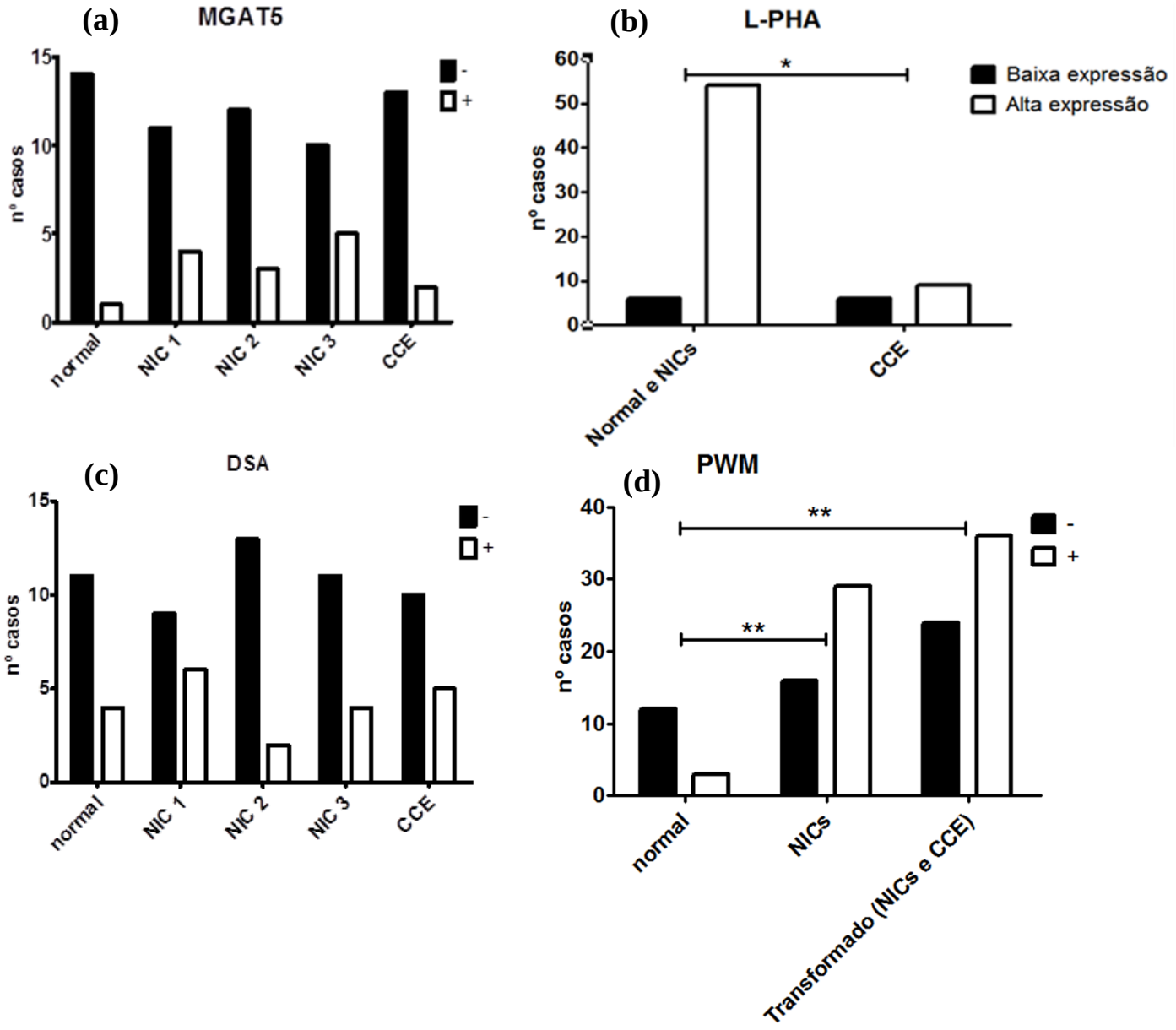

Figura 1: Gráfico correspondente ao número de casos: (a) positivos e negativo para o anticorpo anti-MGAT5; (b) apresentando alta ou baixa expressão de ramificações β(1,6) GlcNAc, sendo a alta expressão significativamente diferente do conjunto normal/NICs para o carcinoma (p=0,0111)*; (c) positivos ou negativos para a lectina DSA; (d) positivos e negativos para a lectina PWM, comparando a diferença entre os tecidos normais e as NICs reunidas (p=0,0059)** e a diferença quando comparados os tecidos normais com os transformados (NICs + CCE) (p=0,083)**.

