

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Arthur Tenorio Ribeiro Clark

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE N-ACETILGLUCOSAMINIL
TRANSFERASES EM TECIDOS UTERINOS HUMANOS
NORMAIS E TRANSFORMADOS**

Recife, 2012

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

C592a Clark, Arthur Tenorio Ribeiro

Avaliação da expressão de N-acetilglucosaminil transferases em tecidos uterinos humanos normais e transformados / Arthur Tenorio Ribeiro Clark. – Recife: O Autor, 2012.

53 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2012.

Inclui referências e anexos

1. Proteínas 2. Lectinas 3. Útero – Câncer I. Beltrão, Isidoro Carneiro (orientador) II. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-317

Arthur Tenorio Ribeiro Clark

**Avaliação da expressão de *N*-acetilglucosaminil
transferases em tecidos uterinos humanos
normais e transformados**

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

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Recife, 2012

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-reitor

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

Pró-reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-graduação

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

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

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Folha de Aprovação

Nome: Clark, Arthur Tenorio Ribeiro

Título: Avaliação da expressão de *N*-acetilglucosaminil transferases em tecidos uterinos humanos normais e transformados

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

Aprovada em 03 de agosto de 2012

Banca examinadora

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

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Paloma Lys Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe, que dedicou todos os seus esforços a minha criação e educação, sempre tendo em vista o melhor para mim, apesar de todas as dificuldades que bateram a nossa porta. Mãe, muito obrigado por não medir esforços e permitir que eu alcançasse mais uma etapa da minha vida!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Beltrão, e a todos os do grupo Biomarcadores no Câncer, por terem me recebido e fazerem me sentir bem, por estarem sempre dispostos à partilharem conhecimentos, multiplicando os meus, por sempre estarem disponíveis quando necessitados, pela paciência que tiveram comigo, pelos momentos de harmonia vividos no laboratório e pelo incentivo e apoio que tornaram possíveis a produção deste trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), Prof. Dr. Luiz Carvalho, por ter me recebido no programa de braços abertos, por sempre me fazer à vontade, por ser solícito a qualquer momento e pela sua alegria contagiante, e em nome dele a todos os professores do programa.

A todos os meus amigos do PPGBAS, do Clube Português do Recife, da Primeira Igreja Batista em Cidade Universitária, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, que durante esses dois anos me propiciaram momentos de construção e aprendizado, e que de algum modo contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus familiares, em especial, aos meus irmãos, Charles e Dayana, a minha mais nova família, representada por Vivyanne Garziera e Vera Lúcia, que a mais de um ano me receberam de braços abertos, e a minha companheira de todos os momentos, Sabrina Ferreira.

A todos, muito obrigado!

Resumo

Poli-*N*-lactosamina (poliLacNAc) é uma estrutura fundamental nos glicoconjugados expressa especificamente em células/tecidos de forma associada ao desenvolvimento e carcinogênese. Beta-1,3-*N*-acetilglucosaminil transferases (β 3GnTs) possuem um importante papel na síntese de poliLacNAc, entretanto a ação das β 3GnTs na síntese *in vivo* continuam desconhecidos. A expressão de duas glicosiltransferases, β 3GnT2 e β 3GnT3, foram avaliadas em amostras cervicais uterinas normais e com lesões malignas (carcinoma escamoso) e pré-malignas (NIC 1, 2 e 3) usando imunohistoquímica. Histoquímica com lectinas, com *Phytolacca americana* lectin (PWM) e *Wheat germ* agglutinin (WGA), também foi realizada para a análise da presença de cadeias de poliLacNAc e de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), respectivamente. β 3GnT3 foi expressa em quase todas as amostras (99%) e β 3GnT2 foi mais expressa nas amostras com lesões ($p = 0,0093$). A expressão de poliLacNAc ($p = 0,0002$) e GlcNAc ($p = 0,0001$) também se mostrou mais frequente nas amostras com lesões. Nossos dados sugerem que a β 3GnT2 seja a principal enzima responsável pela síntese de cadeias de poliLacNAc na cérvix uterina e que ela possa ser utilizada como um potencial biomarcador para a presença de lesões.

Palavras-chave: câncer, expressão, lectina, *N*-acetilglucosaminiltransferase, poli-*N*-acetillactosamina.

