



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**APLICADA À SAÚDE**

**AVALIAÇÃO E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE**  
**POLI-N-ACETIL LACTOSAMINAS EM ALTERAÇÕES**  
**CELULARES DE MAMA E ÚTERO**

**ARTHUR TENORIO RIBEIRO CLARK**

**RECIFE, 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**APLICADA À SAÚDE**

**AVALIAÇÃO E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE**  
**POLI-N-ACETIL LACTOSAMINAS EM ALTERAÇÕES**  
**CELULARES DE MAMA E ÚTERO**

**ARTHUR TENORIO RIBEIRO CLARK**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

**ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO**

**RECIFE, 2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Clark, Artur Tenório Ribeiro**

**Avaliação e correlação da expressão de poli-n-acetil lactosaminas em alterações celulares de mama e útero / Artur Tenório Ribeiro Clark- Recife: O Autor, 2016.**

**74 folhas: il., fig., tab.**

**Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.**

**Inclui referências**

- 1. Câncer 2. Biomarcador em doença 3. Lectinas I. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro (orientador) II. Título**

**616.994**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017-239**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**APLICADA À SAÚDE**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Eduarda de Larrazábal

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

# FOLHA DE APROVAÇÃO QUALIFICAÇÃO

Nome: Clark, Arthur Tenorio Ribeiro

Título: AVALIAÇÃO E CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POLI-N-ACETIL  
LACTOSAMINAS EM ALTERAÇÕES CELULARES DE MAMA E ÚTERO

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título  
de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Defendida em 16 de dezembro de 2016

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão  
Orientador

---

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior  
Titular Interno

---

Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha  
Titular Interna

---

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira  
Titular Externa

---

Profa. Dra. Luíza Rayana Amorim de Lima  
Titular Externa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Aquele que tudo permitiu e vem permitindo na minha vida, meu Deus todo poderoso. Sou muito grato por Ele ter me proporcionado o privilégio de terminar mais uma etapa em minha vida.

Agradeço a toda a minha família por todo o apoio, convívio e por terem me proporcionado tudo que tiveram ao alcance deles para que eu pudesse ser uma pessoa reta e íntegra.

Agradeço também à minha eterna namorada, hoje noiva e futura esposa, Sabrina, com quem eu irei começar a minha família e quem tem me dado todo o suporte, carinho e amor nesses dias finais. Meu muito obrigado, minha princesa, essa conquista também tem um parcela sua.

Agradeço ao meu orientador e futuro cunhado, Eduardo Beltrão, que tem tido toda a paciência para comigo nesses quase 10 anos de orientação.

Aos funcionários e ex-funcionários do LIKA e PPGBAS, agradeço em nome de Eliete Rodrigues, por sempre estarem disponíveis quando necessário.

Agradeço ao corpo de docentes, em nome do Prof. Luiz Carvalho, por terem contribuído e me passado mais conhecimento científico.

Também agradeço aos meus colegas de pós-graduação e do Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer, que contribuíram, cada um do seu jeito, seja cientificamente ou apenas socialmente, durante essa minha caminhada, tornando-a mais prazerosa.

E também agradeço aos meus amigos, em nome do Rafael “Pé” Santos, por sempre estarem preocupados e orarem por mim, para que mais uma etapa da minha vida se cumprisse.

Meu muito obrigado à todos.

“Para se ter sucesso é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste.”

**Steve Jobs**

## RESUMO

Considerado um problema de saúde pública, o câncer tem tido um grande impacto em toda a comunidade, seja em países desenvolvidos ou em países em desenvolvimento. Em mulheres, destacam-se os cânceres de mama e útero, sendo o primeiro o de maior incidência entre as mulheres. Uma detecção precoce desses dois tipos de câncer pode significar um aumento da sobrevivência do paciente e de sua cura. Uma das áreas de pesquisa voltada para o estudo do câncer é a busca por biomarcadores que possam ser úteis em sua detecção e/ou tratamento. É de notório conhecimento que uma expressão alterada de glicoconjugados de superfície celular podem contribuir para o fenótipo maligno em eventos oncogênicos. Entre os glicanos desses glicoconjugados, a polilactosamina (poliLacNAc) tem sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial papel em diversos eventos oncogênicos, em especial um envolvimento com o potencial metastático. Assim, a expressão de poliLacNAc e outros carboidratos (GlcNAc) foram avaliados, através de histoquímica com lectinas, em amostras normais e transformadas de colo uterino e mama em diferentes estágios de transformação. Também foram verificadas a expressão, utilizando imunohistoquímica, de glicosiltransferases (MGAT5,  $\beta$ 3GnT2 e  $\beta$ 3GnT3) que podem alterar a expressão das poliLacNAc e galectina-3 (Gal-3), uma proteína que tem afinidade por polilactosaminas que também tem sido associada a eventos oncogênicos, incluído a metástase. Nas amostras de tumores de colo uterino foi observado a presença de cadeias de poliLacNAc foi observada mais expressas nas amostras com maior grau de transformação (carcinomas) quando comparado com as outras amostras normais e pré-malignas, além de que uma expressão nuclear também foi observada significativamente nesse tipo de amostra. Nas amostras de tecidos de mama as poliLacNAc foram pouco expressas em todas as amostras. No entanto, uma expressão de MGAT5, uma enzima que pode regular a expressão de poliLacNAc e que também associada à metástase foi mais observada nas amostras com grau de transformação mais elevado. Essas observações reforçam o potencial envolvimento das cadeias de poliLacNAc e de enzimas-chaves que regulam sua expressão, como a MGAT5, durante os eventos de transformação oncogênica.

Palavras-chave: Câncer. Galectina-3. Mama. MGAT5. Polilactosamina.

## ABSTRACT

A public health problem, cancer has a major impact in the entire community, in developed countries or in developing countries. In women, breast and uterine cancers are the most prevalent, being breast cancer the first. An early detection of both cancer can allow an increasing of patient survival and rate of health. One of the goals of cancer science is the biomarker research to use them at detection and/or treatment. It is known that an altered expression of glycoconjugates of cell surface can contribute to the malignant phenotype at oncogenic events. Among these glycans, polylectosamine (polyLacNAc) has been target of many studies for its potential role in many oncogenic events, in especial at the metastatic potential. Thus, the expression of polyLacNAc and others carbohydrates (GlcNAc) was evaluated, using lectin histochemistry, in normal and transformed samples of uterine and breast tissue at different stages. It was also evaluated the expression, by immunohistochemistry, of glycosyltransferases (MGAT5,  $\beta$ 3GnT2 e  $\beta$ 3GnT3) which could regulate polyLacNAc chains and of galectin-3 (Gal-3), a binding protein for polyLacNAc which has been correlated to oncogenic events, including metastasis. At uterine samples, was observed the presence of polyLacNAc chains at high levels in samples which higher degree of transformation (carcinoma) when compared to the normal and pre-malignant samples, and was observed a significant nuclear expression at these samples. In breast samples, polyLacNAc was observed at lower levels at all samples. Besides, MGAT5 expression was observed at higher levels in samples which higher transformation degree. These findings reinforces the potential involvement of polyLacNAc chains and the enzymes involved in its expression, like MGAT5, at oncogenic events.

Keywords: Breast. Cancer. Galectin-3. MGAT5. Polylectosamine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma Fonte: INCA (2015). ..... 18
- Figura 2: Esquema mostrando as etapas do modelo de iniciação/progressão do câncer. (1) Células normais formam os tecidos e órgãos; (2) em condições normais elas crescem, se reproduzem e morrem; (3) a iniciação do processo começa quando elas sofrerem ação de agentes cancerogênicos elas sofrem alterações (mutação) no DNA; (4) na promoção, elas passam a se dividir descontroladamente, dando origem a um tumor; (5) após isso as células mutadas podem adquirir características novas e começar a invadir tecidos e metastatizar em outros órgãos (Fonte: [https://static.tuasaude.com/img/posts/2015/05/3a270720a1d3506194549f5774d3497d-640\\_427.jpeg](https://static.tuasaude.com/img/posts/2015/05/3a270720a1d3506194549f5774d3497d-640_427.jpeg)). ..... 19
- Figura 3: Etapas do processo de metástase. O tumor crescente no tecido primário adquire a habilidade de invadir os tecidos adjacentes e intravasalar para vasos sanguíneos ou linfáticos. Assim, ele se dissemina para outros sítios secundários através da circulação. Ao atingir esses sítios as células extravasam os vasos e se instalam dando início a proliferação descontrolada e formação de um tumor secundário Fonte: <http://www.saudemedicina.com/wp-content/uploads/2014/06/metastase.jpg>..... 20
- Figura 4: Algumas das diferentes formas de existência dos glicoconjugados (glicolipídeos, glicoproteínas O- ou N-ligados, proteoglicanos, entre outros) presentes na membrana celular ou na matriz extracelular (MEC). Figura adaptada de Vasconcelos-Santos et al. (2015). ..... 25
- Figura 5: Tipos de proteínas transmembrana existentes na bicamada lipídica. (1) proteína  $\alpha$ -hélice simples; (2) múltiplas  $\alpha$ -hélices; (3) ancorado por ligação covalente a um lipídeo; (4) ligadas a fosfatidinositol da monocamada citosólica; (5 e 6) ligadas por interações covalentes à outras proteínas. As glicosiltransferases se apresentam em sua maioria como proteínas do tipo 2, contenda um região C-terminal com seu domínio catalítico voltado para o interior do aparato de Golgi, uma região transmembrana composta por várias  $\alpha$ -hélices e uma região N-terminal citosólica Fonte: <http://classroom.orange.com/pt/000250197.jpg>. ..... 26

Figura 6: Os dois tipos básicos de glicosilação em proteínas. A ligação das unidades de açúcar a proteínas é uma modificação pós-traducional que permite uma maior diversidade as proteínas. A glicosilação de N-ligantes ocorre a resíduos de asparagina da proteína, enquanto a de O-ligantes ocorre através de serina ou treonina. Figura adaptada de Nardy et al. (2016).....	28
Figura 7: Estrutura da poli-N-acetillactosamina, um polímero linear composto por repetições de N-acetillactosamina. Os resíduos de galactose e N-acetil glicosamina são ligados por ação de duas famílias de enzimas das glicosiltransferases, a $\beta$ 3GNTs e $\beta$ 4GALT (Fonte: autoria própria). .....	33
Figura 8: Figura esquemática representando um monômero da galectina-3 , mostrando seu domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) na região C-terminal, o domínio central parecido como colágeno e o domínio N-terminal (Fonte: adaptada de Fortuna-Costa et al. (2014)). .....	39

## CAPÍTULO 1

Figura 1: Immunohistochemistry and lectin histochemistry of premalignant and malignant lesions of human uterine cervix. 1a) Anti- $\beta$ 3GnT3 staining of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, showing moderate dysplasia confined to the basal 2/3 of epithelium. 2a) Anti- $\beta$ 3GnT2 staining of invasive squamous carcinoma, showing staining of the invasive cells. 3a) <i>Wheat germ</i> agglutinin (WGA) staining squamous epithelium with cervical intraepithelial neoplasia grade 2. 4a) <i>Phytolacca americana</i> lectin (PWM) staining of cervical intraepithelial neoplasia grade 1. 1b, 2b, 3b, 4b) Negative controls for respective assay. 4c) <i>Phytolacca americana</i> lectin (PWM) staining of nucleus in invasive cells of squamous carcinoma. ....	50
Figura 2: Statistical analysis of anti- $\beta$ 3GnT2, anti- $\beta$ 3GnT3, <i>Phytolacca americana</i> lectin (PWM) and <i>Wheat germ</i> agglutinin (WGA) staining. *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.0005; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; SC, squamous carcinoma.....	51

Figura 3: Statistical analysis of nuclear staining of *Phytolacca americana* lectin (PWM).  
\*P<0.05; \*\*P<0.005; \*\*\*P<0.0005; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; SC, squamous carcinoma..... 52

## CAPÍTULO 2

Figura 1: Observed results of: (a) PWM detecting the presence of polyLacNAc chains in a sample with CDIS just at the stroma and not at the tumor cells; anti-MGAT5 not detecting the presence of the glycosyltransferase MGAT5 at cells of samples with FIB (b), but detecting at tumor cells in samples with CDIS (b) and LB (d); (e) negative control for MGAT5 detection; anti-Gal-3 detecting the presence of Gal-3 at tumors cell in samples of FIB (f), DCIS (g) and LB (h); (i) negative control for Gal-3 detection ... 62

Figura 2: Expression of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 according type of lesion..... 62

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1

Tabela 1: Expression of  $\beta$ 3GnT3,  $\beta$ 3GnT2, GalNAc, PolyLacNAc and nuclear PolyLacNAc in normal, premalignant and malignant uterine lesions..... 49

## CAPÍTULO 2

Tabela 1: Clinical and histological data of the study sample. .... 58

Tabela 2: Correlation of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 expression by lesion..... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\beta$ 3GNT -  $\beta$ -1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase

$\beta$ 4GALT -  $\beta$ -1,4-galactosil transferase

Ala - alanina

Asn - asparagina

CEA 125 – antígeno cancerígeno 125

CEA – antígeno carcinoembrionário

CCE – carcinoma de células escamosas

Con A – Concanavalina A

CRD - domínio de reconhecimento de carboidrato (do inglês *carbohydrate recognition domain*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

EGF - fator de crescimento epidermal (do inglês *epidermal growth factor*)

Fuc - fucose

Gal-3 – galectina 3

Gal – galactose

GalNAc – N-acetilgalactosamina

Glc – glicose

GlcA - ácido glucurônico

GlcNAc - N-acetilglicosamina

Gly - glicina

GTs - glicosiltransferases

IdoA - ácido idurônico

kD - kilodalton

LacNAc – lactosamina

LAMPs - glicoproteínas lisossomais associadas à membrana (do inglês *lysosome-associated membrane glycoproteins*)

Man – manose

MEC – matriz extracelular

MGAT5 - N-acetilglucosaminil transferase 5

mRNA – RNA mensageiro

Neu5Ac – ácido 5-N-acetilneuramínico

NIC – neoplasia intraepitelial cervical

PNA - lectina de *Arachis hypogaea*(do inglês *Peanut agglutinin*)

Pro – prolina

PoliLacNAc – poli-N-acetilactosamina

PSA – antígeno específico prostático (do inglês *prostatic specific antigen*)

PWM - Lectina de *Phytolacca americana* (do inglês *Pokeweed lectin*)

RE – retículo endoplasmático

Ser – serina

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformante  $\beta$  (do inglês *transforming growth factor  $\beta$* )

Thr – treonina

Tyr - tirosina

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

Xil - xilose

WGA - Lectina de germe de trigo ( do inglês *Wheat germ agglutinin*)

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
CÂNCER.....	17
CÂNCER DE MAMA .....	20
CÂNCER DE COLO DO ÚTERO .....	21
BIOMARCADORES .....	23
GLICOBIOLOGIA .....	24
GLICOPROTEÍNAS.....	27
MGAT5 .....	30
B3GnTs .....	31
POLILACTOSAMINA.....	33
LECTINAS .....	34
GALECTINAS.....	35
GALECTINA-3.....	37
OBJETIVOS .....	40
GERAL .....	40
ESPECÍFICOS .....	40
REFERÊNCIAS .....	41
CAPÍTULO 1 .....	47
DIFFERENTIAL EXPRESSION PATTERNS OF N-ACETYLGUCOSAMINYL TRANSFERASES AND POLYLACTOSAMINES IN UTERINE LESIONS .....	47
CAPÍTULO 2.....	54
POLYLACTOSAMINE EXPRESSION AND CORRELATION WITH MGAT5 AND GALECTIN-3 IN BREAST TUMOR SAMPLES: A CLINIC PATHOLOGIC STUDY.....	54
CONCLUSÕES GERAIS .....	74

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma das mais sérias e prejudiciais doenças enfrentadas pela humanidade e que pode levar a morte, já que não existe nenhum tratamento robusto descoberto que possa levar a uma cura garantida. Ele é o resultado de danos (mutação) nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), assim a células cancerígenas perdem a funcionalidade normal e ganham a habilidade de se multiplicar indefinidamente (Jurca *et al.* 2016). Nas mulheres, os cinco sítios mais comuns de incidência de câncer são a mama (25,2%), o cólon e o reto (9,2%), o pulmão (8,7%), a cérvix uterina (7,9%) e o estômago (4,8%) (INCA 2015).

Para o Brasil, em 2016, são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mulheres. Este tipo de câncer é o que possui as maiores incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (INCA 2015). Para o câncer de colo uterino, no ano de 2016 no Brasil são esperados 16.340 novos casos, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (INCA 2015).

Uma das áreas de pesquisas do câncer é a busca por biomarcadores que possam detectar a doença em estágios iniciais, evitando-se a progressão e possível metástase (Drake 2015). Mudanças nos glicanos não são só envolvidas funcionalmente nos processos patológicos, mas também podem ser exploradas para distinguir doenças específicas como biomarcadores. Então, para a clínica se apropriar dos conhecimentos básicos em glicobiologia é necessário que se conheça mais profundamente os papéis dos glicanos no câncer e seu potencial terapêutico (Kizuka e Taniguchi 2016).

Atualmente existe um número alto de estudos observando as funções e distribuição de glicanos com polilactosaminas (poliLacNAc), onde suas funções biológicas vêm sendo elucidadas (Mitsui *et al.* 2012). Sabe-se que esse polissacarídeo pode agir como marcador de desenvolvimento, apoptose e metástase ou podem ser modificados por inúmeras glicosiltransferases para criar estruturas ramificadas e apresentar epítomos glicídicos terminais (Qiu *et al.* 2014). As poliLacNAc têm sido objetivo de interesse de várias pesquisas pelo seu papel tanto como ligante direto para galectinas quanto por ser estrutura central para estruturas ligadoras mais complexas (Henion e Schwarting 2014).

Inúmeros estudos, tanto com animais quanto com humanos, têm relatado que a progressão tumoral para um fenótipo metastático está diretamente associada com o aumento dos níveis de ramificações oligossacarídicas  $\beta$ 1,6 (Ni *et al.* 2014). Essa ramificação de  $\beta$ 1,6-N-acetilglicosamina normalmente é modificada posteriormente com um resíduo  $\beta$ 1,4-Galactose para formar uma estrutura lactosamina (LacNAc) que normalmente é sintetizada repetidamente por uma ação sequencial de  $\beta$ -1,3-N-acetilglucosaminil transferase ( $\beta$ 3GnT) e  $\beta$ -1,4-galactosil transferase ( $\beta$ 4GalT) formando uma estrutura de poliLacNAc (Kizuka e Taniguchi 2016).

A N-acetilglicosaminil transferase 5 (MGAT5, GnT-V) é uma enzima que também é conhecida por desempenhar importante papel no crescimento tumoral e metástase e está envolvida na síntese de poliLacNAc (Kimura *et al.* 2012). Ela catalisa a transferência de um resíduo de N-acetilglicosamina (GlcNAc) para a  $\alpha$ 1,6-manose através de uma ligação  $\beta$ 1,6, formando uma estrutura ramificada (Kizuka e Taniguchi 2016). Outra família de enzimas é a família das  $\beta$ 3GnTs, que é envolvida na biossíntese de cadeias de poliLacNAc em glicanos com ramificações  $\beta$ -1,6, onde elas são responsáveis pela transferência da GlcNAc para o terminal não redutor de estruturas tetra-antênrias de N-glicanos (Jiang *et al.* 2014). Atualmente, são conhecidas oito enzimas membros dessa família ( $\beta$ 3GnT1-8), onde cada  $\beta$ 3GnT sintetiza uma estrutura glicídica diferente (Togayachi *et al.* 2010).

Sendo uma das lectinas mais bem estudadas, a galectina-3 é amplamente distribuída entre diferentes espécies e a nível celular, pode ser encontrada nos meios extracelular e intracelular, estando envolvida em diversos processos biológicos, como adesão, ativação, quimioatração, crescimento, diferenciação, participação do ciclo celular e apoptose. Ela pode interagir com inúmeros substratos ligadores, em sua maioria moléculas ricas em poliLacNAc da matriz extra celular (MEC) ou da superfície celular, onde podem desempenhar papéis chaves na modulação extracelular durante a progressão tumoral (Fortuna-Costa *et al.* 2014). Uma enorme gama de ligantes tem sido demonstrada como moléculas para galectina-3, refletindo a multifuncionalidade dessa molécula. (Funasaka *et al.* 2014, Song *et al.* 2014). Desse modo, este trabalho tem por objetivo investigar o possível envolvimento das cadeias de polilactosaminas em tumores humanos de mama e útero correlacionando com a expressão de glicosiltransferases chaves da sua produção, com outros marcadores já amplamente estudados e com os dados clínico-patológicos.