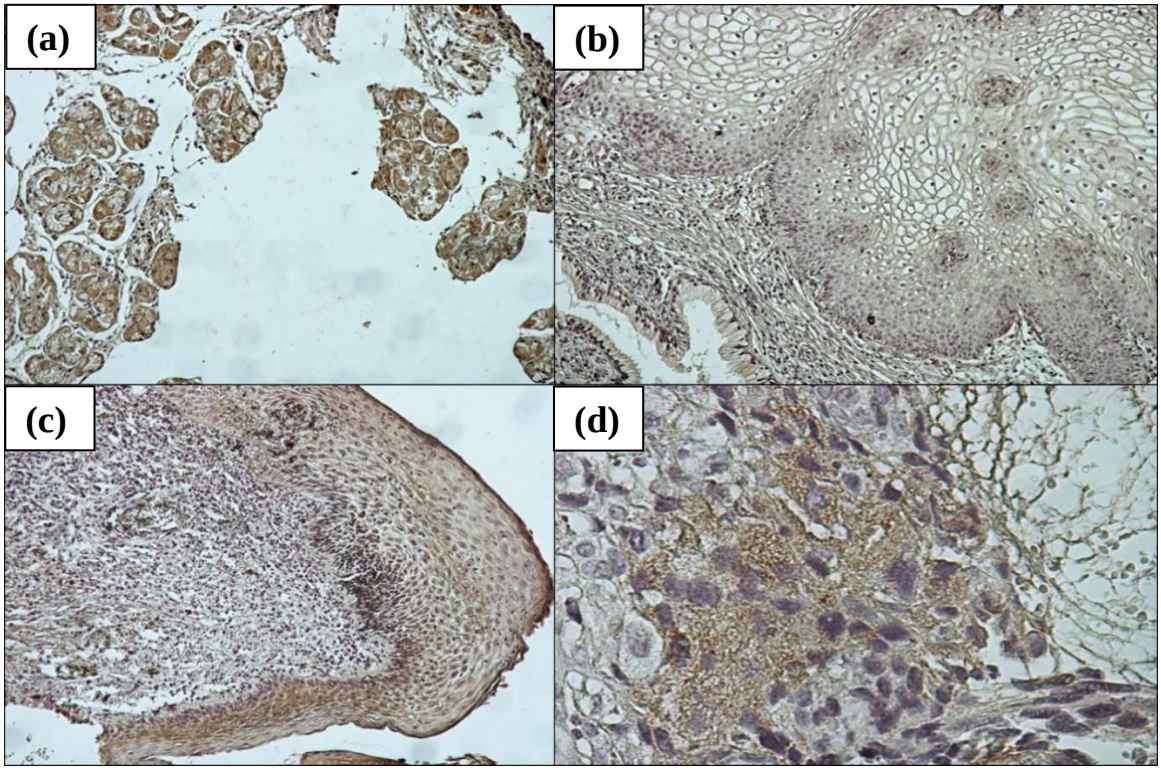

Figura 2: Imunohistoquímica para GnT-V. (a) Controle positivo em tecido normal gástrico (100x), (b) amostra de NIC 1 negativa para GnT-V (100x), (c) amostra de NIC 1 positiva apresentando marcações citoplasmaticas (100x), (d) amostra com CCE positiva apresentando marcações citoplasmáticas (400x).

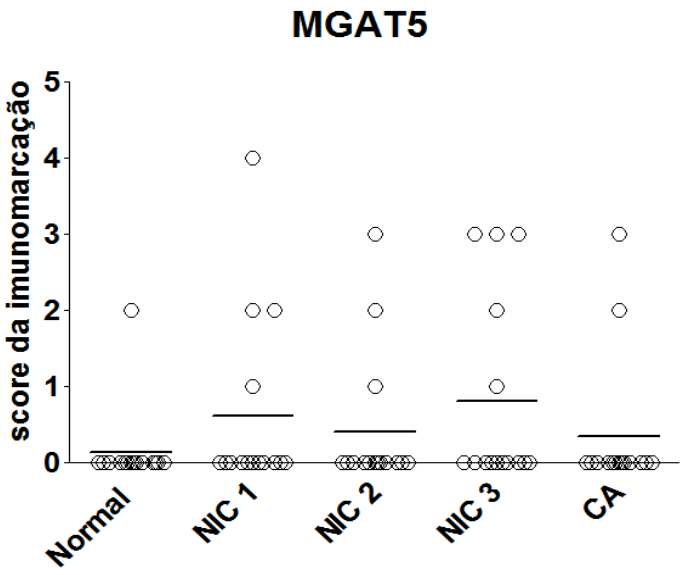

Figura 3: Gráfico mostrando o score da imunomarcação da GnT-V. Evidencia-se que o score referente a alta expressão (3-5) esteve presente apenas nas amostras transformadas (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CA) do colo uterino.