Abstract

Polylactosamine (polyLacNAc) is a fundamental structure in glycoconjugates and expressed in specific cells/tissues associated with development and carcinogenesis. β 3GnTs play an important role in synthesis of polyLacNAc, however the roles of these β 3GnTs *in vivo* synthesis are still unclear. The expression of two glycosyltransferases, β 3GnT2 and β 3GnT3, were evaluated in normal, malignant (squamous carcinoma) and premalignant (CIN 1, 2 and 3) lesions of uterine cervix samples using immunohistochemistry. 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. β 3GnT3 was expressed in almost all samples (99%) and β 3GnT2 was higher expressed in disease samples ($p = 0,0093$). The expression of polyLacNAc ($p = 0,0002$) and GlcNAc ($p = 0,0001$) also showed most frequently in lesion samples. Our data suggest that β 3GnT2 is the major enzyme responsible for the synthesis of polyLacNAc chains in uterine cervix and can be used as a potential biomarker for the presence of lesions.

Key-words: cancer, expression, lectin, *N*-acetylglucosaminyltransferase, poly-*N*-acetyllactosamine.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Immunohistochemistry and lectin histochemistry (a) of lesions of human uterine cervix tissues and their respective negative controls (b): (1) immunohistochemistry of squamous cells carcinoma using anti- β 3GnT2; (2) immunohistochemistry CIN grade 2 using anti- β 3GnT3; (3) lectin histochemistry of CIN grade 1 using PWM; (4) lectin histochemistry of CIN grade 2 using WGA; (3c) lectin histochemistry using PWM of squamous cells carcinoma showing a positive marking in nucleus.**Erro! Indicador não definido.**

Lista de Tabelas

Tabela I: Expression of β 3GnT2, GlcNAC and polyLacNAc in uterine cervix samples. **Erro!**

Indicador não definido.

Lista de Abreviaturas e Siglas

β 3GalT: β 1,3-*N*-acetilgalactosaminil transferase

β 3GnT: β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase

β 3GnT1: β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase 1

β 3GnT2: β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase 2

β 3GnT3: β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase 3

Asn: Asparagina

CCE: Carcinoma de células escamosas

Cys: Cisteína

dsT: Antígeno disialil-T

Fuc: Fucose

Gal: Galactose

GalNAc: *N*-acetilgalactosamina

Glc: Glucose

GlcNAc: *N*-acetilglucosamina

GT: Glicosiltransferase

HSIL: Lesão intraepitelial de alto grau (*High-grade squamous intraepithelial lesion*)

HPV: Papilomavírus humano

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HSV: Vírus da imunodeficiência símea

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LacNAc: *N*-acetillactosamina

LSIL: Lesão intraepitelial de baixo grau (*Low-grade squamous intraepithelial lesion*)

Man: Manose

Neu5Ac: Ácido siálico

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

poliLacNAc: Poli-*N*-acetillactosamina

ppGalNAcT: polipeptídeo UDP-*N*-acetilgalactosaminil transferase

Pro: Prolina

PWM: Lectin from *Phytolacca americana*

RE: Retículo Endoplasmático

Ser: Serina

sLe^a: Antígeno sialil-Lewis^a

sLe^x: Antígeno sialil-Lewis^x

sT: Antígeno sialil-T

sTn: Antígeno sialil-Tn

Thr: Treonina

UDP: Uridina difosfato

WGA: *Wheat germ agglutinin*

WHO: Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

Sumário

Introdução	12
Revisão da Literatura	13
Glicocálice	13
Síntese de glicanos	14
Glicoproteínas	15
Poli-N-acetil lactosaminas	17
Glicosiltransferases	18
N-acetilglucosaminil transferases	19
β3GnT2 e β3GnT3	20
Biomarcadores glicídicos no câncer	22
Lectinas	24
Câncer	25
Câncer de colo uterino	28
Objetivos	31
Geral	31
Específicos	31
Referências	32
Artigo	36
Abstract	37
Introduction	38
Materials and Methods	40
Results and Discussion	41
References	44
Tables	50
Acknowledgments	51
Figures and legends	52

Introdução

Por mais de um século, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos têm atraído a atenção dos pesquisadores no mundo todo. Os carboidratos, talvez por serem altamente complexos e não codificados no genoma, têm recebido apenas recentemente um aumento da atenção por causa da expansão da glicobiologia (Ghazarian *et al.*, 2011).