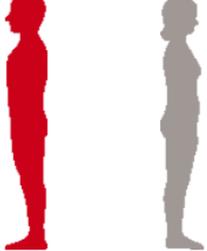
## REVISÃO DA LITERATURA

### CÂNCER

O câncer é atualmente uma das mais sérias e prejudiciais doenças enfrentadas pela humanidade e que pode levar a morte, já que não existe nenhum tratamento robusto descoberto que possa levar a uma cura garantida. Assim, pesquisadores de todo o mundo buscam identificar moléculas (principalmente genes e proteínas) que possam ser manipuladas e utilizadas como biomarcadores no câncer para melhorar e personalizar as estratégias terapêuticas para os pacientes, de modo a prover uma melhor acurácia no diagnóstico (Jurca *et al.* 2016).

De acordo com o *World Cancer Report 2014*, o câncer é um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. Neles, se espera que nas próximas décadas seu impacto corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos para 2025 para todo o mundo. Resultados de pesquisas mostram que em 2012, em todo o mundo, foram estimados 14,1 milhões diagnósticos de novos casos de câncer (excluindo câncer de pele não melanoma) e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Dessa estimativa, mais de 60% dos novos casos e 70% dos óbitos eram esperados em países em desenvolvimento (Stewart 2014).

Nas mulheres, os cinco sítios mais comum de incidência de câncer são a mama (25,2%), o cólon e o reto (9,2%), o pulmão (8,7%), a cérvix uterina (7,9%) e o estômago (4,8%). Esses sítios também representaram as causas mais comuns de mortes por câncer em mulheres, onde a importância do câncer de mama diminuiu para 14,7%, seguido pelo câncer de pulmão (13,8%), a segunda causa mais comum por morte por câncer (Stewart 2014). Para o Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017 aponta para uma ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, onde o perfil epidemiológico aponta para o câncer de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres como sendo os mais frequentes (Figura 1) (INCA 2015).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do útero	16.340	7,9%	
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%	
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do útero	6.950	3,4%	
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%	
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma Fonte: INCA (2015).

O câncer é o resultado de um dano (mutação) nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), assim a células cancerígenas perdem a funcionalidade normal e ganham a habilidade de se multiplicar indefinidamente até que as funções normais do tecido são desabilitadas. Essas mutações podem ocorrer a partir de uma mistura complexa de fatores internos (inerentes ao organismo, como erros na duplicação celular) e externos (meio ambiente, como exposição à radiação ultravioleta) e normalmente ocorrem nos genes de divisão celular. São conhecidos mais de 100 diferentes tipos de câncer, dependendo do tipo celular que é afetado originalmente. Adicionalmente, cada paciente pode vir a ter um conjunto de mutações em vários genes diferentes, o que pode levar a diferentes subtipos deste câncer (Jurca *et al.* 2016). No entanto, a presença de apenas uma alteração na informação genética não é forte o suficiente para levar ao desenvolvimento do câncer, o qual necessita de múltiplas etapas, a partir de uma célula normal, onde é necessário um acúmulo de alterações. Essas, então, vão conferindo vantagens ou habilidades competitivas em relação as células normais e não as desestabilizando, de modo que elas possam escapar as regras que regem a organização do organismo (Hanahan e Weinberg 2011).

O modelo mais aceito atualmente para explicar o processo de carcinogênese é o da iniciação/progressão (Figura 2). De acordo com ele, a primeira etapa deste processo compreende a iniciação, onde uma célula normal, sob o efeito de agentes carcinogênicos, sofre alterações genotípicas. Na próxima fase, chamada de promoção, a célula agora alterada passa a se multiplicar descontroladamente de forma autônoma, levando a formação de um aglomerado de células que terão as mesmas características

(Hanahan e Weinberg 2011). É durante a progressão do tumor que algumas células neoplásicas se tornam capazes de invadir tecidos adjacentes, disseminando através dos vasos linfáticos ou sanguíneos, penetrem a membrana basal e a parede endotelial, extravasando para o parênquima e colonizando em órgãos distantes. Embora se imagine que apenas algumas células do tumor primário sejam capazes de realizar todas essas etapas, esse processo dinâmico e complexo é responsável pela grande maioria das mortes relacionadas ao câncer (Fortuna-Costa *et al.* 2014).

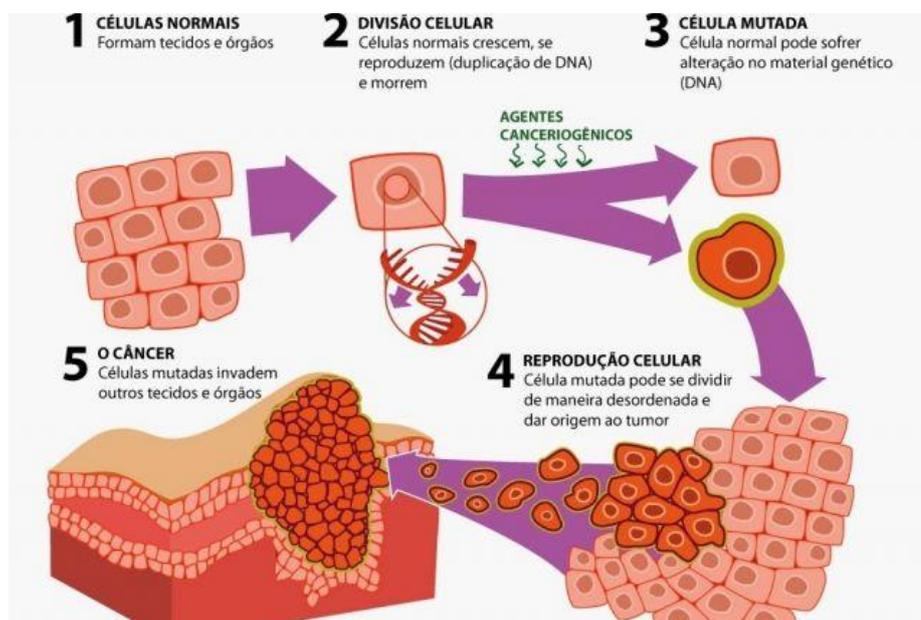


Figura 2: Esquema mostrando as etapas do modelo de iniciação/progressão do câncer. (1) Células normais formam os tecidos e órgãos; (2) em condições normais elas crescem, se reproduzem e morrem; (3) a iniciação do processo começa quando elas sofrerem ação de agentes cancerogênicos elas sofrem alterações (mutação) no DNA; (4) na promoção, elas passam a se dividir descontroladamente, dando origem a um tumor; (5) após isso as células mutadas podem adquirir características novas e começar a invadir tecidos e metastatizar em outros órgãos (Fonte: [https://static.tuasaude.com/img/posts/2015/05/3a270720a1d3506194549f5774d3497d-640\\_427.jpeg](https://static.tuasaude.com/img/posts/2015/05/3a270720a1d3506194549f5774d3497d-640_427.jpeg)).

O processo de metástase (Figura 3) envolve várias etapas, incluindo a proliferação celular do tumor no sítio primário, invasão a tecidos adjacentes, intravasão para vasos linfáticos ou sanguíneos, disseminação através da circulação e proliferação em sítios secundários, ou distantes. Para que ela ocorra, se faz necessária uma expressão coordenada de inúmeros gene de controle de adesão, proteólise e motilidade. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas características são adquiridas são ainda em grande

parte desconhecidos. Entre os inúmeros fatores envolvidos nesse processo, uma crescente quantidade de evidências tem recentemente atribuído importantes papéis, como ligantes de ancoramento, para os carboidratos de superfície celular nessas etapas da metástase (Tsuboi *et al.* 2011).

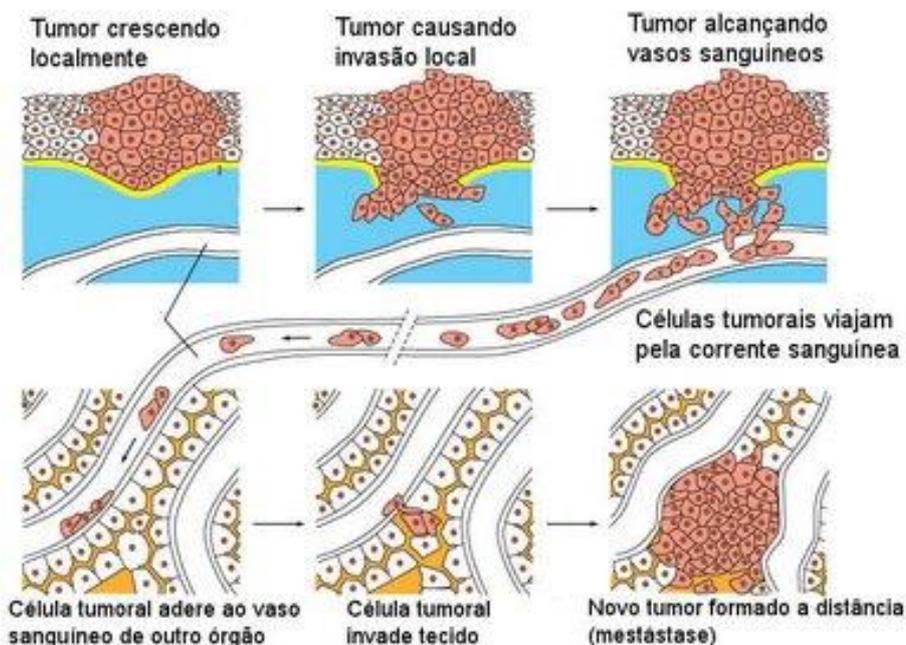


Figura 3: Etapas do processo de metástase. O tumor crescente no tecido primário adquire a habilidade de invadir os tecidos adjacentes e intravasalar para vasos sanguíneos ou linfáticos. Assim, ele se dissemina para outros sítios secundários através da circulação. Ao atingir esses sítios as células extravasam os vasos e se instalam dando início a proliferação descontrolada e formação de um tumor secundário Fonte: <http://www.saudemedicina.com/wp-content/uploads/2014/06/metastase.jpg>

## CÂNCER DE MAMA

Para o Brasil, em 2016, são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mulheres (Figura 1). Este tipo de câncer será, excluindo os tumores de pele não-melanoma, o mais frequente nas regiões Sul (74,30/100mil), Sudeste (68,08/100mil), Centro-Oeste (55,874/100mil) e Nordeste (38,74/100mil) e o segundo na região Norte (22,26/100mil) (INCA 2015). Este tipo de câncer é o que possui as maiores incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Essa alta

mortalidade provavelmente é causada pelo diagnóstico da doença em estágios avançados. Mesmo com os grandes avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento, esse problema continua não resolvido (dos-Santos *et al.* 2014).

Uma detecção precoce do câncer de mama aumenta significativamente em 5 anos a sobrevivência do paciente. Atualmente, o método utilizado para a detecção do câncer de mama é a mamografia. No entanto, existe uma urgência na identificação de biomarcadores para o uso nessa detecção precoce do câncer de mama. Nas últimas décadas, vários estudos em grande escala em proteômica têm sido iniciados para caracterizar o proteoma do câncer de mama. Essa estratégia tem levado a uma rica quantidade de dados e, quanto mais ricos são esses dados, mais difícil prever que proteínas são biomarcadores sensíveis e específicos para essa doença (Abbott *et al.* 2008).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea com relação à clínica e à morfologia. A maioria dos tumores de mama se origina no epitélio ductal (cerca de 80%) e são conhecidos como carcinoma ductal. Entretanto, como o câncer de mama se caracteriza por ser um grupo heterogêneo, existem ainda outros subtipos de carcinomas que podem ser diagnosticados, como o lobular, o tubular, o mucinoso, o medular, o micropapilar e o papilar. Ele também é considerado multifatorial, envolvendo fatores biológico-endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida. Envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, alta densidade de tecido mamário são os mais conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Além desses, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo e exposição à radiação ionizante também são considerados agentes potenciais para o desenvolvimento desse câncer (INCA 2015).

## CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Para o ano de 2016, no Brasil são esperados 16.340 novos casos de câncer do colo do útero (Figura 1), com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Excluindo os tumores de pele não melanoma, ele será o mais incidente na região Norte (23,97/100 mil), o segundo nas regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), o terceiro na região Sudeste (11,30/100 mil) e o quarto na

região Sul (15,17/100 mil). Também é considerado um importante problema de saúde pública (INCA 2015).

Cerca de 70% dos casos diagnosticados de câncer de colo do útero ocorrem em regiões menos desenvolvidas. Sua taxa de incidência vem diminuindo ao longo das últimas três décadas na maioria dos países em transição econômica, reflexo da implementação de programas de prevenção. Além disso, ele também constitui um problema de grande impacto populacional, já que o tumor incide predominantemente em mulheres jovens, em idade fértil e profissionalmente ativas. Ele se divide em duas formas principais: o carcinoma escamoso ou de células escamosas, que se origina do epitélio escamoso; e o adenocarcinoma, que se origina do epitélio colunar. Dentre todas as formas, o carcinoma de células escamosas (CCE) é a mais comum, equivalendo em torno de 90% do total (Dasari *et al.* 2015).

Na metade do século XX, o CCE era a primeira causa de morte por câncer em mulheres de todo o mundo, o que chamou a atenção de vários grupos investigadores. Nos anos seguintes, muitos estudos foram realizados em busca de se conhecer melhor a doença. Atualmente, é uma das neoplasias mais estudada e conhecida, onde são bem estabelecidos os fatores de risco e suas lesões precursoras, no qual o diagnóstico pode ser feito precocemente, o que diminui a mortalidade e a morbidade e aumenta a taxa de cura (Narayan e Lin 2015).

A história do câncer do colo uterino teve um marco quando Papanicolaou & Traut (Papanicolaou e Traut 1997), em 1941, observando amostras citológicas vaginais, demonstraram a existência de células atípicas, sem características de malignidade, mas que classificaram por terem potenciais alterações malignas. Assim houve o início do diagnóstico e o estudo das formas iniciais do câncer de colo uterino, já que até aquele momento só se diagnosticava o câncer clinicamente observado. Vinte anos depois, em 1960, foi criado o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) como referência ao espectro de alterações intraepiteliais iniciais e que culminariam com o câncer. Usando essa nomenclatura, as alterações precursoras do CCE foram divididas em três grupos, denominados NIC grau I, II e III (Narayan e Lin 2015, Tsikouras *et al.* 2016).

## BIOMARCADORES

Uma das áreas de pesquisas do câncer é a busca por biomarcadores que possam detectar a doença em estágios iniciais, evitando-se a progressão e possível metástase. A expressão alterada de glicoconjugados de superfície celular é reconhecida como uma característica comum do câncer, onde eles podem contribuir com o fenótipo maligno em eventos oncogênicos (Drake 2015). Apesar de não haver uma evidência para o papel da glicosilação alterada na iniciação do câncer, e, apesar de informações sobre os mecanismos que geram essa glicosilação anormal ainda sejam limitadas, é bem estabelecido que possam contribuir desde estágios iniciais de invasão a metastatização (Reis *et al.* 2010).

Estudos recentes enfatizam a importância de compreensão da estrutura de hidratos de carbono presentes nos tecidos tumorais por duas necessidades clínicas. No primeiro aspecto, anticorpos contra antígenos glicídicos (ex: antígenos de Lewis) que são associados a tumor, especialmente aqueles secretados no sangue, podem fornecer novos e melhores biomarcadores. Em segundo, glicanos unicamente expressos em células cancerígenas podem fornecer alvos para novas terapias (Adamczyk *et al.* 2012). Além de que muitos biomarcadores usados na clínica, em ensaios de tecido ou de soro, são baseados nessas modificações nos carboidratos, como o antígeno carcinoembrionário (CEA) que é marcador para câncer coloretal, antígeno cancerígeno 125 (CEA-125) para diagnóstico de câncer de ovário e o antígeno prostático específico (PSA) (Mitsui *et al.* 2012).

Grandes avanços recentes foram feitos em várias modalidades terapêuticas. Assim, os marcadores sorológicos tumorais têm aumentado sua importância clínica, por eles serem bastante úteis para o monitoramento da recorrência após cirurgia e para avaliar a efetividade da quimioterapia e radioterapia; embora seu uso seja limitado para o diagnóstico precoce de câncer em estados iniciais. Por isso, há uma necessidade urgente de desenvolver novos marcadores séricos para os cânceres que tenham espectro ainda não acessível pelos marcadores atualmente disponíveis, onde a maioria dos marcadores sorológicos atualmente em uso são epítopos de carboidratos em sua cadeia bioquímica (Kannagi *et al.* 2008, Drake 2015).

## GLICOBIOLOGIA

É de amplo conhecimento que a informação biológica reside nas sequências de DNA e aminoácidos/proteínas. Os oligossacarídeos, ou glicanos, quer presentes na superfície celular ou na matriz extracelular (MEC), também constituem um importante reservatório de informação biológica. Sua capacidade de codificação é muito mais ampla do que as sequências de DNA e de peptídeos, que se deve a diversidade estrutural e conformacional exibidas por suas moléculas (Cardoso *et al.* 2016).

Se comparados diretamente aos oligonucleotídeos e aos peptídeos, em termos de capacidade de codificação, a quantidade de isômeros de oligossacarídeos construídos a partir de um grupo de monossacarídeos é de várias ordens de magnitude maior (4096 oligonucleotídeos,  $6.4 \times 10^6$  peptídeos e  $1.44 \times 10^{15}$  sacarídeos). Além disto, diferentes configurações anoméricas ( $\alpha/\beta$ ), ligações com diferentes posições (1→1,2,3,4, 6 para a hexopirranose, por exemplo), diferença no tamanho do anel (piranose, furanose), além da inserção de ramificação e substituições sítio específicas, como a fosforilação, acetilação ou sulfatação podem aumentar grandemente a diversidade estrutural. Isto faz com que os carboidratos sejam moléculas ideais para a geração de unidades compactas com alta capacidade informativa (Gabiús *et al.* 2011).

Assim, os glicanos constituem o grupo mais complexo e abundante de moléculas nos organismos vivos. Por um lado, eles têm um importante papel no armazenamento e suprimento energético, mas eles também servem como precursores essenciais biossintéticos ou elementos estruturais que sustentam todas as formas de vida. Glicanos complexos são frequentemente ligados a proteínas, formando glicoproteínas e proteoglicanos, ou a lipídeos, formando glicoesfingolipídeos ou glicosilfosfatidilinositol (Figura 4) (Vasconcelos-dos-Santos *et al.* 2015).

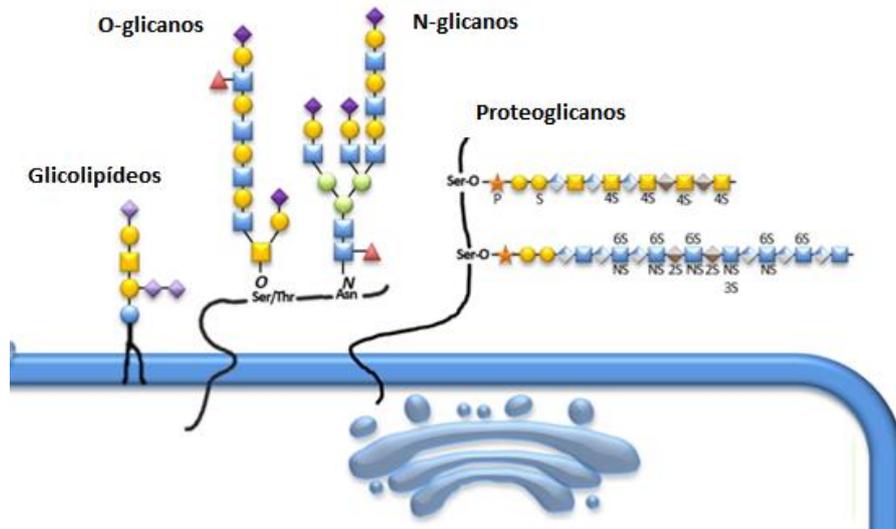


Figura 4: Algumas das diferentes formas de existência dos glicoconjugados (glicolipídeos, glicoproteínas O- ou N-ligados, proteoglicanos, entre outros) presentes na membrana celular ou na matriz extracelular (MEC). Figura adaptada de Vasconcelos-dos-Santos *et al.* (2015).

A maioria desses glicoconjugados é expressa na superfície celular, onde eles formam uma fina camada conhecida como glicocálix. Eles também podem ser secretados para o meio extracelular com o objetivo de serem incorporados a MEC. Tal localização coloca os glicoconjugados com papéis importantes nas interações célula-célula e na motilidade. Eles estão envolvidos em inúmeros processos biológicos chaves, incluindo adesão celular, migração, crescimento, diferenciação, transdução de sinais, ativação de receptores, modulação da resposta imune, controle de qualidade do dobramento de proteínas e interações patógeno-hospedeiro (Vasconcelos-dos-Santos *et al.* 2015).