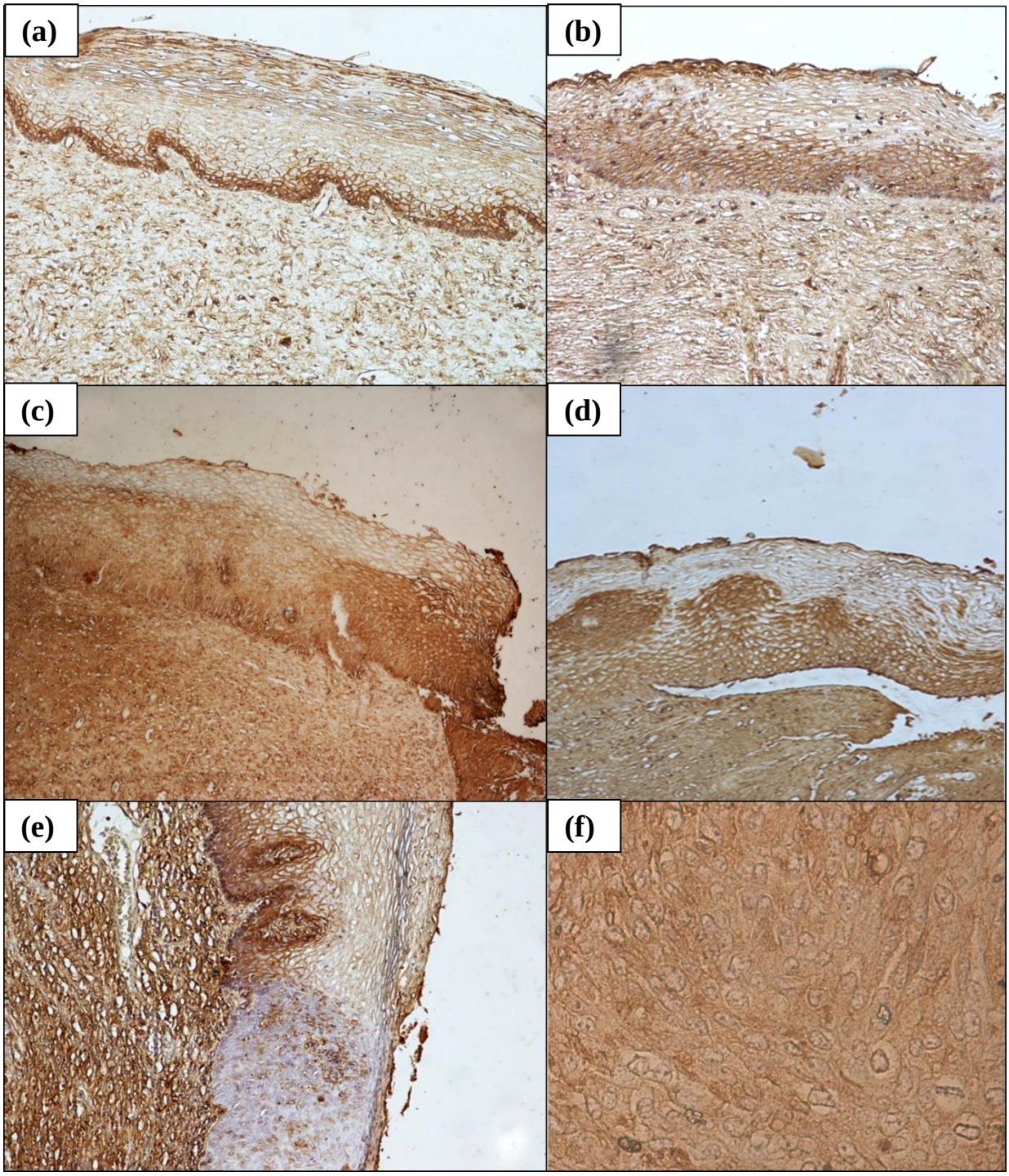

Figura 4: Histoquímica com L-PHA. (a) Amostra de tecido normal positiva com marcações em todo epitélio escamoso, com maior intensidade no citoplasma das células da camada basal (100x), (b) e (d) Amostra de tecido com NIC 1 positiva, apresentando maior intensidade de marcação nas células transformadas (100x), (c) Amostra de tecido com NIC 2 positiva, apresentando maior intensidade de marcação nas células transformadas (100x), (e) Amostra de tecido com NIC 3, mostrando a diferença de marcação da L-PHA no epitélio normal do epitélio adjacente da NIC (100x), (f) Amostra com CCE apresentando marcação citoplasmática para a L-PHA (400x).