O glicoma, que é o derivado de glicanos e análogo ao proteoma e ao genoma, é definido como todos os componentes glicídicos de um sistema biológico, sendo a glicômica responsável pelo estudo de todos os glicanos expresso nesse sistema. A biossíntese destes glicanos depende de um enorme número de processos competitivos envolvendo glicosiltransferases (GTs). A glicosilação, em si, é um processo altamente sensível ao ambiente bioquímico e isso tem implicações em muitas doenças, incluindo o câncer (An *et al.*, 2009).

Um dos novos papéis das enzimas, na medicina personalizada, baseia-se na abordagem racional da descoberta de biomarcadores cancerígenos usando glicosilação aberrantes. Sendo esta uma das marcas do câncer, ela está associada a diferentes expressões de enzimas como GTs e glicosidases. Um padrão de expressão modificado leva as células cancerígenas a produzir glicoproteínas com alterações específicas nas estruturas do glicanos (Meany and Chan, 2011).

FALAR UM POUCO DAS POLI-N-ACETILLACTOSAMINAS.

Neste estudo, tentaremos fornecer um conhecimento básico da estrutura de glicanos celulares, sua biossíntese, a importância das poliLacNAcs, sua estrutura e síntese, algumas enzimas envolvidas e sua importância no câncer.

Revisão da Literatura

Glicocálice

Estudos microscópicos de células eucarióticas, bem como de bactérias, revelaram uma estrutura em comum, descrita primeiramente como um “revestimento açucarado celular”, na forma de membranas basais ou paredes celulares, sendo posteriormente chamada de glicocálice. Inicialmente, foi sugerido que esse revestimento polissacarídico servisse, principalmente, para proteger a célula e atuar como um dispositivo de filtração e ligação seletiva, moldando assim o microambiente acima da membrana plasmática (Gabius *et al.*, 2011).

O glicocálice animal é composto por uma complexa rede de glicoconjugados com extensa glicosilação, tanto na frequência quanto no tamanho das cadeias. Ele e a matriz extracelular são duas plataformas bioquímicas para uma infinidade de processos regulatórios e comunicativos e servem para garantir a integridade e a operabilidade dos sistemas orgânicos (Gabius *et al.*, 2011).

Dado ao espaço com limitações óbvias, uma alta densidade de codificação é requerida. Então, devido à capacidade insuperável de carboidratos, quanto a este respeito, a natureza abundante de glicosilação, bem como a complexidade e dinâmica do glicofenótipo, os glicanos se qualificam para dotar adequadamente a superfície das células com uma caixa de ferramentas necessárias para gerar biosinais em qualidade e quantidade necessárias. Sugerindo assim a existência de um sistema de codificação com base nos carboidratos (Gabius *et al.*, 2011).

A partir de uma unidade de açúcar simples, cadeias de glicanos nos glicoconjugados podem ser extremamente diversificadas em termos de ramificação e comprimento, de modo que o glicoma abranja uma ampla gama de estruturas (Gabius *et al.*, 2011). Estas podem modular as propriedades físico-químicas dos conjugados e participar diretamente em vários processos biológicos de reconhecimento importantes, tais como adesão celular, progressão do câncer, interações patógeno-hospedeiro, receptor-ligante, célula-célula, carboidrato-carboidrato e respostas imune (Chen *et al.*, 2007; Togayachi *et al.*, 2007; Wang and Huang, 2009).

A maioria dos oligossacarídeos existe na forma de glicoproteínas e glicolipídeos, muitos dos quais são localizados na superfície celular. Estes são extremamente ricos em variações estruturais, configurações anoméricas e posições de ligações; estas variam muito dependendo da espécie, tecido e grau de diferenciação celular (Shimma *et al.*, 2006). Refletindo as observações microscópicas e a nível bioquímico, a conjugação de açúcares a proteínas, por exemplo, com um total de 13 monossacarídeos e 8 aminoácidos, forma pelo menos 41 tipos de ligações glicosídicas (Gabiús *et al.*, 2011).