As estruturas dos glicanos não são dependentes unicamente dos genes, mas também da atividade de glicosiltransferases (GTs) e glicosidases e da disponibilidade de substratos doadores localizados nos locais necessários (Vasconcelos-dos-Santos *et al.* 2015). Observando do ponto de vista genético, em torno de 250 a 500 genes são responsáveis pela síntese das cadeias de glicanos, os glicogenes. Eles, através de seus produtos, formarão a maquinaria necessária para a síntese, esta que é composta principalmente pelas GTs. Elas são agrupadas baseadas em suas similaridades em sua sequência, o que reflete sua atividade enzimática, doador específico, receptor específico e o tipo de ligação específica formada entre o doador e o receptor (Gabiús *et al.* 2011).

As GTs são encontradas na membrana do retículo endoplasmático (RE) e aparato de Golgi, citoplasma, superfícies celulares e fluídos corpóreos. Na presença de seu apropriado doador de açúcar, elas realizam a biossíntese de glicoconjugados (Seko e Yamashita 2008). Já que as GTs sintetizam as cadeias através de uma glicosilação terminal, sua maioria é representada tipicamente por proteínas integrais de membrana do tipo 2 (Figura 5) e são residentes no aparato de Golgi. Elas apresentam um domínio catalítico na região C-terminal, uma região transmembranas, com o qual são ancoradas na membrana do aparato de Golgi, e uma região N-terminal (Maccioni *et al.* 2011).

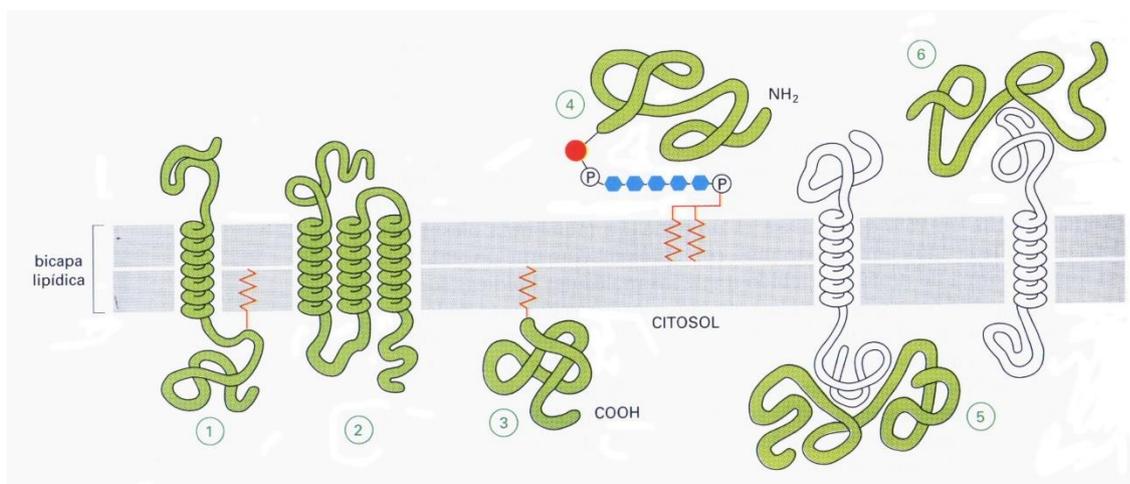


Figura 5: Tipos de proteínas transmembrana existentes na bicamada lipídica. (1) proteína  $\alpha$ -hélice simples; (2) múltiplas  $\alpha$ -hélices; (3) ancorado por ligação covalente a um lipídeo; (4) ligadas a fosfatidilinositol da monocamada citosólica; (5 e 6) ligadas por interações covalentes à outras proteínas. As glicosiltransferases se apresentam em sua maioria como proteínas do tipo 2, contendo um região C-terminal com seu domínio catalítico voltado para o interior do aparato de Golgi, uma região transmembrana composta por várias  $\alpha$ -hélices e uma região N-terminal citosólica. Fonte: <http://classroom.orange.com/pt/000250197.jpg>.

Essa maquinaria de glicosilação celular é frequentemente afetada pelo desenvolvimento e por doenças, incluindo o câncer, o que leva ao aparecimento de mudanças específicas no glicoma (Kizuka e Taniguchi 2016). Essas alterações no perfil de glicosilação de células tumorais são normalmente atribuídas a desregulação da expressão de genes das glicosiltransferases, levando assim a síntese de glicanos alterada. Inúmeros estudos têm demonstrado que a glicosilação orchestra importantes características em diversos processos patológicos, principalmente no desenvolvimento e/ou progressão do câncer. A primeira demonstração de que células tumorais expressavam glicanos alterados veio de estudos mostrando que anticorpos monoclonais

poderiam reconhecer também estruturas anormais. Muitas dessas alterações são acompanhadas pela expressão de antígenos oncofetais nas glicoproteínas e glicolípídeos tumorais. Posteriormente, foi estabelecido que essas modificações nas estruturas dos glicanos poderiam contribuir nos estágios iniciais da invasão (Nardy *et al.* 2016).

Essas mudanças nos glicanos não são só envolvidas funcionalmente nos processos patológicos, mas também podem ser explorados como biomarcadores para distinguir doenças específicas. Entretanto, observando biomarcadores e terapias para câncer, apenas um pequeno número de marcadores com alvos glicídicos ou glicofomas específicas são utilizados corriqueiramente na clínica. Então, para a clínica se apropriar dos conhecimentos básicos em glicobiologia é necessário que se conheça mais profundamente os papéis dos glicanos no câncer e seu potencial terapêutico (Kizuka e Taniguchi 2016).

## GLICOPROTEÍNAS

A glicosilação de proteínas, a mais abundante modificação pós-traducional, é profundamente envolvida na homeostase de células e organismos (Kizuka e Taniguchi 2016). Ela é o reflexo de um arranjo complexo de enzimas coordenadas, organelas e outros fatores que são necessários para gerar modificações pós-traducionais eficientes associadas aos carboidratos. Essas modificações se dão por uma adição covalente de resíduos de carboidratos, podendo ocorrer teoricamente em todas as proteínas das células dos mamíferos, onde representam um mecanismo orquestrado de expansão da informação linear no DNA para o grande panorama das estruturas tridimensionais (Stowell *et al.* 2015).

Este processo representa um conjunto de modificações que segue adições enzimáticas de açúcares envolvendo ligações a monossacarídeos, ou até mesmo a glicanos, de uma maneira pré-estabelecida em específicos aminoácidos. Pelo menos 9 dos 20 aminoácidos podem ser modificados por uma variedade de carboidratos, desde um único monossacarídeo até cadeias de glicanos contendo centenas de monossacarídeos. Nos mamíferos, a maioria dos glicanos é composta de 10 principais unidades monossacarídicas: glicose (Glc), galactose (Gal), N-acetilglicosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucose (Fuc), manose (Man), xilose (Xil), ácido glucurônico (GlcA), ácido idurônico (IdoA) e ácido 5-N-acetilneuramínico

(Neu5Ac ou ácido siálico); todos derivados da glicose em qualquer célula. Assim, a glicosilação é comparável a fosforilação em termos de escala de sítios de modificação e certamente excede-a em termos de complexidade de modificações (Stowell *et al.* 2015).

Existem dois tipos básicos de glicosilação em proteínas, a N- e a O-glicosilação, que têm diferenças significantes na sua biossíntese e estrutura, assim como sua localização dentro da cadeia peptídica (Figura 6). Nos N-glicanos, o átomo de nitrogênio da asparagina (Asn) da cadeia é ligado a uma GlcNAc. Já em O-glicanos, o átomo de oxigênio da uma serina (Ser) ou treonina (Thr) é ligado a GlcNAc. Posteriormente esses glicopeptídeos podem ser alongados pela atividade de inúmeras e específicas enzimas (Nardy *et al.* 2016).

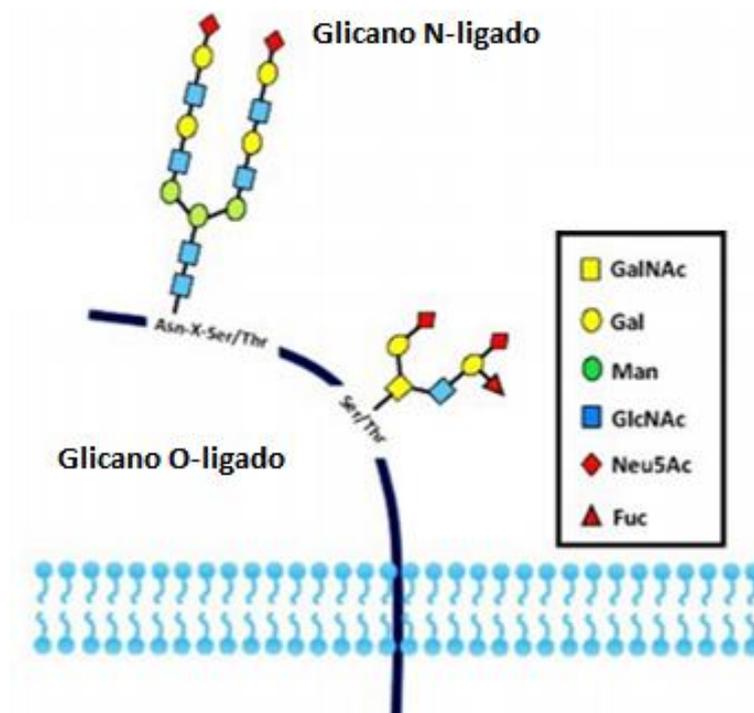


Figura 6: Os dois tipos básicos de glicosilação em proteínas. A ligação das unidades de açúcar a proteínas é uma modificação pós-traducional que permite uma maior diversidade as proteínas. A glicosilação de N-ligantes ocorre a resíduos de asparagina da proteína, enquanto a de O-ligantes ocorre através de serina ou treonina. Figura adaptada de Nardy *et al.* (2016).

A grande maioria das proteínas secretadas e de superfície celular são modificadas no processo de co- ou pós-tradução pela adição de carboidratos no RE. Enquanto essas proteínas transitam pelo RE e pelo aparato de Golgi, esses glicanos são remodelados dramaticamente, gerando um vasto e heterogêneo arranjo de glicofomas.

Na parte medial de Golgi um grupo de enzimas, entre elas a N-acetilglicosaminil transferase V (MGAT5), age de forma a produzir N-glicanos com um, dois, três ou quatro ramificações GlcNAc. Uma adição subsequente de Gal pela família de enzimas das galactosil transferases ( $\beta$ GalTs) produz um substrato reconhecido por galectinas, a N-acetillactosamina (LacNAc). O número dessas ramificações depende da atividade relativa dessas enzimas ramificadoras na cisterna média do Aparato de Golgi e da disponibilidade de seus substratos doadores de açúcar. A ação alternada de enzimas das famílias das  $\beta$ 1,3-N-acetil glicosaminil transferases (B3GNT) e das  $\beta$ GalTs pode gerar um polímero linear de LacNAc, a poli-N-acetillactosamina (poliLacNAc) em qualquer uma das ramificações (Mkhikian *et al.* 2016).

Visto a complexidade da glicosilação em proteínas e seu impacto fundamental em uma diversa escala de processos biológicos, não é surpresa que aparentemente pequenas alterações na estrutura de carboidratos possam significativamente impactar na biologia de uma célula (Stowell *et al.* 2015). Mudanças na glicosilação, principalmente de glicoproteínas de superfície celular, são observadas durante o desenvolvimento embrionário, diferenciação ou ativação celular (Kinoshita *et al.* 2014, Ni *et al.* 2014). Além disso, as mudanças na glicosilação também são associadas ao desenvolvimento de várias doenças humanas, como a carcinogênese, onde desempenham um importante papel durante a invasão e metástase (Kimura *et al.* 2012, Mitsui *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2014). Entender os mecanismos e as consequências de variações na glicosilação associadas ao câncer podem prover importantes descobertas na progressão neoplásica, Já que mudanças no ambiente celular e alterações na glicosilação de proteínas acompanham a transformação neoplásica, (Stowell *et al.* 2015).

No microambiente tumoral, que é caracterizado por um perfil de glicosilação anormal, encontram-se glicanos que são sub ou super-expressos ou há a presença de novas estruturas de carboidratos. Essas alterações se devem em sua maioria a mudanças nos níveis de expressão das glicosiltransferases no Aparato de Golgi das células tumorais. Muitas evidências apontam para um aumento do tamanho e da ramificação de glicanos N-ligados como uma marca de alguns tipos de câncer. Essa mudança é normalmente atribuída a um aumento da atividade ou expressão da MGAT5 (Fortuna-Costa *et al.* 2014).

## MGAT5

A N-acetilglicosaminil transferase 5 (MGAT5, GnT-V) é uma GT codificada pelo gene *Magt5* conhecida por desempenhar importante papel no crescimento tumoral e metástase (Kimura *et al.* 2012). Ela catalisa a transferência de um resíduo de GlcNAc para a  $\alpha$ 1,6-manose através de uma ligação  $\beta$ 1,6 de modo a formar uma estrutura ramificada. Vários estudos tem revelado que níveis de micro RNA (mRNA) de MGAT5 e de seu produto são aberrantemente super-expressos em células cancerígenas, e que essa ramificação  $\beta$ 1,6 é altamente envolvida com o crescimento e metástase no câncer (Kizuka e Taniguchi 2016).

Essa ramificação de  $\beta$ 1,6-GlcNAc normalmente é modificada posteriormente com um resíduo  $\beta$ 1,4-Gal para formar uma estrutura LacNAc que normalmente é sintetizada repetidamente por uma ação sequencial de  $\beta$ 3GnT e  $\beta$ 4GalT formando uma estrutura de poliLacNAc (Kizuka e Taniguchi 2016). A atividade da MGAT5, então, regula indiretamente a quantidade de polilactosaminas em oligossacarídeos N-ligados, pois limita a velocidade de sua síntese, e atua como um marcador para os níveis de ramificações  $\beta$ 1,6 existentes (Kinoshita *et al.* 2014).

Inúmeros estudos, tanto com animais quanto com humanos, têm relatado que a progressão tumoral para um fenótipo metastático é diretamente associada ao aumento dos níveis de ramificações oligossacarídicas  $\beta$ 1,6. Ou seja, a expressão elevada de MGAT5 em células cancerígenas aumenta a presença de N-glicanos carregadores de poliLacNAc, que são estruturas chaves associadas com metástase tumoral e transformação maligna (Ni *et al.* 2014).

Entre esses estudos, foi observado que células tumorais deficientes de MGAT5 tem 20 vezes menos capacidade metastática e formação de adesão local prejudicada. Além disso, a glicosilação dependente de MGAT5 regula a motilidade de células metastáticas tumorais em ratos. Resumidamente, a associação entre a expressão de oligossacarídeos N-ligados, particularmente ramificações  $\beta$ 1,6, e potencial metastático tem sido relatada (Chakraborty e Pawelek 2003).

Os mecanismos pelos quais ramificações  $\beta$ 1,6-GlcNAc são correlacionadas a metástases pode permitir a identificação de glicoproteínas específicas que são glicosiladas pela MGAT5 e a caracterização de suas funções biológicas correlacionando com a cascata metastática. No entanto, nem o significado funcional do aumento de

ramificações de oligossacarídeos  $\beta$ 1,6 nem a identidade das glicoproteínas com estas estruturas, em relação ao câncer, são ainda bem estabelecidas (Chakraborty e Pawelek 2003).

## $\beta$ 3GnTs

Sabe-se que a família das  $\beta$ 3GnTs é envolvida na biossíntese de cadeias de poliLacNAc em glicanos com ramificações  $\beta$ -1,6, onde elas são responsáveis pela transferência da GlcNAc para o terminal não redutor de estruturas tetra-antênrias de N-glicanos. No início do século XXI, uma  $\beta$ 3GnT, designada  $\beta$ 3GnT1, foi isolada baseada em sua similaridade estrutural com a família das  $\beta$ 1,3-galactosil transferases ( $\beta$ 3GalTs). Ela mostrou uma significância média de similaridade com as  $\beta$ 3GalTs de 15 a 19% e compartilha estruturas conservadas comparada com as  $\beta$ 3GalTs (Jiang *et al.* 2014). No entanto, ela exibiu uma atividade de  $\beta$ 1,3-N-acetilglucosaminil transferase ao invés de atividade  $\beta$ 1,3-galactosil transferase. Assim, a  $\beta$ 3GnT1, comparada a família  $\beta$ 3GalT, usa um distinto substrato doador (GlcNAc contra Gal) e também receptor (Gal contra GlcNAc), mas mantendo o mesmo tipo de ligação específica (ligação  $\beta$ 1,3) (Shiraishi *et al.* 2001).

Atualmente, são conhecidas oito enzimas membros dessa família ( $\beta$ 3GnT1-8), onde cada  $\beta$ 3GnT sintetiza uma estrutura glicídica diferente (Togayachi *et al.* 2010). Experimentos têm demonstrado que cada uma das enzimas é capaz de catalisar a iniciação e alongamento das cadeias de poliLacNAc, entretanto elas exibem especificidade a diferentes substratos dependendo do comprimento da cadeia. Cada enzima tenha talvez, então, papel distinto em processos fisiológicos diferentes (Ishida *et al.* 2005). Experimentos de transfecção e de análise enzimática *in vitro* demonstraram que a  $\beta$ 3GnT2 e a  $\beta$ 3GnT3 são capazes de catalisar a iniciação e o alongamento de cadeias de açúcar de poliLacNAc, sendo que  $\beta$ 3GnT2 é a maior responsável pelo alongamento dessas cadeias. Entretanto, elas exibem diferente especificidade de substrato. Adicionando a esses dados a diferente distribuição dessas enzimas ao longo dos tecidos, é provável que cada uma exerça papéis distintos em processos fisiológicos e patológicos (Togayachi *et al.* 2007, Liu *et al.* 2014).

Atividade de  $\beta$ 3GnTs são detectadas em vários tecidos, células e soro.  $\beta$ 3GnT2 é expressa ubiquamente nos tecidos e células, tendo diferentes níveis de expressão em

diferentes tecidos e sendo preferencialmente expressa no cólon, próstata e cérebro. Já a  $\beta 3\text{GnT}3$  é relativamente restrita a alguns tecidos, como cólon, jejuno, estômago (corpo e antro), esôfago, placenta e traqueia (Seko e Yamashita 2008).

A  $\beta 3\text{GnT}2$  se mostra como um tipo de proteína transmembrana do tipo 2, tipicamente como a maioria das GTs. Assim, é previsto que a  $\beta 3\text{GnT}2$  consista de um domínio N-terminal citoplasmático de 9 resíduos de aminoácidos, um seguimento transmembrana de 19 resíduos e uma região de tronco e domínio catalítico de 369 resíduos. Como a  $\beta 3\text{GnT}2$ , a  $\beta 3\text{GnT}3$  também se apresenta como uma proteína transmembrana do tipo 2 e se prevê que ela possua um domínio N-terminal citoplasmático de 11 resíduos de aminoácidos, um seguimento transmembrana de 21 resíduos e uma região de tronco e domínio catalítico de 340 resíduos (Shiraishi *et al.* 2001).

$\beta 3\text{GnT}2$ , dentro da família das  $\beta 3\text{GnTs}$ , é a que tem a maior atividade específica para a síntese de cadeias poliLacNAcs, quando glicanos tetra-antênarios N-ligados são usados como substrato (Shimma *et al.* 2006, Seko e Yamashita 2008). Resultados de experimentos anteriores demonstraram que a T-2 é mais ativa em substratos de polilactosaminas contendo de 2 a 5 repetições de LacNAc (Ishida *et al.* 2005). Além disso, mesmo sendo os glicanos tetraantênarios o melhor substrato, ela pode também agir eficientemente em glicanos tri, bi e monoantênarios N-ligados (Seko e Yamashita 2008).

A  $\beta 3\text{GnT}2$  apresenta de 19 a 24% de identidade comparando com a família das  $\beta 3\text{GalT}$  e 15% quando comparada a  $\beta 3\text{GnT}1$ . Já a  $\beta 3\text{GnT}3$  apresenta de 22 a 26% de identidade com a família das  $\beta 3\text{GalT}$  e 18% com a  $\beta 3\text{GnT}1$ . Quando comparadas entre si, essa identidade sobe para 40-45%. Essas sequências de semelhança se limitam à possível região catalítica, onde vinte e cinco resíduos de aminoácidos localizados separadamente nessa possível região catalítica são idênticos entre todas as proteínas (Shiraishi *et al.* 2001).

Três resíduos de cisteína conservados na família  $\beta 3\text{GalT}$  são mantidos nas  $\beta 3\text{GnT}2$  e  $\beta 3\text{GnT}3$ , sendo dois deles ausentes na  $\beta 3\text{GnT}1$ , indicando assim o porquê ela ser um membro mais distinto da família  $\beta 3\text{GnT}$ , especialmente no contexto estrutural tridimensional. Com relação aos potenciais sítios de N-glicosilação, existem cinco na  $\beta 3\text{GnT}2$  e três na  $\beta 3\text{GnT}3$ . A árvore filogenética, destas proteínas, gerada usando a sequência de amino ácidos da possível região catalítica demonstra que  $\beta 3\text{GnT}2$  e

$\beta$ 3GnT3 participam do mesmo subgrupo, indicando que elas possuem uma atividade enzimática similar (Shiraishi *et al.* 2001).