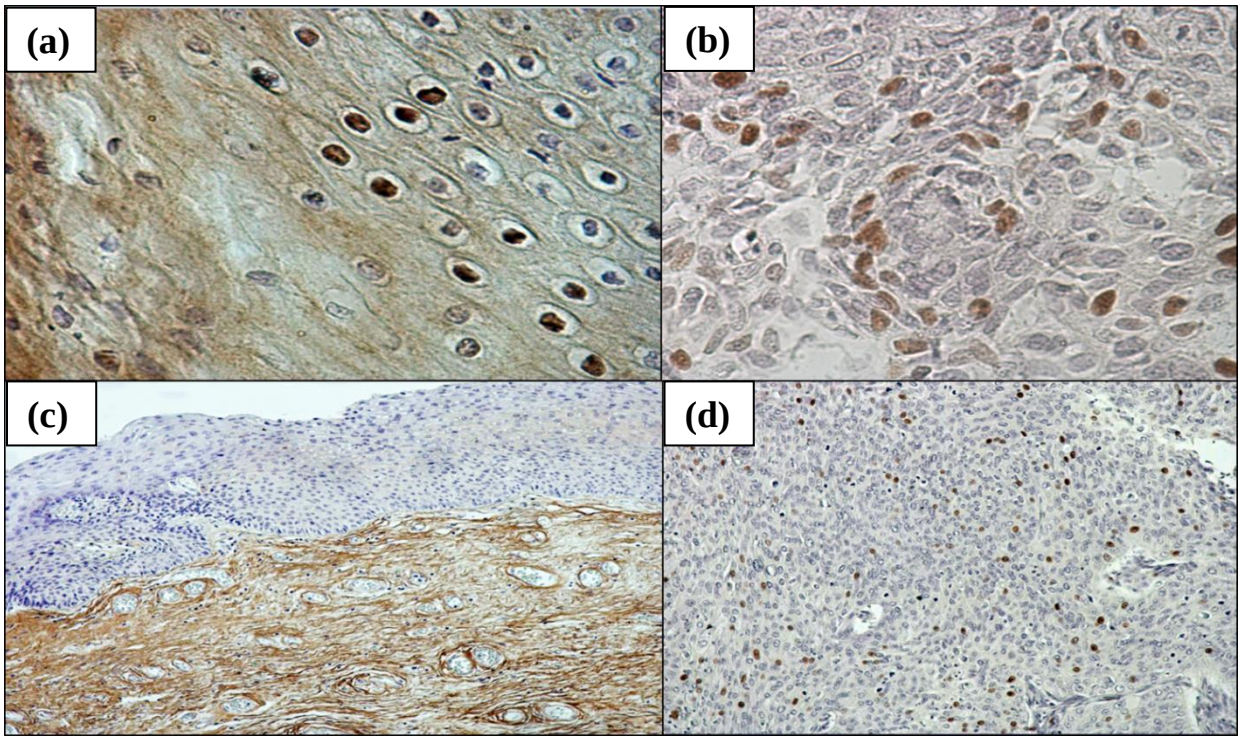

Figura 5: Histoquímica com DSA. (a) epitélio escamoso normal apresentando marcações citoplasmáticas e nucleares (400x), (b) Amostra de epitélio com NIC 3 positiva para DSA, apresentando marcações nucleares (400x), (c) Amostra de tecido com NIC 1, com epitélio negativo para a DSA (100x), (d) Amostra de tecido com CCE apresentando marcações nucleares para a DSA (100x).