Diferentes resíduos de carboidratos podem alterar a disposição de certos grupos químicos, como grupos de hidroxila, e pontos para interações hidrofóbicas, influenciando assim o potencial de contatos possíveis entre estruturas. Esses pontos de contato podem ser reconhecidos particularmente por cadeias laterais de aminoácidos. Vem então crescendo a conscientização de que o significado do resíduo glicosil é dar um papel reconhecível, ou seja, dar as moléculas sinais ativos, com capacidade de codificar informações, capacidade essa até então atribuída exclusivamente às proteínas (Gabiús *et al.*, 2011).

Síntese de glicanos

A glicosilação, um processo essencial nas células eucarióticas (Freeze and Aebi, 2005), é uma modificação pós-traducional, sendo uma estratégia eficaz para expandir a informação biológica de biomoléculas pela adição de um novo nível de estrutura (Wang and Huang, 2009; Reis *et al.*, 2010), ampliando assim o leque de funcionalidades destas, incluindo as proteínas (Gabiús *et al.*, 2011).

Ela se faz através de uma ligação covalente de um carboidrato a proteínas e lipídeos, catalisada por GTs e usando substratos doadores de açúcar específicos. Portanto, os glicanos são encontrados em vários tipos de biomoléculas que podem ser classificadas em diferentes famílias de glicoconjugados: glicoproteínas, glicoesfingolipídeos, proteoglicanos e proteínas ligadas a glicosilfosfatidilinositol (Reis *et al.*, 2010).

Quando comparado diretamente com oligonucleotídeos e peptídeos em termos de capacidade de codificação, o número de isômeros de oligossacarídeos construído a partir de

um conjunto de monossacarídeos é de várias ordens de magnitude maior (4096 oligonucleotídeos, 6.4×10^6 peptídeos e 1.44×10^{15} sacarídeos) (Gabiús *et al.*, 2011).

Além disto, possibilidades para as duas configurações anoméricas (α/β), formação de ligações via ligantes de diferentes posições (1 \rightarrow 1,2,3,4, 6 para a hexopiranosose, por exemplo), mudança no tamanho do anel (piranosose, furanosose), bem como a introdução de ramificação e adicionais substituições sítio específicas, como a fosforilação, acetilação ou sulfatação aumentam ainda mais essa excepcional diversidade estrutural. Tornando assim os carboidratos as moléculas ideais para a geração de unidades compactas com explícita capacidade informativa (Gabiús *et al.*, 2011).

Glicoproteínas

Existem dois tipos de glicanos em glicoproteínas: *N*- e *O*-glicanos. Ambos os tipos de glicosilação muitas vezes coexistem na mesma proteína e na mesma célula. *N*-glicosilação consiste de uma cadeia de oligossacarídeos *N*-ligados à asparagina contida na sequência asparagina (Asn)-X-serina/treonina (Ser/Thr), onde X é qualquer aminoácido exceto prolina (Pro). Em raros casos, a sequência Asn-X-cisteína (Cys) também é usada (Reis *et al.*, 2010).

A *N*-glicosilação requer a produção de um precursor de oligossacarídeos, que é transferido em bloco para proteínas nascentes no Retículo Endoplasmático (RE). Em proteínas, ela ocorre em dois distintos compartimentos celulares: no RE e no Complexo de Golgi. No primeiro, um núcleo de oligossacarídeos, composto de três Glc, nove manoses (Man) e duas *N*-acetilglucosaminas (GlcNAc), é montado em um lipídeo transportador, o dolicolpifosfato, e posteriormente, transferido para resíduos selecionados de aminoácidos de cadeias polipeptídicas nascentes (Freeze and Aebi, 2005; Reis *et al.*, 2010).

A biossíntese desse lipídeo ligado ao núcleo de oligossacarídeo em si só é um processo bipartido que começa no lado citoplasmático e termina do lado luminal da membrana do RE. Monossacarídeos são transferidos ao lipídeo transportador, por GTs altamente específicas. Para a ligação covalente dos primeiros sete açúcares, nucleotídeos ativados de GlcNAc ou Man servem como substrato doador para as GTs citoplasmáticas. Esse

intermediário é então translocado para o lúmen do RE, onde mais quatro resíduos de Man e três resíduos de Glc são adicionados (Freeze and Aebi, 2005).

A segunda fase do processo de glicosilação envolve a remoção ordenada de monossacarídeos selecionados dessa ligação feita à proteína, e subsequentemente adição de outros monossacarídeos no RE e no Complexo de Golgi. Após a transferência, o oligossacarídeo ligado à proteína cumpre funções específicas no dobramento da glicoproteína, controle de qualidade, secreção e degradação no RE (Freeze and Aebi, 2005).