Devido a sua alta atividade, a  $\beta$ 3GnT2 é uma forte candidata para atuar na síntese de poliLacNAc *in vivo* (Togayachi *et al.* 2007). Então, pensa-se que a  $\beta$ 3GnT2 é uma enzima essencial para a biossíntese de poliLacNAcs em N-glicanos, assim como também a  $\beta$ 3GnT3 (Shimma *et al.* 2006, Togayachi *et al.* 2007).

## POLILACTOSAMINA

A poli-N-acetilactosamina (poliLacNAc) é um polímero linear de carboidrato composto por repetições de unidades de LacNAc, que se caracterizam pela presença resíduos de Gal e GlcNAc alternados  $(\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3})_n$  (Figura 7). Ele é biosintetizado pela adição alternada de GlcNAc mediada por uma  $\beta$ -1,3-N-acetilglicosaminil transferase (B3GNT), e de Gal mediada por uma  $\beta$ GlcNAc  $\beta$ -1,4-galactosil transferase (B4GALT). Essas duas famílias de enzimas, B3GNT e B4GALT, são expressas em vários tecidos humanos, tendo seus níveis de expressão variando dentre diferentes tipos de tecidos (Togayachi *et al.* 2010).

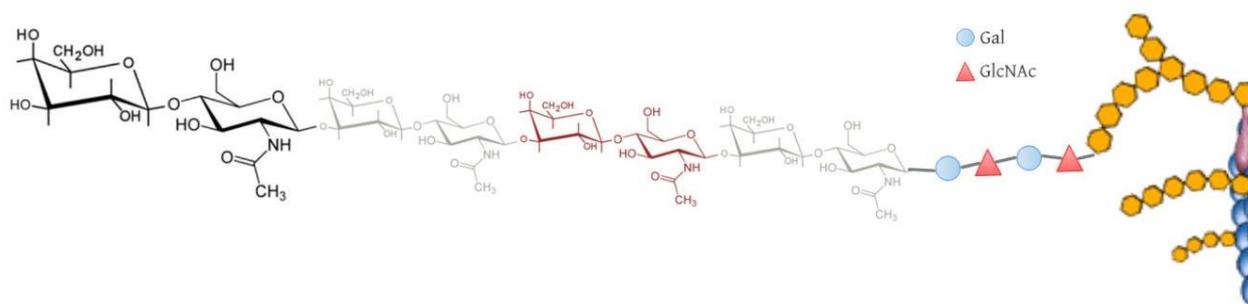


Figura 7: Estrutura da poli-N-acetilactosamina, um polímero linear composto por repetições de N-acetilactosamina. Os resíduos de galactose e N-acetil glicosamina são ligados por ação de duas famílias de enzimas das glicosiltransferases, a  $\beta$ 3GNTs e  $\beta$ 4GALT.

As poliLacNAc estão presentes tanto em N- quanto em O-glicanos em glicoproteínas, mas se apresentam preferencialmente ligados a ramificações  $\beta$ 1-6 de GlcNAc que são conectadas a oligossacarídeos complexos N-ligados (Gao *et al.* 2014). Elas são presentes em diferentes tipos celulares ou estágios de diferenciação, onde sua

estrutura é considerada um componente integral que serve como estrutura central para outras estruturas de carboidratos, que podem ser modificadas pela adição de diferentes antígenos de carboidratos, carregando esses epítomos com inúmeras funções biológicas (Jiang *et al.* 2014).

Atualmente existe um número alto de estudos observando as funções e distribuição de glicanos com poliLacNAc, onde suas funções biológicas vêm sendo elucidadas (Mitsui *et al.* 2012). Sabe-se que esse polissacarídeo pode agir como marcador de desenvolvimento, apoptose e metástase ou podem ser modificados por inúmeras glicosiltransferases para criar estruturas ramificadas e apresentar epítomos glicídicos terminais (Qiu *et al.* 2014). Em N-glicanos ela também é um fator regulador da resposta imune que suprime a resposta excessiva durante reações imunológicas (Ishida *et al.* 2005, Liu *et al.* 2014), pois comprimento da cadeia de polilactosamina é um importante fator na resposta imune (Togayachi *et al.* 2007).

As poliLacNAc têm sido objetivo de estudo de várias pesquisas pelo seu papel tanto como ligador direto para galectinas quanto por se estrutura central para estruturas ligadoras mais complexas (Henion e Schwarting 2014). Existe um aumento nas evidências que demonstram a associação das cadeias de poliLacNAc com o câncer. A maioria dessas associações entre o aumento da expressão de poliLacNAc e câncer ocorre através da ligação desses oligossacarídeos a galectinas (Vasconcelos-dos-Santos *et al.* 2015).

Em metástases de diferentes tipos de câncer, elas são conhecidas por serem estruturas que desempenham papéis importantes na interação célula-célula, célula-matriz extracelular, que afetam a proliferação celular, a resposta imune é determinante da capacidade metastática. Sua expressão elevada em amostras está associada a metástase das células tumorais e ao bloqueio de sua biossíntese inibe o aumento dessa habilidade metastática, pois foi demonstrado que células com alta capacidade de metastatizar expressam mais cadeias de poliLacNAc que células com baixo potencial metastático (Togayachi *et al.* 2007).

## LECTINAS

As lectinas (derivado do grego *legere*) compõe uma classe de proteínas, com origem não imunológica, que se ligam não covalentemente e reversivelmente à

carboidratos através de ligações do tipo pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas ou ligações hidrofóbicas. Além disso, são expressas amplamente na natureza, sendo presentes em diversos organismos, desde em bactérias até em plantas e mamíferos (Sharon 2008).

A primeira descrição sobre lectinas é relacionada à Stillmark em 1888, durante a sua tese de doutorado. Porém em 1936, Summer e Howell descreveram uma proteína, chamada posteriormente de Concanavalina A (Con A), que tinha capacidade de aglutinar eritrócitos e leveduras e de precipitar glicogênio. Também foi demonstrado que essa habilidade de aglutinar era neutralizada por sacarose, mostrando assim a especificidade dessa molécula. No entanto, foi só em 1954 que Boyd utilizou o termo lectina para caracterizar estas proteínas, onde foi utilizado para classificar todas as aglutininas açúcar específicas de origem não imune, independente da sua fonte (Guo *et al.* 2008).

Durante as últimas décadas houve um aumento no interesse pelo estudo das lectinas já que elas têm se mostrado como importantes ferramentas para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (Monzo *et al.* 2007, Sadik e Yan 2007) além da análise de superfícies celulares para avaliação das alterações que ocorrem na expressão dos carboidratos em diversos momentos, como a embriogênese, crescimento e doença (da Silva *et al.* 2014, Rego *et al.* 2014, Rego *et al.* 2014, do Nascimento *et al.* 2015). A mudança na expressão das cadeias de carboidratos em antígenos associados ao câncer levou à utilização de lectinas para detectar mudanças no perfil de glicosilação dos glicoconjugados associados à tumores (Chandrasekaran *et al.* 2006).

## GALECTINAS

Dentro das superfamílias de lectinas, as galectinas constituem uma família de lectinas animais que são conhecidas por mediar inúmeros processos como adesão, migração sobrevivência, morte e diferenciação. As galectinas são um grupo de proteínas expressas em todos os organismos e são caracterizadas por se ligarem a glicoconjugados contendo  $\beta$ -galactose, por dividirem uma homologia estrutural primária em seus domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs), por não precisarem de um cátion divalente para a formação da ligação, por compartilharem uma estrutura primária

comum e uma estrutura de dobramento única (Viguier *et al.* 2014). Baseado em sua caracterização molecular, as galectinas são definidas pela presença de um DRC de aproximadamente 130 aminoácidos contendo uma sequência conservada responsável por fazer o contato com os ligantes  $\beta$ -galactosídeos (Argüeso *et al.* 2015).

Elas são chamadas e numeradas cronologicamente por ordem de descoberta, e, até o momento, 15 diferentes galectinas são encontradas nos mamíferos. Sua classificação é feita em três grupos de acordo com sua estrutura (número e organização de seus DRCs): protótipo, quimera e repetições em *tandem*. As galectinas protótipo (galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15) contém um único DRC que pode se associar formando homodímeros; as galectinas quiméricas, da qual apenas a galectina-3 é a única conhecida encontrada nos vertebrados, contém um único DRC e um grande domínio amino-terminal que contribui para sua auto-agregação; e as galectinas repetição em *tandem* (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) contém dois DRC dentro de um único polipeptídeo (Viguier *et al.* 2014, Cardoso *et al.* 2016).

Embora as galectinas compartilhem uma afinidade comum por galactose, diferenças importantes em sua preferência de ligação a glicanos é observada entre os diferentes membros dessa família. Cada galectina reconhece diferentes tipos de glicanos de uma complexa maneira que depende do estado de multivalência e oligomérico das galectinas, da multivalência de seus ligadores glicoconjugados e do modo de apresentação desses glicanos (Viguier *et al.* 2014, Argüeso *et al.* 2015).

Enquanto a maioria das galectinas em mamíferos ligam-se preferencialmente a glicoproteínas contendo ubíquos dissacarídeos de LacNAC, ligações à individuais unidades de LacNAC tem baixa afinidade enquanto o arranjo de dissacarídeos de LacNAC em cadeias repetidas (poliLacNAC) aumentam a força da ligação. Ainda mais, análises estruturais detalhadas dos sítios de ligação a carboidratos sugerem diferenças sutis nas especificidades na ligação a carboidratos nos diferentes membros a famílias das galectinas (Rapoport e Bovin 2015, Thijssen *et al.* 2015).

As galectinas podem ser encontradas em inúmeros tipos de células e tecidos no meio intracelular (núcleo, mitocôndria e citoplasma) e no extracelular (superfície celular e matriz extracelular), onde ela modula uma variedade de funções biológicas. Funções relacionadas com sua localização intracelular têm sido documentadas, incluindo modulação do crescimento celular e apoptose. Galectinas também mediam a transdução de sinais que ocorrem da superfície celular de uma enorme variedade de processos extracelulares

como adesão e migração celular. Além disso, tem ficado mais claro que membros da classe de proteínas galectinas ligadores de  $\beta$ -galectosídeos desempenham papéis críticos na progressão tumoral (Argüeso *et al.* 2015).

## GALECTINA-3

A galectina-3 é uma proteína entre 28 e 30 kD identificada perto dos anos de 1980 na superfície de macrófagos murinos. Como membro do grupo das galectinas do tipo quimera, ela tem apenas um único domínio DRC de aproximadamente 130 aminoácidos na sua região C-terminal, uma região N-terminal com 110 a 130 aminoácidos com 7 a 14 repetições de uma sequência de aminoácidos rica em prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala) e tirosina (Tyr), algumas vezes conhecida como um domínio parecido com colágeno (Figura 8) (Argüeso *et al.* 2015).

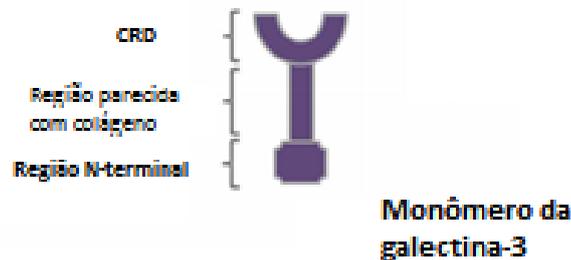


Figura 8: Figura esquemática representando um monômero da galectina-3, mostrando seu domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) na região C-terminal, o domínio central parecido como colágeno e o domínio N-terminal (Fonte: adaptada de Fortuna-Costa *et al.* (2014)).

Hoje a galectina-3 é uma das lectinas mais bem estudadas. Ela é amplamente distribuída entre diferentes espécies e a nível celular, podendo ser encontrada nos meios extracelular e intracelular (Fortuna-Costa *et al.* 2014). Além disso, a galectina-3 participa de inúmeros processos biológicos importantes como adesão, ativação, quimioatração, crescimento, diferenciação, participação do ciclo celular e apoptose no citoplasma e núcleo, onde não há com frequência ligante carboidrato cognato para a galectina-3 (Cardoso *et al.* 2016).

Ela se encontra normalmente no citosol, mas também se faz presente em outros compartimentos (membrana, núcleo e mitocôndria). Em geral, as galectinas não possuem um peptídeo sinal que as endereçam diretamente para a via clássica de secreção; mesmo assim, a galectina-3 tem sido encontrada no ambiente extracelular. Uma vez nesse ambiente, ela pode interagir com inúmeros substratos ligadores, em sua maioria moléculas ricas em poliLacNAc da MEC ou da superfície celular, onde podem desempenhar papéis-chaves na modulação extracelular durante a progressão tumoral (Fortuna-Costa *et al.* 2014). Estudos de sua atividade e especificidade de ligação a carboidratos demonstraram que a LacNAc é o ligante preferencial da galectina-3, no entanto outras estruturas contendo galactose também podem ser acomodadas no seu CRD (Argüeso *et al.* 2015).

Embora a expressão de galectina-3 ocorra em uma variedade de tipos celulares e seja envolvida em diversos processos biológicos, ela tem despertado interesse devido ao seu papel regulador e variadas atividades nas células cancerígenas. De fato, a galectina-3 normalmente é super-expressa em vários tumores sólidos ou líquidos humanos e, em muitos casos, essa expressão alterada é correlacionada com o estágio da progressão tumoral, sugerindo uma influência dessa molécula no prognóstico da doença (Fortuna-Costa *et al.* 2014).

Existem inúmeras linhas de evidências apontando a importância da galectina-3 em transformações celulares malignas, crescimento tumoral, resistência à *anoikis*, inibição da apoptose, angiogênese, adesão celular, motilidade celular e invasão celular. Podemos destacar entre eles os últimos quatro processos, que fazem do processo metastático, onde a galectina-3 no meio extracelular desempenha um proeminente papel tanto nas células tumorais quanto nas células estromais presentes no microambiente tumoral. Ao nível molecular, os processos de invasão e metástase envolvem mudanças em várias classes de proteínas relacionadas com a adesão célula-célula e célula-matriz, assim como de vias de sinalização que controlam a dinâmica do citoesqueleto. A galectina-3 extracelular é vista como contribuinte para esse processo e talvez tenha relevância na cascata de invasão e metástase (Fortuna-Costa *et al.* 2014).

A galectina-3 tem alta afinidade por ramificações de  $\beta$ 1,6-N-acetilglicosamina em glicanos. Essa interação é responsável pela ligação de lectinas a várias glicoproteínas e glicolípídeos na superfície celular, incluindo o antígeno carcinoembrionário (CEA), mucina do tipo 1, glicoproteínas lisossomais associadas à

membrana 1 e 2 (LAMPs) e a receptores transmembrana do tipo tirosino-quinase do fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros. Mudanças relacionadas ao MGAT5 na glicosilação em proteínas ou lipídeos e de densidade da superfície celular levam a alterações no agrupamento dessas proteínas de membrana, resultando em vantagens funcionais para as células tumorais (Fortuna-Costa *et al.* 2014).

Uma enorme gama de ligantes tem sido demonstrada como ligantes para galectina-3, refletindo a multifuncionalidade dessa molécula. (Funasaka *et al.* 2014, Song *et al.* 2014). Desse modo, este trabalho tem por objetivo investigar o possível envolvimento das cadeias de polilactosaminas em tumores humanos de mama e útero correlacionando com a expressão de glicosiltransferase chaves da sua produção, com outros marcadores já amplamente estudados e com os dados clínico-patológicos.

## OBJETIVOS

### GERAL

Investigar a expressão polilactosaminas em tecidos humanos normais e transformados de mama e útero, correlacionando sua expressão com enzimas chaves da sua produção e/ou moléculas envolvidas em etapas importantes da tumorigênese.

### ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de polilactosaminas em tecidos normais e transformados de mama e útero;
- Avaliar a expressão de *N*-acetilglucosaminil transferases ( $\beta$ 3Gn-T2 e  $\beta$ 3Gn-T3) em tecidos uterinos humanos normais e transformados;
- Avaliar a expressão da *N*-acetilglucosaminil transferase 5 (MGAT5) em tecidos mamários humanos normais e transformados;
- Avaliar a expressão de galectina-3 em tecidos mamários humanos normais e transformados;
- Avaliar a expressão de *N*-acetilglucosamina em tecidos uterinos humanos normais e transformados através de histoquímica com lectinas;
- Estabelecer uma correlação entre o genótipo (expressão das enzimas), o fenótipo (carboidratos) e os dados clínico-patológicos dos tecidos estudados;

## REFERÊNCIAS

- Abbott, K. L., K. Aoki, J.-M. Lim, M. Porterfield, R. Johnson, R. M. O'Regan, L. Wells, M. Tiemeyer and M. Pierce (2008). "Targeted Glycoproteomic Identification of Biomarkers for Human Breast Carcinoma." Journal of proteome research **7**(4): 1470-1480.
- Adamczyk, B., T. Tharmalingam and P. M. Rudd (2012). "Glycans as cancer biomarkers." Biochim Biophys Acta **1820**(9): 1347-1353.
- Argüeso, P., J. Mauris and Y. Uchino (2015). "Galectin-3 as a regulator of the epithelial junction: Implications to wound repair and cancer." Tissue Barriers **3**(3): e1026505.
- Cardoso, A. C. F., L. N. d. S. Andrade, S. O. Bustos and R. Chammas (2016). "Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments." Frontiers in Oncology **6**: 127.
- Chakraborty, A. K. and J. M. Pawelek (2003). "GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link." Clin Exp Metastasis **20**(4): 365-373.
- Chandrasekaran, E. V., J. Xue, S. Neelamegham and K. L. Matta (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.
- da Silva, L. P., S. M. de Almeida, L. R. de Lima, L. Cavalcanti Cde, M. M. de Melo Lira, P. da Silva Mda, E. I. Beltrao and L. B. de Carvalho Junior (2014). "Evaluation of glyco-phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay." Int J Clin Exp Pathol **7**(7): 3800-3808.
- Dasari, S., R. Wudayagiri and L. Valluru (2015). "Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment." Clin Chim Acta **445**: 7-11.
- do Nascimento, J. C., A. Ferreira Sde, J. L. Vasconcelos, J. L. da Silva-Filho, B. T. Barbosa, M. F. Bezerra, C. R. Rocha and E. I. Beltrao (2015). "Fut3 role in breast invasive ductal carcinoma: Investigating its gene promoter and protein expression." Exp Mol Pathol **99**(3): 409-415.

dos-Santos, P. B., J. S. Zanetti, G. S. Vieira-de-Mello, M. B. M. Rêgo, A. R.-S. A and E. I. C. Beltrão (2014). "Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool." International Journal of Clinical and Experimental Pathology **7**(5): 2337-2349.

Drake, R. R. (2015). "Glycosylation and cancer: moving glycomics to the forefront." Adv Cancer Res **126**: 1-10.

Fortuna-Costa, A., A. M. Gomes, E. O. Kozlowski, M. P. Stelling and M. S. G. Pavão (2014). "Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis." Frontiers in Oncology **4**: 138.

Funasaka, T., A. Raz and P. Nangia-Makker (2014). "Galectin-3 in angiogenesis and metastasis." Glycobiology **24**(10): 886-891.

Gabius, H. J., S. Andre, J. Jimenez-Barbero, A. Romero and D. Solis (2011). "From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code." Trends Biochem Sci **36**(6): 298-313.

Gao, L., L. Shen, M. Yu, J. Ni, X. Dong, Y. Zhou and S. Wu (2014). "Colon cancer cells treated with 5fluorouracil exhibit changes in polylactosaminetype Nglycans." Mol Med Rep **9**(5): 1697-1702.

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

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

Henion, T. R. and G. A. Schwarting (2014). "N-linked polylactosamine glycan synthesis is regulated by co-expression of beta3GnT2 and GCNT2." J Cell Physiol **229**(4): 471-478.

INCA, I. N. d. C., José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância (2015). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil /. Rio de Janeiro.

Ishida, H., A. Togayachi, T. Sakai, T. Iwai, T. Hiruma, T. Sato, R. Okubo, N. Inaba, T. Kudo, M. Gotoh, J. Shoda, N. Tanaka and H. Narimatsu (2005). "A novel beta1,3-N-

acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer." FEBS Lett **579**(1): 71-78.

Jiang, Z., S. Hu, D. Hua, J. Ni, L. Xu, Y. Ge, Y. Zhou, Z. Cheng and S. Wu (2014). "beta3GnT8 plays an important role in CD147 signal transduction as an upstream modulator of MMP production in tumor cells." Oncol Rep **32**(3): 1156-1162.