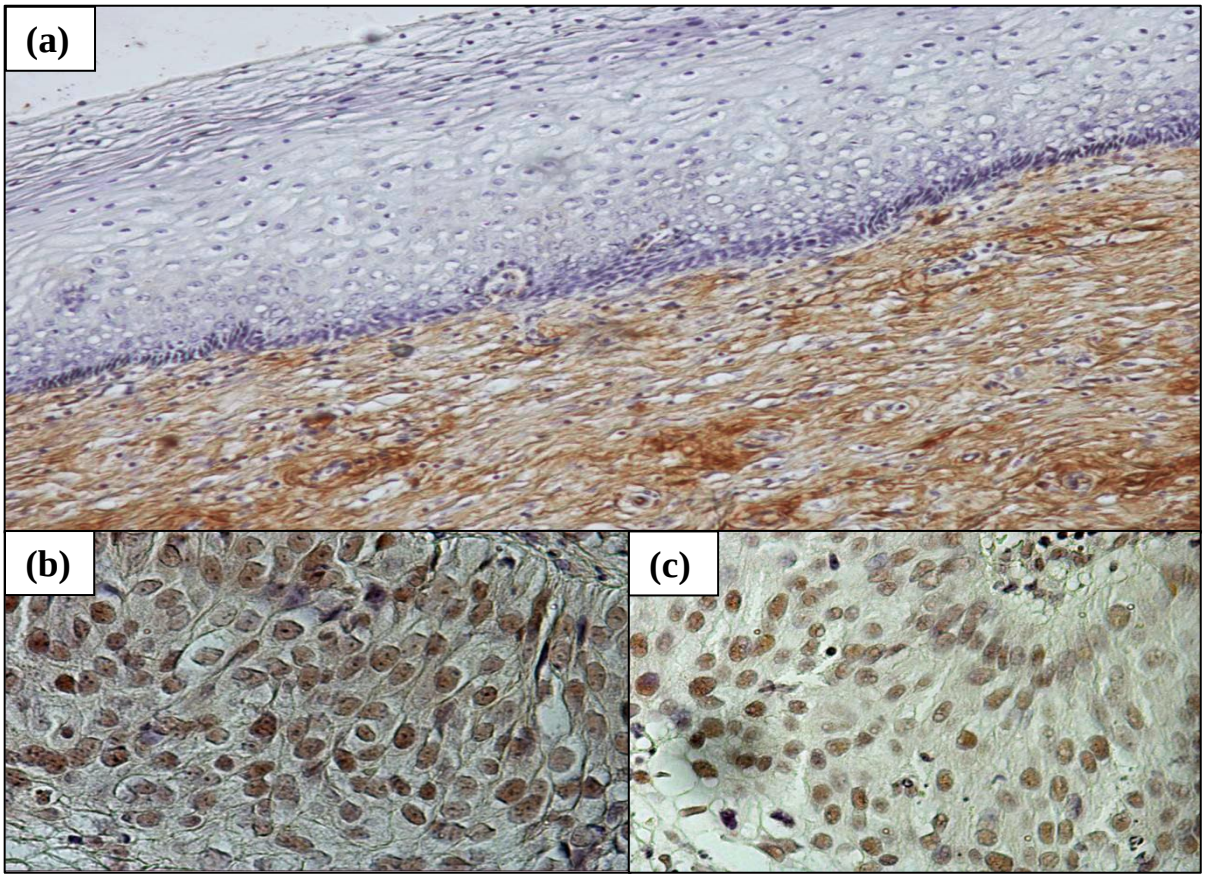

Figura 6: Histoquímica com PWM. (a) amostra de tecido normal mostrando epitélio escamoso negativo (100x). (b) Amostra de tecido com NIC 3 apresentando marcações nucleares (400x), (c) Amostra com CCE apresentando marcações nucleares (400x).

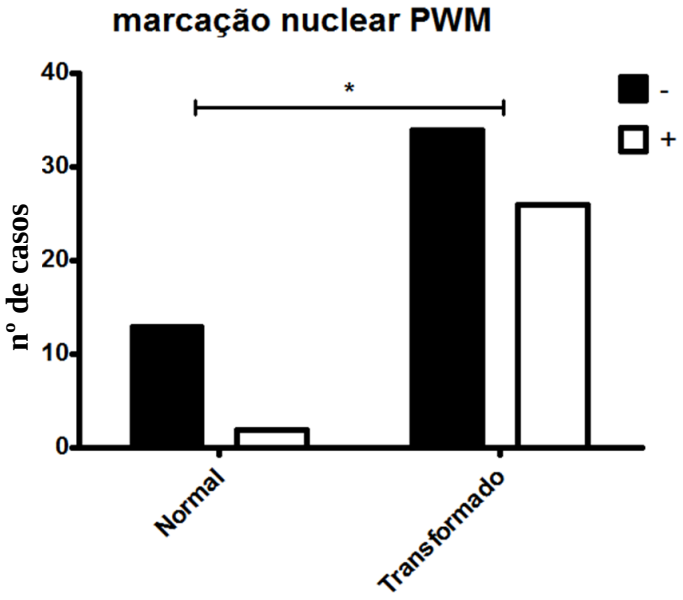

Figura 7: Marcação nuclear para a lectina PWM, comparando os tecidos normais com o conjunto dos tecidos transformados (NICs + carcinoma) (*p*=0,0386)*.