Ela se inicia logo após a transferência do glicanos e é iniciada pela remoção dos dois primeiros resíduos de Glc, seguida pela remoção reversível e readição da terceira Glc. Dentro do RE e do Complexo de Golgi, até cinco unidades de Man são removidas e vários resíduos de GlcNAc, galactose (Gal), ácidos siálico (Neu5Ac) e fucose (Fuc) são adicionados (Freeze and Aebi, 2005).

Para cada adição, doadores ativados devem ser transportados para dentro do aparelho de Golgi por transportadores açúcar-nucleotídeos. A ordem é conhecida, mas não é moldedirigida. Isto gera um amplo espectro de estruturas *N*-glicanas, já que as células variam a expressão e organização deste conjunto de enzimas biosintéticas. Além disso, algumas enzimas competem pelo mesmo substrato em pontos de ramificação dentro dessa via. Dependendo da abundância, afinidade ou localização, GTs dominantes podem favorecer ou impedir a síntese de glicanos selecionados quando as proteínas se movem através do Complexo de Golgi (Freeze and Aebi, 2005).

A *O*-glicosilação é o outro tipo de glicosilação encontrada em glicoproteínas e consiste em um glicano *O*-ligado a um resíduo de serina ou treonina. A frequência de *O*-glicosilação em glicoproteínas é elevada, particularmente em mucinas secretadas ou ligadas à membrana, já que são ricas em Ser e Thr (Reis *et al.*, 2010).

O primeiro passo para a *O*-glicosilação tipo mucina é a transferência de um doador de açúcar uridina difosfato-*N*-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) para os resíduos de Ser ou Thr e que é controlada pelas UDP-*N*-acetilgalactosaminil transferases (ppGalNAc-Ts). Elas controlam o primeiro nível de complexidade da glicosilação da mucina, ou seja, os locais e densidade de ocupação dos *O*-glicanos. Isso porque as ppGalNAc-Ts, embora catalisem o mesmo passo

enzimático, mostram diferentes especificidade, expressão tecidual, substrato receptor e propriedades cinéticas (Reis *et al.*, 2010).

O segundo segundo nível de complexidade de O-glicosilação em mucinas destaca-se o processamento das cadeias de carboidratos por outras GTs. Após o primeiro glicano, a GalNAc, ser adicionado, é formado o antígeno Tn e pela adição de uma Gal à GalNAc, uma estrutura núcleo tipo 1 é formada, o antígeno T. Alternativamente, os antígenos T e Tn podem ser sinalizados por sialiltransferases formando antígenos sialil-Tn (sTn), sialil-T (sT) e disialil-T (dsT) (Reis *et al.*, 2010).

Outra estrutura núcleo comum, que é presente em células normais, contém uma ramificação GlcNAc ligada ao núcleo tipo 1, que é denominado núcleo tipo 2. Essa estrutura é produzida em muitas células epiteliais e hematopoiéticas. Antígenos de Lewis e de grupos sanguíneos baseados em glicanos são estruturas terminais comuns que são presentes nas mucinas como também em outros glicoconjugados (Reis *et al.*, 2010).

Poli-N-acetil lactosaminas

PoliLacNac é uma cadeia linear de glicanos, consistindo na repetição de unidades de N-acetilactosaminas (LacNAc) $(\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3)_n$. Essa cadeia de glicanos ocorre em glicoesfingolípídeos e cadeias de glicanos N- e O-ligados em glicoproteínas específicas (Chen *et al.*, 2001; Seko and Yamashita, 2008). Em alguns casos, os grupos 3-OH e/ou 6-OH dos resíduos de Gal e GlcNAc são modificados com Neu5Ac, Fuc e/ou resíduos de sulfato, que servem como determinantes para vários antígenos e ligantes para várias lectinas associadas ao reconhecimento celular (Togayachi *et al.*, 2007; Seko and Yamashita, 2008).