Jurca, G., O. Addam, A. Aksac, S. Gao, T. Özyer, D. Demetrick and R. Alhajj (2016). "Integrating text mining, data mining, and network analysis for identifying genetic breast cancer trends." BMC Research Notes **9**: 236.

Kannagi, R., J. Yin, K. Miyazaki and M. Izawa (2008). "Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited." Biochim Biophys Acta **1780**(3): 525-531.

Kimura, A., M. Terao, A. Kato, T. Hanafusa, H. Murota, I. Katayama and E. Miyoshi (2012). "Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia." Exp Dermatol **21**(7): 515-519.

Kinoshita, M., Y. Mitsui, N. Kakoi, K. Yamada, T. Hayakawa and K. Takehi (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.

Kizuka, Y. and N. Taniguchi (2016). "Enzymes for N-Glycan Branching and Their Genetic and Nongenetic Regulation in Cancer." Biomolecules **6**(2): 25.

Liu, J., L. Shen, L. Yang, S. Hu, L. Xu and S. Wu (2014). "High expression of beta3GnT8 is associated with the metastatic potential of human glioma." Int J Mol Med **33**(6): 1459-1468.

Maccioni, H. J., R. Quiroga and W. Spessott (2011). "Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex." FEBS Lett **585**(11): 1691-1698.

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

- Mkhikian, H., C.-L. Mortales, R. W. Zhou, K. Khachikyan, G. Wu, S. M. Haslam, P. Kavarian, A. Dell and M. Demetriou (2016). "Golgi self-correction generates bioequivalent glycans to preserve cellular homeostasis." eLife **5**: e14814.
- Monzo, A., G. K. Bonn and A. Guttman (2007). "Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates." TrAC Trends in Analytical Chemistry **26**(5): 423-432.
- Narayan, K. and M. Y. Lin (2015). "Staging for cervix cancer: Role of radiology, surgery and clinical assessment." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **29**(6): 833-844.
- Nardy, A. F. F. R., L. Freire-de-Lima, C. G. Freire-de-Lima and A. Morrot (2016). "The Sweet Side of Immune Evasion: Role of Glycans in the Mechanisms of Cancer Progression." Frontiers in Oncology **6**: 54.
- Ni, J., Z. Jiang, L. Shen, L. Gao, M. Yu, X. Xu, S. Zou, D. Hua and S. Wu (2014). "beta3GnT8 regulates the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by altering the glycosylation of CD147." Oncol Rep **31**(4): 1795-1801.
- Papanicolaou, G. N. and H. F. Traut (1997). "The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. 1941." Arch Pathol Lab Med **121**(3): 211-224.
- Qiu, H., W. M. Duan, J. Shu, H. X. Cheng, W. P. Wang, X. E. Huang and H. L. Chen (2014). "B3GNT2, a polylactosamine synthase, regulates glycosylation of EGFR in H7721 human hepatocellular carcinoma cells." Asian Pac J Cancer Prev **15**(24): 10875-10878.
- Rapoport, E. M. and N. V. Bovin (2015). "Specificity of human galectins on cell surfaces." Biochemistry (Mosc) **80**(7): 846-856.
- Rego, M. J., A. F. da Silva Filho, M. F. Cordeiro, P. B. Santos and E. I. Beltrao (2014). "The glycomic profile of invasive ductal carcinoma of the breast is altered in patients with hypoxic regions: implications for tumor behavior." Folia Histochem Cytobiol **52**(2): 96-103.
- Rego, M. J., P. B. Santos, L. B. Carvalho-Junior, J. Stirling and E. I. Beltrao (2014). "Evaluation of Parkia pendula lectin mRNA differentially expressed in seedlings." Braz J Biol **74**(2): 489-492.
- Reis, C. A., H. Osorio, L. Silva, C. Gomes and L. David (2010). "Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection." J Clin Pathol **63**(4): 322-329.

- Sadik, O. A. and F. Yan (2007). "Electrochemical biosensors for monitoring the recognition of glycoprotein-lectin interactions." Anal Chim Acta **588**(2): 292-296.
- Seko, A. and K. Yamashita (2008). "Activation of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-2 (beta3Gn-T2) by beta3Gn-T8. Possible involvement of beta3Gn-T8 in increasing poly-N-acetyllactosamine chains in differentiated HL-60 cells." J Biol Chem **283**(48): 33094-33100.
- Sharon, N. (2008). "Lectins: past, present and future." Biochem Soc Trans **36**(Pt 6): 1457-1460.
- Shimma, Y., F. Saito, F. Oosawa and Y. Jigami (2006). "Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*." Appl Environ Microbiol **72**(11): 7003-7012.
- Shiraishi, N., A. Natsume, A. Togayachi, T. Endo, T. Akashima, Y. Yamada, N. Imai, S. Nakagawa, S. Koizumi, S. Sekine, H. Narimatsu and K. Sasaki (2001). "Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family." J Biol Chem **276**(5): 3498-3507.
- Song, L., J. W. Tang, L. Owusu, M. Z. Sun, J. Wu and J. Zhang (2014). "Galectin-3 in cancer." Clin Chim Acta **431**: 185-191.
- Stewart, B. a. W., C.P. (eds.) (2014). World Cancer Report 2014, International Agency for Research on Cancer, WHO.
- Stowell, S. R., T. Ju and R. D. Cummings (2015). "Protein Glycosylation in Cancer." Annual review of pathology **10**: 473-510.
- Taniguchi, N. and Y. Kizuka (2015). "Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics." Adv Cancer Res **126**: 11-51.
- Thijssen, V. L., R. Heusschen, J. Caers and A. W. Griffioen (2015). "Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review." Biochim Biophys Acta **1855**(2): 235-247.
- Togayachi, A., Y. Kozono, H. Ishida, S. Abe, N. Suzuki, Y. Tsunoda, K. Hagiwara, A. Kuno, T. Ohkura, N. Sato, T. Sato, J. Hirabayashi, Y. Ikehara, K. Tachibana and H. Narimatsu (2007). "Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of

lymphocyte and macrophage activation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15829-15834.

Togayachi, A., Y. Kozono, A. Kuno, T. Ohkura, T. Sato, J. Hirabayashi, Y. Ikehara and H. Narimatsu (2010). "Beta3GnT2 (B3GNT2), a major polylectosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice." Methods Enzymol **479**: 185-204.

Tsikouras, P., S. Zervoudis, B. Manav, E. Tomara, G. Iatrakis, C. Romanidis, A. Bothou and G. Galazios (2016). "Cervical cancer: screening, diagnosis and staging." J buon **21**(2): 320-325.

Tsuboi, S., M. Sutoh, S. Hatakeyama, N. Hiraoka, T. Habuchi, Y. Horikawa, Y. Hashimoto, T. Yoneyama, K. Mori, T. Koie, T. Nakamura, H. Saitoh, K. Yamaya, T. Funyu, M. Fukuda and C. Ohyama (2011). "A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans." Embo j **30**(15): 3173-3185.

Vasconcelos-dos-Santos, A., I. A. Oliveira, M. C. Lucena, N. R. Mantuano, S. A. Whelan, W. B. Dias and A. R. Todeschini (2015). "Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer." Frontiers in Oncology **5**: 138.

Viguiet, M., T. Advedissian, D. Delacour, F. Poirier and F. Deshayes (2014). "Galectins in epithelial functions." Tissue Barriers **2**: e29103.

## CAPÍTULO 1

### DIFFERENTIAL EXPRESSION PATTERNS OF N- ACETYLGUCOSAMINYL TRANSFERASES AND POLYLACTOSAMINES IN UTERINE LESIONS

Artigo publicado na European Journal of Histochemistry em 2014

Qualis em 2013, em Ciências Biológicas I: B1.

Fator de impacto 2013: 2.237

Fator de impacto 2014: 2.042

Fator de impacto 2015: 2.421

## Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polyLactosamines in uterine lesions

A.T.R. Clark,<sup>1</sup>  
V.M.L. Guimarães da Costa,<sup>1</sup>  
L. Bandeira Costa,<sup>1</sup>  
C.L. Bezerra Cavalcanti,<sup>1</sup>  
M.J.B. de Melo Rêgo,<sup>1,2</sup>  
E.I.C. Beltrão<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife

<sup>2</sup>Núcleo para Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil

### Abstract

PolyLactosamine (polyLacNAc) is a fundamental structure in glycoconjugates and it is expressed in specific cells/tissues associated with the development and carcinogenesis.  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyl transferases ( $\beta$ 3GnTs) play an important role in polyLacNAc synthesis, however the roles of these glycosyltransferases and their products in cancer progression are still unclear. In this sense, this work aimed to evaluate differential expression pattern of the *N*-acetylglucosaminyl transferases and polyLactosamines in invasive and pre-malignant lesions of the uterus cervix. The expression of  $\beta$ 3GnT2 and  $\beta$ 3GnT3 were evaluated in normal (n=10) and uterine cervix lesions (n=120), both malignant [squamous carcinoma (SC)] and premalignant [cervical intraepithelial neoplasia (CIN), grades 1, 2 and 3] using immunohistochemistry. Besides, lectin histochemistry with *Phytolacca americana* lectin (PWM) and *Wheat germ* agglutinin (WGA) was also carried out to observe the presence of polyLacNAc chains and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), respectively. The  $\beta$ 3GnT3 was expressed in almost all samples (99%) and  $\beta$ 3GnT2 was higher expressed in disease samples mainly in CIN 3, when compared with normal (P=0.002), CIN 1 (P=0.009) and CIN 2 (P=0.03). The expression of polyLacNAc was higher in SC samples, when compared with normal (P=0.03), CIN 1 (P=0.02) and CIN 3 (P=0.004), and was observed only nuclear expression in nearly 50% of the SC samples, showing a statistically

significant when compared with normal (P=0.01), CIN 1 (P=0.002), CIN 2 (P=0.007) and CIN 3 (P=0.04). Deferring from transferases and polyLacNAc chains, GlcNAc (WGA ligand) reveals a gradual staining pattern decrease with the increase of the lesion degree, being more expressed in CIN 1 lesions when compared with normal (P<0.0001), CIN 2 (P<0.0001), SC (P<0.0001) and CIN 3 (P=0.0003). Our data reveal that  $\beta$ 3GnT2 and polyLacNAc may be involved in the progression of the pre-malignant lesions of the human uterine cervix. In addition, polyLacNAc expression only in the nucleus can be associated a poor prognostic in uterine lesions.

### Introduction

Squamous carcinomas (SC) of the cervix usually is one of the most common malignancies in women worldwide<sup>1</sup> and arises from metaplastic squamous mucosa in the region of the transformation zone;<sup>2</sup> it is preceded by a long phase for pre-invasive disease, called CIN (cervical intraepithelial neoplasia).<sup>2,3</sup> Traditionally, CIN are graded as CIN 1, CIN 2 and CIN 3, depending on the degree of differentiation.<sup>3</sup> An accurate diagnosis of premalignant lesions is important to clinical management, but the histological diagnosis of CIN can be complicate.<sup>3</sup> Studies of cell surface carbohydrates in these lesions are scarce and they can be useful for understanding the development of this type of lesion and its early diagnosis. Human cells are covered with a dense and complex array of glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids and proteoglycans), that differs between cell types; for example, glycosylation of a single cell type significantly changes during cell development and differentiation.<sup>4-7</sup>

Glycosylation is one of the most common post-translational modifications in eukaryotic cells.<sup>8-10</sup> These glycosylated molecules are involved in a wide variety of biological events, such as cell activation,<sup>11</sup> differentiation,<sup>7,12</sup> infection,<sup>13</sup> cell-cell, receptor-ligand, and carbohydrate-carbohydrate interactions.<sup>4,14,15</sup> Furthermore, cell malignant transformations are often associated with structural alteration of carbohydrate chains in glycoconjugates,<sup>5,7,14</sup> and they may be directly or indirectly involved in cancer progression and malignancy.<sup>5,6,14</sup> The polyLacNAc structure is a linear glycan containing repeats of the *N*-acetylglucosamine (LacNAc) unit (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3)<sub>n</sub>. It is a fundamental structure of the carbohydrate chains in glycoproteins and glycolipids,<sup>4,16,17</sup> being expressed in specific cells/tissues associated with development and cell-recognition, binding to several endogenous lectins.<sup>16</sup> In cancer, polyLacNAc and related structures play

Correspondence: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil.  
Tel. +55.81.21268484 - Fax: +55.81.21268485.  
E-mail: ebeltrao@hotmail.com.br

Keywords: cancer, lectin, N-acetylglucosaminyl transferase, poly-N-acetylglucosamine.

Acknowledgments: this work was financially supported by 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).

Received for publication: 18 October 2013.

Accepted for publication: 26 March 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright A.T.R. Clark et al., 2014  
Licensee PAGEPress, Italy  
European Journal of Histochemistry 2014; 58:2334  
doi:10.4081/ejh.2014.2334

important roles in cell-cell and cell-matrix interaction, determining metastatic capacity.<sup>4,17,18</sup> Thus, the investigation of their presence may be useful for understanding the importance of polyLacNAc in cancer lesion.

PolyLacNAc and GlcNAc can be identified in tissues by *Phytolacca americana* (PWM), lectin which binds with high affinity to polyLacNAc glycans bearing three or more linear *N*-acetylglucosamine repeats, and from *Wheat germ* agglutinin (WGA), respectively. Lectins have long been used as tools to characterize cell surface glycans because of their substantial selectivity in terms of branching, linkage and terminal modifications of complex glycans.<sup>6,19</sup> The structure of these glycans depends on the glycosylation enzymes, glycosidases and glycosyltransferases, and the presence of appropriate sugar donors and receptors in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of the eukaryotic cell,<sup>8,10,16</sup> and they are very complex.<sup>5,20</sup> A key enzyme in this process is  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyl transferases ( $\beta$ 3GnTs) that transfers an *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) from UDP-GlcNAc to a galactose on the nonreducing end of the carbohydrate chain in a  $\beta$ 1,3-linkage.<sup>15,21,22</sup> Eight  $\beta$ 3GnTs,  $\beta$ 3GnT1 to  $\beta$ 3GnT8, have been isolated, and their *in vitro* activities have been characterized.<sup>4,15-17,22-24</sup> However, the roles of these multiple  $\beta$ 3GnTs on *in vivo* polyLactosamine (polyLacNAc) synthesis are still unclear.

This study aimed to investigate the expression of *N*-acetylglucosaminyl transferases

( $\beta$ 3GnT2 and  $\beta$ 3GnT3), the expression of polyLacNAc (one of their possible products), to evaluate the polyLacNAc structure in transformed uterine cervix tissues and visualize possible changes in the expression according to neoplasia grade.

## Materials and Methods

### Materials

Trypsin (T1005), streptavidin-peroxidase polymer (S2438), neuraminidase (N2133), horseradish peroxidase (P8375), lectin from *Phytolacca americana* (PWM) (L9379), *Wheat germ* agglutinin (WGA) biotin conjugated (L5141), *N*-acetyl-D-glucosamine (A8625) and antibodies included rabbit anti-B3GNT2 (HPA005897) and anti-B3GNT3 (HPA024298) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The visualization system, Advance™ HRP (K406889-2), and the chromogenic substrate (K346811-2), liquid diaminobenzidine (DAB) and substrate, were obtained from Dako (Glostrup, Denmark). Entellan® (107960) was purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

### Samples

Malignant and premalignant lesions of uterine cervix were obtained from the Tissue Bank from Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco, Northeast Brazil, after approval by the Health Science Ethical Committee from the same university (CEP/CCS/UFPE N° 195/09). One hundred and thirty formalin-fixed and paraffin-embedded cases were collected and grouped according to their histopathological classification. In this sense, 120 samples of transformed tissues diagnosed as CIN grades 1 (n=30), 2 (n=30), 3 (n=30) and squamous carcinoma (SC, n=30). Ten samples of normal epithelium were also analyzed. Patients' age at diagnosis time ranged between 23-83 year-old (mean 48.86±14.78) to squamous-cell carcinoma; 24-89 year-old (mean 40.79±14.93) to CIN 3; 25-89 year-old (mean 38.10±15) to CIN 2 and 18-

46 year-old (mean 33.08±8.75) to CIN 1. Normal tissues samples were obtained from patients with 28-68 year-old age range (mean 40.77±12.23).

### Immunohistochemistry

Tissue sections (4  $\mu$ m) were deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol (100%-70%), treated with 10% (v/v) ammonium hydroxide solution for 10 min at 25°C and with 10 mM citrate buffer pH 6.0 for 30 min at 100°C on a steamer chamber.<sup>25,26</sup> Afterwards, samples were treated with a 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol solution for 15 min at 25°C, blocked with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) solution in PBS (100 mM phosphate-buffered saline pH 7.2, containing 150 mM NaCl), for 1h at 25°C. Thereafter, primary antibodies were diluted in 1% BSA-PBS ( $\beta$ 3GnT2 1:50 and  $\beta$ 3GnT3 1:100) and incubated for 2h at 37°C. Incubation with Advance™ HRP link (Dako) was performed for 45 min, followed by Advance™ HRP Enzime (Dako) for 45 min both at 25°C, as a biotin-free polymer method. Peroxidase reaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Dako) and sections were counterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated and mounted with Entellan® (Merck). Between each step, samples were washed twice (5 min each) with PBS. Positive staining control was developed with gastrointestinal tract samples<sup>22</sup> and negative ones by replacing the primary antibodies for blocking solution.

### Lectin histochemistry

After deparaffination in xylene and hydration in ethanol (100%-70%), four micrometer thick tissues were treated with a 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37°C, followed by 100 mU/mL neuraminidase solution for 1 h at 37°C and a 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol solution for 15 min at 25°C. PWM and WGA lectins incubations (20  $\mu$ g/mL) were carried out for 2 h at 4°C. Biotinylated WGA lectin was visualized using streptavidin-peroxidase polymer (1:1000) for 45 min at 25°C. PWM, a non-conjugated lectin, after tissue incubation were also incubated with a 5% (w/v) peroxidase solution for 1 h at 25°C. Peroxidase was

revealed with DAB according to de manufacturer's instructions. Sections were then counterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated in ethanol and mounted with Entellan® (Merck). Between each step, samples were washed twice (5 min each) with 100 mM PBS solution pH 7.2, containing 150 mM NaCl. Inhibition of lectin-carbohydrate recognition (staining control) was developed by incubating tissues sections with lecting inhibited with their specific sugar (300 mM of *N*-acetyl-D-glucosamine for 30 min to WGA) prior to tissue incubation and negative staining control was developed by replacing lectins for PBS.

### Staining analysis and image capture

Image capture and analysis of tissues sections were carried out using a Nikon Eclipse 50i light microscope (USA) with a NIS-Elements F software (version 2.30). Random areas ( $\mu$ m<sup>2</sup>) were analyzed taking into account the number of stained cells per area. Staining intensity was measured according to Dornelas<sup>27</sup> and Ferreira,<sup>28</sup> as: 0, negative staining; 1+, low staining for up to 1/3 of cells stained; 2+, moderate staining for up to 2/3 of cells stained; and 3+, intense staining for more than 2/3 of cells stained. For statistical analysis we used a method where the results were dichotomized as high (3+ and 2+) or low (1+ and 0) expression.<sup>29,30</sup>

### Statistical analysis

The Fischer's test was used to evaluate the relationship between positive staining and lesions grades. When P<0.05 differences were considered significant. GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) statistical software was used for data analysis.

## Results

$\beta$ 3GnT3 showed to be expressed (Figure 1-1a) in the cytoplasm of 99% samples (Table 1). However, this expression was not different in among analyzed groups (Figure 2).  $\beta$ 3GnT2

**Table 1. Expression of  $\beta$ 3GnT3,  $\beta$ 3GnT2, GalNAc, PolyLacNAc and nuclear PolyLacNAc in normal, premalignant and malignant uterine lesions.**

	$\beta$ 3GnT3		$\beta$ 3GnT2		GalNAc		PolyLacNAc		Nuclear PolyLacNAc	
	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher
Normal	10	0	9	1	9	1	9	1	10	0
CIN 1	30	0	21	9	3	27	24	6	28	2
CIN 2	27	3	19	11	18	12	26	4	27	3
CIN 3	30	0	10	20	17	13	22	8	25	5
SC	30	0	16	14	23	7	15	15	17	13

SC, squamous carcinoma; CIN, cervical intraepithelial neoplasia.

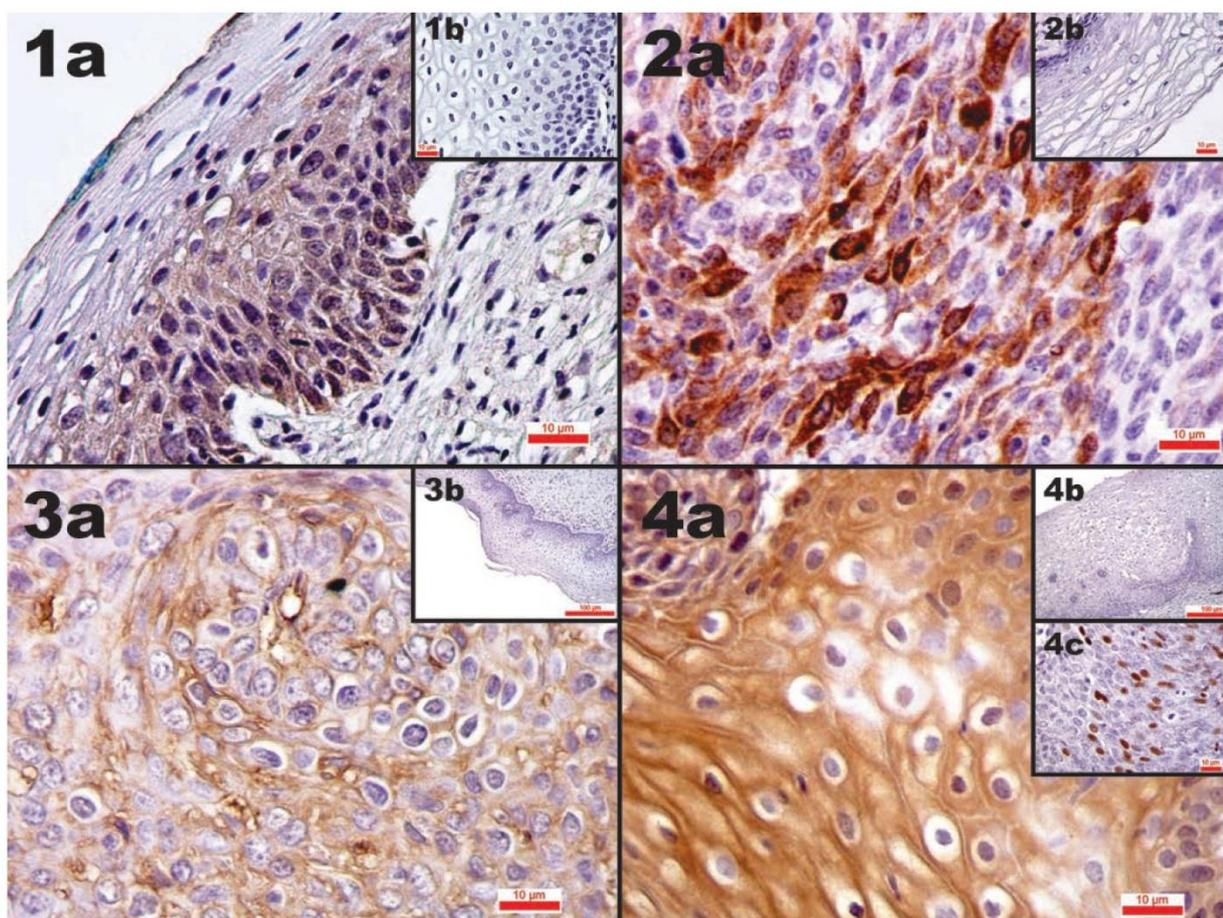
expression was observed in the cytoplasm (mainly in CIN 3 lesions) and it was higher than  $\beta 3\text{GnT3}$  (Figure 1-2a and Table 1) when compared with normal ( $P=0.002$ ), CIN 1 ( $P=0.009$ ) and CIN 2 ( $P=0.03$ ) samples (Figure 2). The presence of GlcNAc terminal residues was also most commonly found in the cytoplasm and cell surface of CIN 1 lesions (Figure 1-3a and Table 1) when compared with normal ( $P<0.0001$ ), CIN 2 ( $P<0.0001$ ), SC ( $P<0.0001$ ) and CIN 3 ( $P=0.0003$ ) samples (Figure 2). It was also observed a gradual expression decrease of this saccharide with the increasing degree of lesions (CIN 1, CIN 2, CIN 3, and SC), opposing to what was observed with the expression of both glycosyltransferases,  $\beta 3\text{GnT2}$  and  $\beta 3\text{GnT3}$  (Figure 2).

PolyLacNAc chains, like GlcNAc terminal

residues, were more expressed in cytoplasm and cell surface of lesion samples (Figure 1-4a). It was highly expressed in SC samples (Table 1), especially when compared with normal ( $P=0.03$ ), CIN 1 ( $P=0.02$ ) and CIN 2 ( $P=0.004$ ) samples (Figure 2). In this sense, an increased expression of these saccharide chains was observed with an increased histologic degree of the lesion (Figure 2). For SC lesions nearly 50% of samples (Table 1) showed a polyLacNAc expression only in nucleus (Figure 3), whereas in premalignant lesions and normal samples this staining pattern was observed only in few cases (Figure 3) showing a statistically significant difference when compared with normal ( $P=0.01$ ), CIN 1 ( $P=0.002$ ), CIN 2 ( $P=0.007$ ) and CIN 3 ( $P=0.04$ ).

## Discussion

In 2001, Shiraishi *et al.*<sup>22</sup> demonstrated the expression of  $\beta 3\text{GnT2}$  in significant levels in many tissues, including uterus, while  $\beta 3\text{GnT3}$  was found but at lower levels. Togayachi and co-workers<sup>21</sup> showed that  $\beta 3\text{GnT2}$  and  $\beta 3\text{GnT3}$  are considerably expressed in human cell lines of colon adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, lung adenocarcinoma, stomach cancer, hepatoblastoma, prostatic cancer and pancreas cancer. Additionally,  $\beta 3\text{GnT2}$  was also significantly express in human leukemia and promyelocytic leukemia cell lines. Using immunohistochemistry our data also showed higher levels of  $\beta 3\text{GnT2}$  when compared with  $\beta 3\text{GnT3}$  in the normal uterine cervix. We also



**Figure 1.** Immunohistochemistry and lectin histochemistry of premalignant and malignant lesions of human uterine cervix. 1a) Anti- $\beta 3\text{GnT3}$  staining of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, showing moderate dysplasia confined to the basal 2/3 of epithelium. 2a) Anti- $\beta 3\text{GnT2}$  staining of invasive squamous carcinoma, showing staining of the invasive cells. 3a) *Wheat germ agglutinin (WGA)* staining squamous epithelium with cervical intraepithelial neoplasia grade 2. 4a) *Phytolacca americana* lectin (PWM) staining of cervical intraepithelial neoplasia grade 1. 1b, 2b, 3b, 4b) Negative controls for respective assay. 4c) *Phytolacca americana* lectin (PWM) staining of nucleus in invasive cells of squamous carcinoma.

showed an expression of both glycosyltransferases in transformed human uterine cervix tissues, there are, however, higher levels of  $\beta 3\text{GnT}2$ . Furthermore, our data demonstrate a progressive upregulation of  $\beta 3\text{GnT}2$  expression during the transformation progression of uterine cervix, maybe involved in essential events in the establishing of the pre-malignant lesions. In transitional cell carcinoma of bladder, Gromova *et al.*<sup>14</sup> observed lower levels of  $\beta 3\text{GnT}2$  transcript in the invasive tumors, compared with their noninvasive counterparts, establishing a downregulation of  $\beta 3\text{GnT}2$  during bladder cancer progression. These findings show that glycosyltransferases play different roles according to the cell or tissue type involved. Tanaka *et al.*,<sup>31</sup> in nude mice, admin-

istered four cell lines in the abdominal cavities of the animals, where MKN45 (a human gastric cell line) was used to overexpress  $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosaminyl transferase, which led to an increased number of cell surface *N*-glycans containing polyLacNAc. They observed that the presence of larger polyLacNAc structures enhanced the metastatic potential of this tumor cell, when compared to the control cell lines.

Several other studies have demonstrated the importance of polyLacNAc expression in the development and progression of many cancer types, as involved during differentiation,<sup>32</sup> hyperproliferation,<sup>33</sup> immune response<sup>18</sup> and especially cancer growth and metastasis.<sup>34-37</sup> In our results the polyLacNAc expression also

demonstrated an involvement of this structure with the cancer process progression. We can also assign that the decreased expression of terminals residues of GlcNAc during the increasing of the lesion degree can be explained by the appearance of other carbohydrate antigens, such as Sialyl-Lewis A, Sialyl-Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigens, which may imply advantages for these cells and to the lesion progression process.<sup>38</sup> Recently, Togayachi and co-workers<sup>4</sup> have suggested that polyLacNAc chains on glycoproteins are synthesized mostly by  $\beta 3\text{GnT}2$  after observing a dramatic reduction in their expression in thymus, spleen, lymphocytes and macrophages of  $\beta 3\text{GnT}2$  knockout mice. They suggest that  $\beta 3\text{GnT}2$  is the major enzyme responsible for the synthesis of

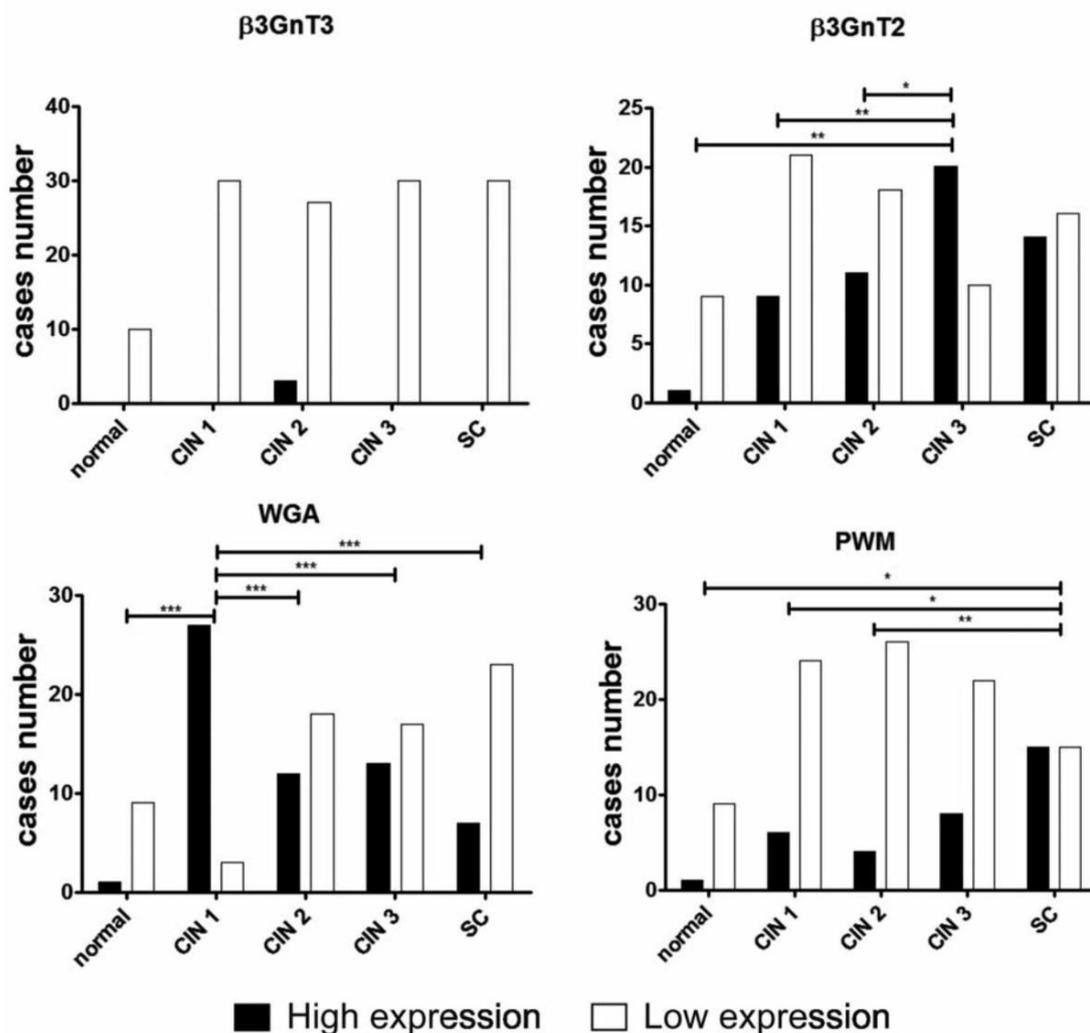


Figure 2. Statistical analysis of anti- $\beta 3\text{GnT}2$ , anti- $\beta 3\text{GnT}3$ , *Phytolacca americana* lectin (PWM) and *Wheat germ agglutinin* (WGA) staining. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ ; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; SC, squamous carcinoma.

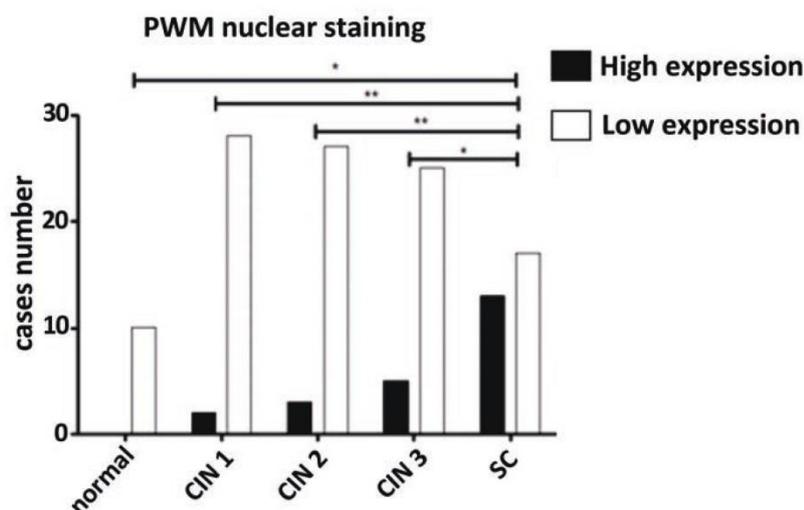


Figure 3. Statistical analysis of nuclear staining of *Phytolacca americana* lectin (PWM). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.0005$ ; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; SC, squamous carcinoma.

polyLacNAc chains on *N*-glycans *in vivo*. Another study<sup>16</sup> also suggests that an increase in the activity of  $\beta 3\text{GnT}2$  increases polyLacNAc chains in HL-60 cells, a human promyelocytic leukemia cells. This work showed a significant difference in the expression pattern of  $\beta 3\text{GnT}2$ , GlcNAc and polyLacNAc chains among uterine lesions.  $\beta 3\text{GnT}2$  seems to be involved with the progression of the pre-malignant lesions, increasing their expression levels with the increasing of the grade of lesion and decreasing with the establishment of the malignant lesion. The opposite occurred with the GlcNAc expression; the expression decreased with the progression of pre-malignant lesions. PolyLacNAc chains expression showed to be progressive with the increasing of lesions grade but differently to  $\beta 3\text{GnT}2$  expression the former continues to increase until to the malignant lesion, being highly expressed in SC. When polyLacNAc is present only in the nucleus this feature was an indicative of poor prognosis. Its expression seems to be associated with the increase of the  $\beta 3\text{GnT}2$  during the progression of the pre-malignant lesions and may provide some advantages to tumor development such as differentiation, hyperproliferation, growth or metastasis.<sup>5,6,14</sup>  $\beta 3\text{GnT}2$  and polyLacNAc expression can mediate pathophysiological key events during various stages of uterine lesions progression, including differentiation, hyperproliferation, growth and metastasis.<sup>5,6,14</sup>

Our study was the first in the literature which aimed to analyze the expression of  $\beta 3\text{GnTs}$  in uterine cervix and results showed the potential involvement of  $\beta 3\text{GnT}2$  and polyLacNAc chains in uterine lesions progres-

sion and to show that the nucleus expression of polyLacNAc chains can be associated to a poor prognostic in uterine lesions.

## References

- Protrka Z, Arsenijevic S, Dimitrijevic A, Mitrovic S, Stankovic V, Milosavljevic M, et al. Co-overexpression of bcl-2 and c-myc in uterine cervix carcinomas and premalignant lesions. *Eur J Histochem* 2011;55:e8.
- Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005;19:485-500.
- Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:605-15.
- Togayachi A, Kozono Y, Ishida H, Abe S, Suzuki N, Tsunoda Y, et al. Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15829-34.
- Kataoka K, Huh NH. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyl transferase involved in invasion of cancer cells as assayed *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:843-8.
- Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, et al. A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. *Glycobiology* 2007;17:1138-46.
- Couldrey C, Green JE. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res* 2000;2:321-3.
- Dojima T, Nishina T, Kato T, Uno T, Yagi H, Kato K, et al. Comparison of the N-linked glycosylation of human beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae. *J Biotechnol* 2009;143:27-33.
- Kang JG, Ko JH, Kim YS. Pros and cons of using aberrant glycosylation as companion biomarkers for therapeutics in cancer. *BMB Rep* 2011;44:765-71.
- Kato T, Suzuki M, Murata T, Park EY. The effects of N-glycosylation sites and the N-terminal region on the biological function of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 and its secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:699-705.
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001;409:733-9.
- Nakamura N, Yamakawa N, Sato T, Tojo H, Tachi C, Furukawa K. Differential gene expression of beta-1,4-galactosyltransferases I, II and V during mouse brain development. *J Neurochem* 2001;76:29-38.
- Teneberg S, Leonardsson I, Karlsson H, Jovall PA, Angstrom J, Danielsson D, et al. Lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid receptor for *Helicobacter pylori*, present in human gastric epithelium. *J Biol Chem* 2002;277:19709-19.
- Gromova I, Gromov P, Celis JE. A novel member of the glycosyltransferase family, beta 3 Gn-T2, highly downregulated in invasive human bladder transitional cell carcinomas. *Mol Carcinog* 2001;32:61-72.
- Togayachi A, Kozono Y, Kuno A, Ohkura T, Sato T, Hirabayashi J, et al. Beta3GnT2 (B3GNT2), a major polylactosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice. *Methods Enzymol* 2010;479:185-204.
- Seko A, Yamashita K. Activation of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-2 (beta3Gn-T2) by beta3Gn-T8. Possible involvement of beta3Gn-T8 in increasing poly-N-acetylactosamine chains in differentiated HL-60 cells. *J Biol Chem* 2008;283:33094-100.
- Ishida H, Togayachi A, Sakai T, Iwai T, Hiruma T, Sato T, et al. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetylactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS Lett* 2005;579:71-8.
- Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, et al. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. *EMBO J* 2011;30:3173-85.
- Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004;14:53R-62R.

20. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 2003;328:307-17.
21. Togayachi A, Akashima T, Ookubo R, Kudo T, Nishihara S, Iwasaki H, et al. Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids. *J Biol Chem* 2001;276:22032-40.
22. Shiraiishi N, Natsume A, Togayachi A, Endo T, Akashima T, Yamada Y, et al. Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family. *J Biol Chem* 2001;276:3498-507.
23. Narimatsu H. Human glycogene cloning: focus on beta 3-glycosyltransferase and beta 4-glycosyltransferase families. *Curr Opin Struct Biol* 2006;16:567-75.
24. Togayachi A, Sato T, Narimatsu H. Comprehensive enzymatic characterization of glycosyltransferases with a beta3GT or beta4GT motif. *Methods Enzymol* 2006;416:91-102.
25. Pedroso PMO, Pescador CA, Bandarra PM, Raymundo DL, Borba MR, Wouters F, et al. Standardization of immunohistochemistry technique for detection of rabies virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from central nervous system of cattle. *Pesq Vet Bras*. 2008;28:627-32.
26. Lopes FF, Cruz MCFNd, Pereira ALda, Silveira ÉJDD, Galvão HC, Souza LBD, et al. Immunohistochemical analysis of cytokeratins in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41:425-30.
27. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin spinocellular carcinoma and actinic keratosis. *Na Bras Dermatol* 2009;84:469-75.
28. Ferreira SA, Vasconcelos JL, Silva RC, Cavalcanti CL, Bezerra CL, Rego MJ, et al. Expression patterns of alpha2,3-sialyltransferase I and alpha2,6-sialyltransferase I in human cutaneous epithelial lesions. *Eur J Histochem* 2013;57:e7.
29. dos Santos P, Zanetti J, Ribeiro-Silva A, Beltrao E. Beta 1 integrin predicts survival in breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Diagn Pathol* 2012;7:104.
30. Petricevic B, Vrbancic D, Jakic-Razumovic J, Brcic I, Rabic D, Badovinac T, et al. Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Med Oncol* 2012;29:486-94.
31. Tanaka K, Moriwaki K, Yokoi S, Koyama K, Miyoshi E, Fukase K. Whole-body imaging of tumor cells by azaelectrocyclization: visualization of metastasis dependence on glycan structure. *Bioorg Med Chem* 2013; 21:1074-7.
32. Qiu H, Wu SL, Guo XH, Shen HJ, Zhang HP, Chen HL. Expression of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferases during differentiation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol Cell Biochem* 2011;358:131-9.
33. Kimura A, Terao M, Kato A, Hanafusa T, Murota H, Katayama I, et al. Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Exp Dermatol* 2012; 21:515-9.
34. Srinivasan N, Bane SM, Ahire SD, Ingle AD, Kalraiya RD. Poly N-acetyllactosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3. *Glycocon J* 2009;26:445-56.
35. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology* 2008;18:750-60.
36. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473:21-34.
37. Miyoshi E, Terao M, Kamada Y. Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice. *BMB Rep* 2012; 45:554-9.
38. Engelstaedter V, Fluegel B, Kunze S, Mayr D, Friese K, Jeschke U, et al. Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer. *Histol Histopathol* 2012;27:507-14.

## CAPÍTULO 2

### POLYLACTOSAMINE EXPRESSION AND CORRELATION WITH MGAT5 AND GALECTIN-3 IN BREAST TUMOR SAMPLES: A CLINIC PATHOLOGIC STUDY

Clark, Arthur Tenorio Ribeiro<sup>1</sup>; da-Silva, Aline Larissa Virgínio<sup>1</sup>; Duarte, Andressa<sup>2</sup>; Gontijo, Monyk Karol Braga<sup>2</sup>; Ribeiro-Silva, Alfredo<sup>2</sup>; Beltrão, Eduardo Isidoro Carneio<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14049-900, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil.

#### ABSTRACT

Alterations in glycan expression it is correlated with crucial steps of tumor progression. Polylactosamine (polyLacNAc) is a glycan involved with a range of cellular functions and at malignant transformations is associated with the increasing of malignancy and metastasis. Its expression could be regulated by  $\beta$ 1,6-*N*-acetylglucosaminiltransferase V (MGAT5), the enzyme responsible for produce  $\beta$ 1,6 branches in proteins. Polylactosamine chains can be recognized by Galectin-3 (Gal-3), a protein from the galectin family which its also associated to a poor prognostic in many types of cancer. Thus, this study was designed to evaluate the differential expression of PolyLacNAc chains, MGAT5 and Gal-3 in breast lesions, by lectin histochemistry with PWM for polyLacNAc chains and immunohistochemistry for MGAT5 and Gal-3, and its possible application as prognostic markers. PolyLacNAc chains recognized by PWMA was almost not expressed in all samples, being observed in a few samples. MGAT5 was observed at low levels at FIB samples (9.5%) and its expression increased in the malignant lesions (68.7% at DCIS, 63.5% at IDC and 38.2% at LC). Gal-3 expression present at all samples with FIB, decreasing in malignant samples (64.4% at

DCIS, 89.8% at IDC and 84.6% at LC). It is visible how MGAT5 is higher expressed in the malignant lesion, suggesting its involvement in the progression of breast cancer tumors and a mark of poor prognosis.

Keywords: breast, cancer, galectin-3, MGAT5, polylectosamine

## INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is a serious disease and the most common cancer diagnosed in the world. Almost 500,000 women die per year of BC, being the second largest number of deaths among cancers (Maxmen 2012). BC is a complex disease in which numerous factors are involved and may lead to diverse symptoms according the type and site of tumor formation, where an early stage diagnosis is important to improve efficiency of the treatment and avoid reoccurrence (Mittal *et al.* 2017). Furthermore, it is a disease with several different phenotypes which present diverse biological characteristics (Zhang *et al.* 2014). In the past years, the search for new biomarkers for diagnosis and treatment has been conducted by glycomics (Adamczyk *et al.* 2012).

It has been knowledge that the altered expression of glycans of cell surface is intimately associated with numerous diseases, including cancer (Christiansen *et al.* 2014). Given the complexity of the glycosylation and its importance in a broad range of biological processes, it is no unusual that minor alterations could be the beginning of malignant processes (Stowell *et al.* 2015). Possibly, many of these alterations in glycan expression can be correlated to the expression and localization in the Golgi apparatus of enzymes responsible for this process, the glycosyltransferases (Pinho e Reis 2015).

Glycans are involved in many biological processes such as cell-cell recognition, cell adhesion, mobility (Hauselmann e Borsig 2014). Growing evidences supports the involvement of glycoconjugates in crucial steps of tumor progression, like tumor proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis, therefore the aberrant glycosylation is now cited as a hallmark of cancer (Munkley e Elliott 2016). These changes can be explained by the ability of glycosylation modulating the functions of proteins through changes in their half-life, solubility, binding activity and specificity (Glavey *et al.* 2015).

One of the glycans that has called attention to the research for their role is polyLactosamine (polyLacNAc) (Henion e Schwarting 2014). It is a linear carbohydrate polymer involved with a range of cellular function both in normal and malignant processes, from cell interactions to differentiation and metastasis (Clark *et al.* 2014, Shen *et al.* 2014). PolyLacNAc polymers are a backbone structure where numerous glycosyltransferases creating branch structures and showing many types of terminal epitopes (Qiu *et al.* 2014). They can be recognized by a variety of lectins, including *Phytolacca americana* (PWM), which binds with high affinity to polyLacNAc chains bearing three or more linear *N*-acetylglucosamine repeats (Clark *et al.* 2014).

$\beta$ 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5) is the enzyme responsible to produce  $\beta$ 1,6 branches of *N*-acetylglucosaminyl residues (GlcNAc) in proteins, allowing the formation of polyLacNAc chains (Kimura *et al.* 2012). The increasing of branching *N*-linked glycans has been associated with malignancy and metastasis (Ma *et al.* 2013) and high levels of these structures are correlated with disease progression (Li *et al.* 2008). The final modified structure produced can be recognized by galectin-3 (Gal-3) and result in many different biological responses (Kimura *et al.* 2012). Gal-3 has high affinity to  $\beta$ 1,6-*N*-acetylglucosamine branched glycans (Fortuna-Costa *et al.* 2014), specially by *N*-acetylglucosamine residues (Nio-Kobayashi 2016). The roles of Gal-3 in cancer are very complex but higher levels have been shown to be a poor prognostic marker in many types of cancer (Ruvolo 2016).

Due their single importance as markers in malignant processes this study was designed to evaluate the differential expression of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 in different types of breast lesions (from benign lesions as in fibroadenoma - FIB, as well as in *in situ* and invasive duct carcinoma, DCIS and IDC respectively, and lobular carcinoma - LC). Furthermore, this evaluation was correlated with the clinic and histopathological data to see the possible application of these molecules as prognostic biomarkers.

## MATERIALS AND METHODS

### MATERIALS

Trypsin (T1005), streptavidin-peroxidase polymer (S2438), neuraminidase (N2133), horseradish peroxidase (P8375), lectin from *Phytolacca americana* (PWM) (L9379) and antibodies included rabbit anti-MGAT5 (HPA0010919) and anti-Gal-3 (HPA024298) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The visualization system, Advance™ HRP (K406889-2), and the chromogenic substrate (K346811-2), liquid diaminobenzidine (DAB) and substrate, were obtained from Dako (Glostrup, Denmark). Entellan® (107960) was purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

### SAMPLES

Formalin-fixed paraffin embedded samples of fibroadenoma [FIB, n=65 – median sizes 3.0 (2.0;4.0) cm)], ductal carcinomas *in situ* [DCIS, n=49 - median sizes 2.6 (0.9;4.0) cm)], invasive ductal carcinomas [IDC, n=60 - median sizes 2.0 (1.4;3.8) cm)] and lobular carcinomas [LC, n=60 - median sizes 1.6 (1.1;2.5) cm)] were randomly chosen from the Biopsies Bank of the Department of Pathology of Ribeirão Preto Medical School at University of São Paulo, Brazil. The average age of patients included in this study was 51.3 years old (range 16-86 years). Clinic and histopathology data (age, menopausal status, tumor size, regional lymph nodes metastasis, and others) were used for patient's characterization (table 1). Patients were selected based on their histopathologic diagnosis and reviewed by a breast pathologist to confirm the diagnosis. The protocol used in this study was in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and it was previously approved by the Ethic Committee.

Table 1. Clinical and histological data of the study sample.

Data	Samples			
	FIB (n = 65)	DCIS (n = 49)	IDC (n = 60)	LC (n = 60)
Age <sup>a</sup>	36.5 ± 16.4	57.4 ± 13.4	55.7 ± 11.8	58.1 ± 12.2
Age range				
<40 years	36 (55.4%)	3 (6.1%)	1 (1.7%)	3 (5.0%)
40 to 59 years	20 (30.8%)	25 (51.0%)	42 (70.0%)	28 (46.7%)
>60 years	9 (13.8%)	21 (42.9%)	17 (28.3%)	29 (48.3%)
Historical				
Menopause	10 (15.4%)	26 (53.1%)	30 (50.0%)	41 (68.3%)
Breast cancer in family	4 (6.1%)	9 (18.4%)	12 (20.0%)	9 (15.0%)
Hormonal therapy	21 (32.3%)	24 (49.0%)	28 (46.7%)	30 (50.0%)
Tumor				
Size <sup>b</sup> (cm)	3.0 (2.0; 4.0)	2.6 (0.9; 4.0)	2.0 (1.4; 3.8)	1.6 (1.1; 2.5)
Clinical stage				
1	-	11 (22.4%)	24 (40.0%)	20 (33.3%)
2	-	17 (34.7%)	13 (21.7%)	17 (28.3%)
3	-	13 (26.5%)	19 (31.7%)	18 (30.0%)
4	-	8 (16.3%)	4 (6.7%)	5 (8.4%)
Lymphnode metastasis	-	-	20 (33.3%)	9 (15.0%)
Metastasis	-	-	17 (28.3%)	15 (25.0%)
Nuclear grade				
1	-	11 (22.5%)	1 (1.7%)	-
2	-	8 (16.3%)	32 (53.3%)	-
3	-	30 (61.2%)	27 (45.0%)	-
Mitotic level				
1	-	-	34 (56.7%)	-
2	-	-	16 (26.7%)	-
3	-	-	10 (16.7%)	-
Necrosis	-	24 (49.0%)	10 (16.7%)	2 (3.3%)
ER	-	40 (81.6%)	36 (60.0%)	53 (88.3%)
PR	-	35 (71.4%)	29 (48.3%)	44 (73.3%)
HER2	-	11 (25.0%)	10 (16.7%)	4 (7.1%)
Molecular subtype				
HER2	-	-	5 (8.3%)	-
Luminal	-	-	32 (53.4%)	-
Luminal HER2	-	-	5 (8.3%)	-
TN	-	-	18 (30.0%)	-
Architectural form				
Cribriform	-	-	-	32 (53.3%)
Comedonic	-	-	-	24 (40.0%)
Solid	-	-	-	37 (61.7%)

<sup>a</sup> average ± standard deviation; <sup>b</sup> Median (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>); <sup>c</sup> p < 0,05

## TISSUE MICROARRAY - TMA

Core biopsies (diameter, 1 mm) were punched from representative regions of each formalin-fixed and paraffin-embedded samples (FIB=66, DCIS=49, IDC=60 and ILC=60) and were arrayed into a new paraffin block using a Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA). Tissue sections (4 $\mu$ m-thick) were cut from the TMA paraffin block and placed in glass slides.

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Tissue sections (4  $\mu$ m) were deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol (100%-70%), treated with a 10% (v/v) ammonium hydroxide solution for 10 min at 25°C and with a 10 mM citrate buffer pH 6.0 for 30 min at 100°C on a steamer chamber.<sup>25,26</sup> Afterwards, samples were treated with a 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol solution for 15 min at 25°C, blocked with a 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) solution in PBS (100 mM phosphate-buffered saline pH 7.2, containing 150 mM NaCl), for 1h at 25°C. Thereafter, primary antibodies were diluted in 1% BSA-PBS (anti-MGAT5 1:60 and anti-Gal-3 1:100) and incubated for 12-16 hours at 37°C. Incubation with Advance™ HRP link (Dako) was performed for 45 min, followed by Advance™ HRP Enzyme (Dako) for 45 min both at 25°C, as a biotinfree polymer method. Peroxidase reaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Dako) and sections were counterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated and mounted with Entellan® (Merck). Between each step, samples were washed twice (5 min each) with PBS. Positive staining control was developed with gastrointestinal tract samples (n=22) and negative ones by replacing the primary antibodies for blocking solution.

## LECTIN HISTOCHEMISTRY

After deparaffinization in xylene and hydration in ethanol (100%-70%), tissues (4 $\mu$ m) were treated with a 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37°C, followed by a 100 mU/mL neuraminidase solution for 1 h at 37°C and a 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol solution for 15 min at 25°C. PWM incubations (20  $\mu$ g/mL) were carried out for 2 h at 4°C. PWM, a non-conjugated lectin, after tissue incubation were also incubated with a 5% (w/v) peroxidase solution for 1 h at 25°C. Peroxidase was revealed with DAB according to de manufacturer's instructions. Sections were then counstained with Harry's hematoxylin, dehydrated in ethanol and mounted with Entellan® (Merck). Between each step, samples were washed twice (5 min each) with 100 mM PBS solution pH 7.2, containing 150 mM NaCl. Negative staining control was developed by replacing the lectin solution for PBS.

## STAINING ANALYSIS AND IMAGE CAPTURE

Image capture and analysis of tissues sections were carried out using a Nikon Eclipse 50i light microscope (USA) with a NIS Elements F software (version 2.30). Areas of the core (1mm<sup>2</sup> each) were analyzed taking into account the number of stained cells per area. Staining intensity was measured as: 0, negative staining; 1+, low staining for up to 1/3 of cells stained; 2+, moderate staining for up to 2/3 of cells stained; and 3+, intense staining for more than 2/3 of cells stained.

## STATISTICAL ANALYSIS

For statistical analysis we used a method where the results were dichotomized as positive (3+ and 2+) or negative (1+ and 0) expression for tumor cells (dos-Santos *et al.* 2014). To evaluate the correlation between the staining patterns and the clinicopathological data we used cross tables applying  $\chi^2$  (chi-square; three or more variables) or Fischer test (two variable), and all tests were 2-tailed. To estimate and compare disease-specific survival, disease-free survival and metastasis-free survival Kaplan-Meier curves using the log-rank test were used. When *p*-value <0.05, result were considered significant. Tests was perfomed with GraphPad Prism version 5.00

(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) and IBM SPSS version 22 (Statistical Product and Service Solutions, IBM Corporation, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Analyzing the clinic pathologic data of the samples we can observed some important points. The average age of the patients with the benign lesion (FIB) was lower than the malignant lesions average, presenting a statistical significant difference ( $p < 0.001$ ). Moreover, when we observed the ages divided in straits, we observed the age of major of patients with FIB is less than 40 years (table 1). We also can observed a statistical difference at the correlation with de menopause status ( $p < 0.001$ ), where most of the benign tumors occurs before the menopause (table 1).

The staining of PWM (figure 1) for polyLacNAc chains was observed at a low amount of breast malignant tumor samples (6.1% at DCIS, 1.8% at IDC and 3.7% at LC), being completely absent at the samples with the benign tumor, and having no one statistically significant difference between the types of lesion (table 2). MGAT5 staining (figure 1) was observed just in a few samples with FIB (9.5%). However, at the malign samples the staining increased, being observed at more than a half of the samples with DCIS (68.7%) and IDC (63.5%) and in almost a third at samples with LC (38.2%) (figure 2). These observations when correlated presents a statistical significant difference, mainly when we compared the FIB samples with carcinoma samples ( $p < 0.0001$  vs IDC and DCIS,  $p = 0.0003$  vs LC) and when compared to LC samples with DCIS ( $p = 0.0029$ ) and IDC ( $p = 0.0119$ ) (table 2).

We observed with more frequency the Gal-3 staining (figure 1), being present in all samples with FIB but less present in carcinoma samples (64.4% at DCIS, 89.8% at IDC and 84.6% at LC) (figure 2). After correlation, the Gal-3 staining was statistical significant comparing FIB samples with DCIS and LC ( $p < 0.0001$ ) and being a tendency correlation when compared to IDC ( $p = 0.0562$ ). It is also observed a correlation at IDC samples with DCIS ( $p = 0.002$ ) and LC ( $p < 0.0001$ ) samples (table 2). It is possible to see yet a nuclear Gal-3 staining at samples with FIB (83.7%), DCIS (60%), IDC (30.6%) and LC (9.6%). All correlations for nuclear Gal-3 staining were statistically significant (table 2).

Correlation the expression of PWM, Gal-3 and MGAT5 staining with the clinic and pathological data was not found any significant statistical difference (data not shown).

Figure 1. Observed results of: (a) PWM detecting the presence of polyLacNAc chains in a sample with CDIS just at the stroma and not at the tumor cells; anti-MGAT5 not detecting the presence of the glycosyltransferase MGAT5 at cells of samples with FIB (b), but detecting at tumor cells in samples with CDIS (b) and LB (d); (e) negative control for MGAT5 detection; anti-Gal-3 detecting the presence of Gal-3 at tumors cell in samples of FIB (f), DCIS (g) and LB (h); (i) negative control for Gal-3 detection.

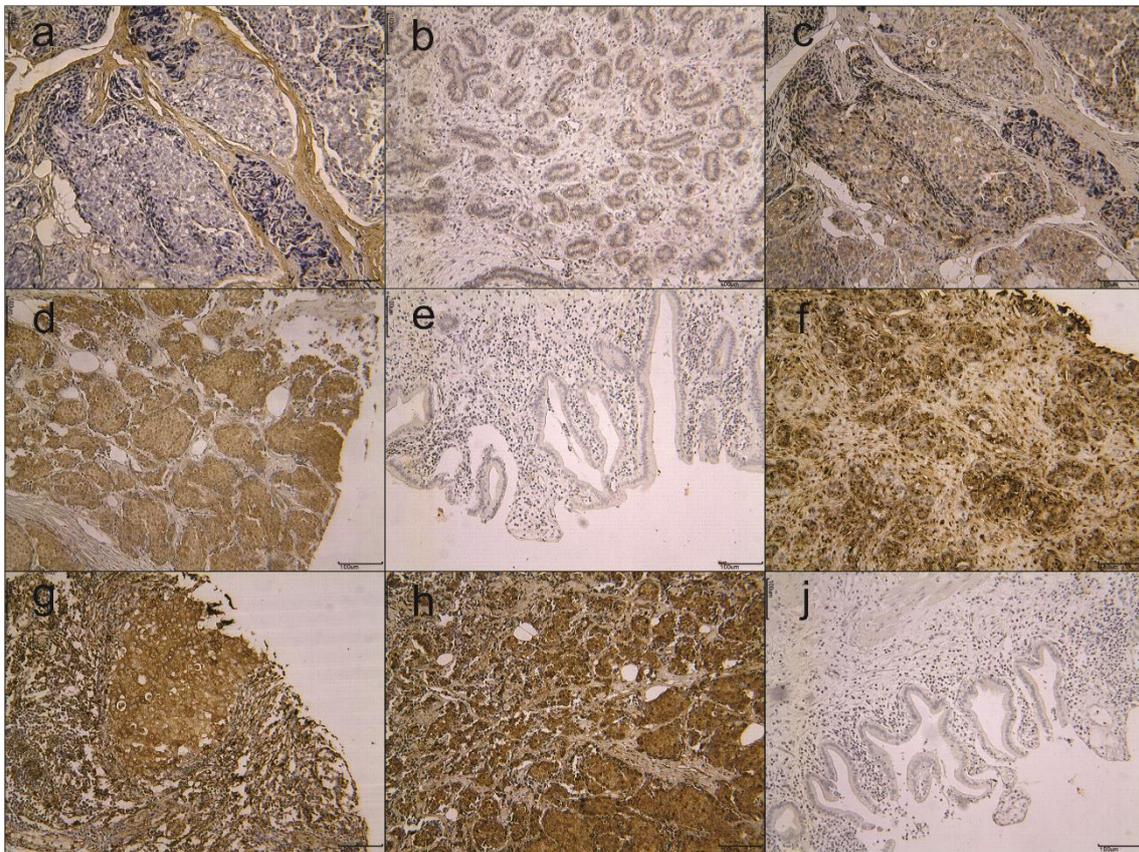


Figure 2. Expression of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 according type of lesion.

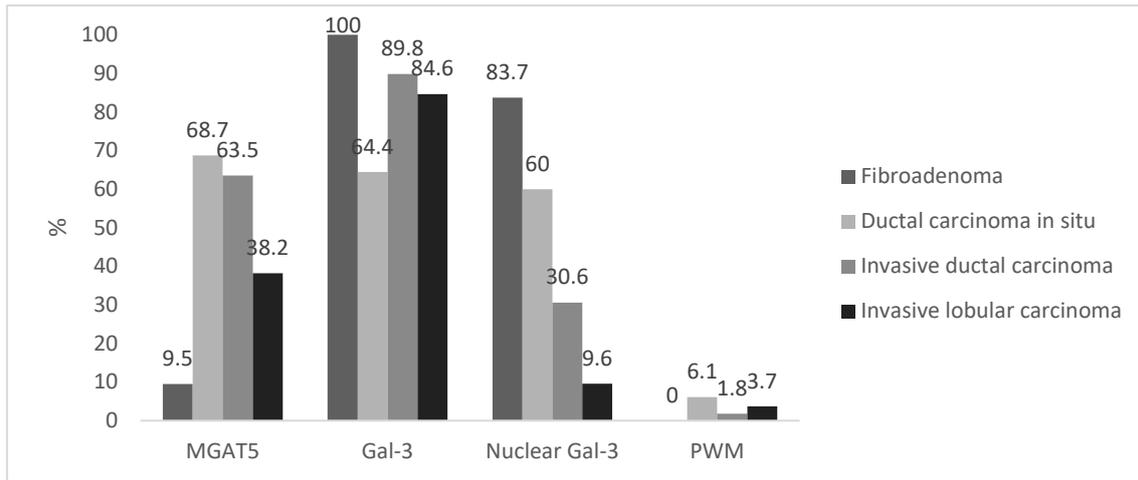


Table 2. Correlation of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 expression by lesion.

Expression	FIB (G1)	DCIS (G2)	P-value G2 versus	IDC (G3)	P-value G3 versus	LC (G4)	P-value G4 versus
MGAT-5							
<b>Positive</b>	6 (9.5%)	33 (68.7%)	<b>G1: &lt;0.0001</b> G3: 0.6739	33 (63.5%)	<b>G1: &lt;0.0001</b>	21 (38.2%)	<b>G1: 0.0003</b>
<b>Negative</b>	57 (90.5%)	15 (31.3%)	<b>G4: 0.0029</b>	19 (36.5%)	<b>G4: 0.0119</b>	34 (61.8%)	
Gal-3							
<b>Positive</b>	49 (100%)	29 (64.4%)	<b>G1: &lt;0.0001</b> <b>G3: 0.002</b>	44 (89.8%)	G1: 0.0562	44 (84.6%)	<b>G1: &lt;0.0001</b>
<b>Negative</b>	0 (-)	16 (35.6%)	G4: 0.4478	5 (10.2%)	<b>G4: &lt;0.0001</b>	8 (15.6%)	
Nuclear Gal-3							
<b>Positive</b>	41 (83.7%)	27 (60.0%)	<b>G1: 0.0122</b> <b>G3: 0.0067</b>	15 (30.6%)	<b>G1: &lt;0.0001</b>	5 (9.6%)	<b>G1: &lt;0.0001</b>
<b>Negative</b>	8 (16.3%)	18 (40.0%)	<b>G4: &lt;0.0001</b>	34 (69.4%)	<b>G4: &lt;0.0117</b>	47 (90.4%)	
PWM							
<b>Positive</b>	0 (-)	3 (6.1%)	G1: 0.0766 G3: 0.3406	1 (1.8%)	G1: 0.4583	2 (3.7%)	G1: 0.2038
<b>Negative</b>	65 (100%)	46 (93.9%)	G4: 0.6668	54 (98.2%)	G4: 0.618	52 (96.3%)	

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study the PWM staining, using lectin histochemistry and its correlation with other biomarkers (MGAT5 and Gal-3) and laboratory routine markers (ER, PR and Her-2) were analyzed in a tissue microarray (TMA) cohort of 234 patients with breast tissue alteration, from benign lesions (FIB) to malignant lesions (DCIS, IDC and LC). Our study focused to evaluate the relationship between the expression of polyLacNAc chains, MGAT5 (a key enzyme to the production of this carbohydrate chain) and Gal-3 (a high affinity ligand for this carbohydrate) comparing with the clinic and histopathological data. We also observed a statistical difference at the age of patients at the moment of disease occurrence. Samples with FIB involved patients with lower age than malignant lesions. This data is according to the literature, since FIB occurs in younger women (Amin *et al.* 2013).

In the past few years, many studies have been published regarding the importance of polyLacNAc expression associated with key roles in vital processes of tumor progression, as differentiation (Qiu *et al.* 2011), hyper proliferation (Kimura *et al.* 2012), immune response (Tsuboi *et al.* 2011) and with more frequency to cancer growth and metastasis (Lau e Dennis 2008, Srinivasan *et al.* 2009, Miyoshi *et al.* 2012). It is also known that the expression of Gal-3 and MGAT5 is closely associated with important steps of cancer progression in breast tissues (Li *et al.* 2008, Boscher *et al.* 2012, Guo *et al.* 2012, Boscher e Nabi 2013). Our results do not show an expressive increasing of polyLacNAc chains in the malignant samples when compared to the benign lesion. Maybe modifications of polyLacNAc chains with other carbohydrate residues could be occurring to generate other carbohydrate antigens, like Thomsen-Friedenreich antigen (Srinivasan *et al.* 2009, Engelstaedter *et al.* 2012). Thereby, the recognition of polyLacNAc chains for the PWM could be blocked for these terminal residues.

Nevertheless, the increased expression of  $\beta$ 1,6-branched oligosaccharides has been associated with invasive and metastatic potential of cancer cells and a subsequent poor prognosis in innumerable human carcinomas (Gao *et al.* 2014, Kinoshita *et al.* 2014, Liu *et al.* 2014, Ni *et al.* 2014), including breast carcinoma (Handerson *et al.* 2005, dos-Santos *et al.* 2014). MGAT5 expression displays distinct functions in different tumors, according to the type of tissue's origin (Kimura *et al.* 2012). In breast

cancer, dos-Santos *et al* (dos-Santos *et al.* 2014) using tissue microarray of DCIS and IDC samples, observed an expression of MGAT5 at significant amount of samples (61,2% for DCIS and 48% for IDC), but not showing any significant biological importance when compared with clinicopathological data.

Guo *et al* (Guo *et al.* 2010) used cell culture of MCF-10A cells and her-2 transgenic mouse to evaluate the influence of MGAT5 expression. After transfecting the cells, the overexpression of MGAT5 increased the proliferation and the expression of Ki-67, a marker of proliferation. Using MGAT5 knockout null mice they observed a reduced of tumor formation in order of 50%, of the histological grade and mitotic index and of the expression of Ki-67. Our results show a higher expression of MGAT5 at the malignant samples, but like dos-Santos *et al* (dos-Santos *et al.* 2014) do not observed significant correlations between the clinic pathologic data (data not shown). Corroborating with the literature, our results reinforce the possible key role of MGAT5 in the tumor progression of breast cancer.

It is knowledgeable that Gal-3 plays a range of roles in cancer, from initiation, progression to drug resistance, according on tumor type (Ilmer *et al.* 2016). Its expression has been both correlated positively and negatively with tumor progression in breast cancer, according where its expression is observed (Zhang *et al.* 2014, Ilmer *et al.* 2016, Pereira *et al.* 2016). In FIB lesions, Gal-3 is also a present element in the transformed cells (Gallegos *et al.* 2012). This data reinforces the relation of Gal-3 with transformation of cells and tumor progression since was observed an elevate number of samples with a high expression of Gal-3, including the samples with FIB. Interestingly, samples with the lower expression of Gal-3 were DCIS. This can be explained maybe for a lower grade of growth when compared with the other samples and/or the more association of the Gal-3 with the capacity on invasion (Yamaki *et al.* 2013), whereas the FIB present the higher levels maybe correlating with a higher grade of growth found in this type of transformation. Additionally, was found a nuclear expression of Gal-3 in higher levels in the benign lesions and decreasing with the increasing of the grade of the lesion. Like MGAT5, wasn't observed significant correlations of the Gal-3 expression with the clinic pathologic data (data not shown).

Results showed that most samples of breast transformation were PWM negative. However, it is important to note the differences in the expression of MGAT5 and Gal-3 according to the lesion type. It is markedly visible how MGAT5 is higher expressed in

the maligning lesions when compared with the benign lesions ( $p < 0,001$  at all correlation) suggesting the involvement of this enzyme in the progression of breast cancer tumors and a mark of a poor prognosis. It's also observed a higher expression of Gal-3 in the all tumors, with a quite lower expression in the samples with CDIS, especially when compared with the lesions of FIB ( $p < 0,001$ ) and IDC ( $p = 0,007$ ), and a decreasing nuclear expression of Gal-3 according the increasing of the grade of the lesion. It is known Gal-3 is strongly correlated with the progression and the observed data contribute to the literature, showing higher levels of Gal-3 in breast tumor samples.

This study was the first in the literature that observed the expression of polyLacNAc, MGAT5 and Gal-3 in different grade of lesions of breast tumors, including a benign tumor, and to show important differences in the expression of MGAT5 and Gal-3 according the type of breast tumor. Results suggest the use of MGAT5 and Gal-3, especially the MGAT5, in the routine of diagnostic and prognostic for breast cancer transformation. However, it is important to continue to study deep these markers to understand better their roles at the progression in breast cancer transformations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior, Brazil) for scholarship, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) for financial support.

## DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST

None.

## REFERENCES

- Adamczyk, B., T. Tharmalingam and P. M. Rudd (2012). "Glycans as cancer biomarkers." Biochim Biophys Acta **1820**(9): 1347-1353.
- Amin, A. L., A. C. Purdy, J. D. Mattingly, A. L. Kong and P. M. Termuhlen (2013). "Benign breast disease." Surg Clin North Am **93**(2): 299-308.
- Boscher, C. and I. R. Nabi (2013). "Galectin-3- and phospho-caveolin-1-dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF mitogenic response in mammary cancer cells." Mol Biol Cell **24**(13): 2134-2145.
- Boscher, C., Y. Z. Zheng, R. Lakshminarayan, L. Johannes, J. W. Dennis, L. J. Foster and I. R. Nabi (2012). "Galectin-3 protein regulates mobility of N-cadherin and GM1 ganglioside at cell-cell junctions of mammary carcinoma cells." J Biol Chem **287**(39): 32940-32952.
- Christiansen, M. N., J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J. L. Abrahams and N. H. Packer (2014). "Cell surface protein glycosylation in cancer." Proteomics **14**(4-5): 525-546.
- Clark, A. T., V. M. Guimaraes da Costa, L. Bandeira Costa, C. L. Bezerra Cavalcanti, M. J. De Melo Rego and E. I. Beltrao (2014). "Differential expression patterns of N-acetylglucosaminyl transferases and polylactosamines in uterine lesions." Eur J Histochem **58**(2): 2334.
- dos-Santos, P. B., J. S. Zanetti, G. S. Vieira-de-Mello, M. B. Rego, A. A. Ribeiro-Silva and E. I. Beltrao (2014). "Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool." Int J Clin Exp Pathol **7**(5): 2337-2349.
- dos-Santos, P. B., J. S. Zanetti, G. S. Vieira-de-Mello, M. B. M. Rêgo, A. R.-S. A and E. I. C. Beltrão (2014). "Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool." International Journal of Clinical and Experimental Pathology **7**(5): 2337-2349.

- Engelstaedter, V., B. Fluegel, S. Kunze, D. Mayr, K. Friese, U. Jeschke and F. Bergauer (2012). "Expression of the carbohydrate tumour marker Sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y and Thomsen-Friedenreich antigen in normal squamous epithelium of the uterine cervix, cervical dysplasia and cervical cancer." Histol Histopathol **27**(4): 507-514.
- Fortuna-Costa, A., A. M. Gomes, E. O. Kozlowski, M. P. Stelling and M. S. Pavao (2014). "Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis." Front Oncol **4**: 138.
- Gallegos, I. B., E. Perez-Campos, M. Martinez, M. A. Mayoral, L. Perez, S. Aguilar, E. Zenteno, S. Pina Mdel and P. Hernandez (2012). "Expression of antigen tf and galectin-3 in fibroadenoma." BMC Res Notes **5**: 694.
- Gao, L., L. Shen, M. Yu, J. Ni, X. Dong, Y. Zhou and S. Wu (2014). "Colon cancer cells treated with 5fluorouracil exhibit changes in polylactosaminetype Nglycans." Mol Med Rep **9**(5): 1697-1702.
- Glavey, S. V., D. Huynh, M. R. Reagan, S. Manier, M. Moschetta, Y. Kawano, A. M. Roccaro, I. M. Ghobrial, L. Joshi and M. E. O'Dwyer (2015). "The cancer glycome: carbohydrates as mediators of metastasis." Blood Rev **29**(4): 269-279.
- Guo, H., A. Nairn, M. dela Rosa, T. Nagy, S. Zhao, K. Moremen and M. Pierce (2012). "Transcriptional regulation of the protocadherin beta cluster during Her-2 protein-induced mammary tumorigenesis results from altered N-glycan branching." J Biol Chem **287**(30): 24941-24954.
- Guo, H. B., H. Johnson, M. Randolph, T. Nagy, R. Blalock and M. Pierce (2010). "Specific posttranslational modification regulates early events in mammary carcinoma formation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(49): 21116-21121.
- Handerson, T., R. Camp, M. Harigopal, D. Rimm and J. Pawelek (2005). "Beta1,6-branched oligosaccharides are increased in lymph node metastases and predict poor outcome in breast carcinoma." Clin Cancer Res **11**(8): 2969-2973.
- Hauselmann, I. and L. Borsig (2014). "Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis." Front Oncol **4**: 28.

- Henion, T. R. and G. A. Schwarting (2014). "N-linked polylectosamine glycan synthesis is regulated by co-expression of beta3GnT2 and GCNT2." J Cell Physiol **229**(4): 471-478.
- Ilmer, M., N. Mazurek, M. Z. Gilcrease, J. C. Byrd, W. A. Woodward, T. A. Buchholz, K. Acklin, K. Ramirez, M. Hafley, E. Alt, J. Vykoukal and R. S. Bresalier (2016). "Low expression of galectin-3 is associated with poor survival in node-positive breast cancers and mesenchymal phenotype in breast cancer stem cells." Breast Cancer Res **18**(1): 97.
- Kimura, A., M. Terao, A. Kato, T. Hanafusa, H. Murota, I. Katayama and E. Miyoshi (2012). "Upregulation of N-acetylglucosaminyltransferase-V by heparin-binding EGF-like growth factor induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia." Exp Dermatol **21**(7): 515-519.
- Kinoshita, M., Y. Mitsui, N. Kakoi, K. Yamada, T. Hayakawa and K. Kakehi (2014). "Common glycoproteins expressing polylectosamine-type glycans on matched patient primary and metastatic melanoma cells show different glycan profiles." J Proteome Res **13**(2): 1021-1033.
- Lau, K. S. and J. W. Dennis (2008). "N-Glycans in cancer progression." Glycobiology **18**(10): 750-760.
- Li, D., Y. Li, X. Wu, Q. Li, J. Yu, J. Gen and X. L. Zhang (2008). "Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4+ T cells and macrophages." J Immunol **180**(5): 3158-3165.
- Liu, J., L. Shen, L. Yang, S. Hu, L. Xu and S. Wu (2014). "High expression of beta3GnT8 is associated with the metastatic potential of human glioma." Int J Mol Med **33**(6): 1459-1468.
- Ma, H., X. Miao, Q. Ma, W. Zheng, H. Zhou and L. Jia (2013). "Functional roles of glycogene and N-glycan in multidrug resistance of human breast cancer cells." IUBMB Life **65**(5): 409-422.
- Maxmen, A. (2012). "The hard facts." Nature **485**(7400): S50-51.
- Mittal, S., H. Kaur, N. Gautam and A. K. Mantha (2017). "Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies." Biosens Bioelectron **88**: 217-231.

- Miyoshi, E., M. Terao and Y. Kamada (2012). "Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V(GnT-V) in mice." BMB Rep **45**(10): 554-559.
- Munkley, J. and D. J. Elliott (2016). "Hallmarks of glycosylation in cancer." Oncotarget **7**(23): 35478-35489.
- Ni, J., Z. Jiang, L. Shen, L. Gao, M. Yu, X. Xu, S. Zou, D. Hua and S. Wu (2014). "beta3GnT8 regulates the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by altering the glycosylation of CD147." Oncol Rep **31**(4): 1795-1801.
- Nio-Kobayashi, J. (2016). "Tissue- and cell-specific localization of galectins, beta-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease." Anat Sci Int.
- Pereira, J. X., M. C. Azeredo, F. S. Martins, R. Chammas, F. L. Oliveira, S. N. Santos, E. S. Bernardes and M. C. El-Cheikh (2016). "The deficiency of galectin-3 in stromal cells leads to enhanced tumor growth and bone marrow metastasis." BMC Cancer **16**: 636.
- Pinho, S. S. and C. A. Reis (2015). "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications." Nat Rev Cancer **15**(9): 540-555.
- Qiu, H., W. M. Duan, J. Shu, H. X. Cheng, W. P. Wang, X. E. Huang and H. L. Chen (2014). "B3GNT2, a polylactosamine synthase, regulates glycosylation of EGFR in H7721 human hepatocellular carcinoma cells." Asian Pac J Cancer Prev **15**(24): 10875-10878.
- Qiu, H., S. L. Wu, X. H. Guo, H. J. Shen, H. P. Zhang and H. L. Chen (2011). "Expression of beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferases during differentiation of human acute myeloid leukemia cells." Mol Cell Biochem **358**(1-2): 131-139.
- Ruvolo, P. P. (2016). "Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment." Biochim Biophys Acta **1863**(3): 427-437.
- Shen, L., M. Yu, X. Xu, L. Gao, J. Ni, Z. Luo and S. Wu (2014). "Knockdown of beta3GnT8 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells via inhibition the biosynthesis of polylactosamine-type N-glycans." Int J Oncol **45**(6): 2560-2568.
- Srinivasan, N., S. M. Bane, S. D. Ahire, A. D. Ingle and R. D. Kalraiya (2009). "Poly N-acetylglucosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-

Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3." Glycoconj J **26**(4): 445-456.

Stowell, S. R., T. Ju and R. D. Cummings (2015). "Protein glycosylation in cancer." Annu Rev Pathol **10**: 473-510.

Tsuboi, S., M. Sutoh, S. Hatakeyama, N. Hiraoka, T. Habuchi, Y. Horikawa, Y. Hashimoto, T. Yoneyama, K. Mori, T. Koie, T. Nakamura, H. Saitoh, K. Yamaya, T. Funyu, M. Fukuda and C. Ohyama (2011). "A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans." Embo j **30**(15): 3173-3185.

Yamaki, S., T. Fujii, R. Yajima, T. Hirakata, S. Yamaguchi, T. Fujisawa, S. Tsutsumi, T. Asao, Y. Yanagita, M. Iijima and H. Kuwano (2013). "Clinicopathological significance of decreased galectin-3 expression and the long-term prognosis in patients with breast cancer." Surg Today **43**(8): 901-905.

Zhang, H., M. Luo, X. Liang, D. Wang, X. Gu, C. Duan, H. Gu, G. Chen, X. Zhao, Z. Zhao and C. Liu (2014). "Galectin-3 as a marker and potential therapeutic target in breast cancer." PLoS One **9**(9): e103482.



## CONCLUSÕES GERAIS

- Foi observado apenas uma expressão de cadeias de polilactosaminas através de histoquímica com lectinas, utilizando a lectina PWM, apenas nas amostras de lesões de colo uterino, onde houve níveis mais elevados com o aumento do grau de transformação, sugerindo assim o uso dessa molécula como biomarcador para diagnóstico desses tipos de lesão.
- A expressão de GlcNAc observada utilizando histoquímica com lectina (WGA) foi maior nas amostras com NIC 1, havendo uma diminuição de sua expressão com o aumento do grau da lesão, o que pode estar associado com o aparecimento de outros antígenos de carboidratos.
- A expressão de  $\beta$ 3Gn-T2 e  $\beta$ 3Gn-T3 se apresentaram de maneira diferente. Enquanto  $\beta$ 3Gn-T3 quase não foi encontrada nos tecidos uterinos,  $\beta$ 3Gn-T2 foi expressa em maior quantidade nos tecidos uterinos com algum tipo de lesão, havendo ainda um aumento da expressão com o aumento do grau da lesão e diminuindo com o grau máximo da lesão (carcinoma), sugerindo assim que  $\beta$ 3Gn-T2 pode estar envolvida no processo de progressão de lesões uterinas e seu uso como potencial biomarcador para prognóstico e/ou diagnóstico desses tipos de lesão.
- A expressão de MGAT5 foi observada em maiores quantidades nos tecidos mamários com transformações malignas quando comparadas as lesões de fibroadenoma, sugerindo que a MGAT5 pode estar envolvida no processo de progressão tumoral do tecido mamário, tendo um destaque nas amostras de carcinomas ductais, sugerindo assim o uso de MGAT5 como potencial biomarcador para prognóstico e/ou diagnóstico desses tipos de lesão.
- A expressão de galectina-3 foi observada nos tecidos mamários transformados, sendo menos expressa nas amostras com transformações malignas, em especial nos carcinomas ductais *in situ*, o que sugere que uma diminuição da expressão de galectina-3 pode estar associada ao ganho de vantagens biológicas e aumento do potencial metastático.
- Não foram observadas nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a expressão das enzimas e os dados clínico patológicos das amostras de tecidos estudados.