PoliLacNacs são conhecidas por servir como estrutura central para a apresentação de antígenos sialil-Lewis^x (sLe^x) e sialil-Lewis^a (sLe^a), que funcionam como ligantes de selectinas em leucócitos e em várias células cancerosas (Shiraishi *et al.*, 2001) e para antígenos sanguíneos humanos i e I, que são estruturas de poliLacNacs lineares e ramificadas, respectivamente (Chen *et al.*, 2001; Togayachi *et al.*, 2007). Estes últimos dois ligadores de selectinas consistindo na combinação de resíduos sialil e fucosil com estruturas de poliLacNacs. Seu comprimento também é um fator importante na resposta imune, já que

poliLacNacs inibem células NK mediadoras de citotoxicidade pelo seu efeito sobre o processo de ligação celular. Assim, células NK reconhecem células cancerosas por possuírem antígenos de Lewis em glicanos com cadeias bastante curtas de poliLacNacs (Togayachi *et al.*, 2007).

As poliLacNacs em *N*- e *O*-glicanos são coordenadamente sintetizadas pela ação alternada de β 1,4-galactosil transferases e de β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferases (β 3GnT) (Togayachi *et al.*, 2007). Acredita-se que as poliLacNacs são preferencialmente presentes na ramificação β 1,6 de *N*-glicanos tetraantênarios (Togayachi *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008), mas se sabe também que elas estão presentes nos glicolípídeos em eritrócitos (Togayachi *et al.*, 2007).

Suas ramificações são estruturas para o oncodesenvolvimento de antígenos de superfície celular e marcadores de reconhecimento, já que a expressão de ramificações poliLacNacs é regulada com o desenvolvimento. Elas são abundantemente expressas durante o início da embriogênese e em células embrionárias de carcinomas, que se assemelham as células embrionárias iniciais, diminuindo progressivamente durante o desenvolvimento e diferenciação dessas células (Chen *et al.*, 2001).

Glicosiltransferases

Uma elaborada maquinaria enzimática garante que o potencial inerente de codificação dos oligossacarídeos seja realizado. Apontando para uma importância fisiológica, um grupo de 250 a 500 genes são dedicados à síntese e remodelação de cadeias de glicanos, os glicogenes (Gabiús *et al.*, 2011). Esses que, através de seus transcritos irão compor essa complicada maquinaria, que em sua maioria é composta por GTs, já que grandes quantidades de atividades enzimáticas contribuem para a biossíntese de glicanos (Freeze and Aebi, 2005).

Elas são presentes na membrana do RE e Complexo de Golgi, citoplasma, superfícies celulares e fluídos corpóreos. Na presença de seu apropriado doador de açúcar, elas trabalham na biossíntese de vários glicoconjugados (Seko and Yamashita, 2008). Mudanças específicas nessa maquinaria celular de GTs definem os perfis finais de glicosilação dos glicoconjugados (Chandrasekaran *et al.*, 2006), onde a variação dessas estruturas está associada a muitos eventos, inclusive os patológicos, como interações patógeno-hospedeiro,

diferenciação, migração, invasão tumoral e metástase, tráfico celular e sinalização (Reis *et al.*, 2010).

Como as GTs agem normalmente com uma glicosilação terminal, a maioria das GTs que adicionam monossacarídeos a glicolípídeos ou oligossacarídeos são tipicamente proteínas integrais de membrana do tipo 2 e são residentes no Complexo de Golgi (Maccioni *et al.*, 2011). Elas geralmente contêm um domínio catalítico na região C-terminal, uma região de membrana que vai até a parte N-terminal, com o qual as GTs são localizadas na membrana do Complexo de Golgi (Shimma *et al.*, 2006).

Já se sabe que os níveis de atividade de glicosiltransferases são alterados nas células cancerosas e, conseqüentemente, estruturas alvo podem ser selecionadas numa base enzimática considerando a especificidade das enzimas envolvidas na montagem de antígenos de carboidratos complexos, já que mudanças nas atividades de GTs refletem nas estruturas de glicanos expressas por células cancerosas. Assim, um conhecimento da atividade de GTs em células cancerosas podem revelar informações valiosas sobre as estruturas susceptíveis a serem expressas e permite a identificação e seleção de melhores epítomos de carboidratos para a detecção imunohistoquímica (Chandrasekaran *et al.*, 2006).

N-acetilglucosaminil transferases

No início do século XXI, uma β 3GnT, designada β 3GnT1, foi isolada baseada em sua similaridade estrutural com a família das β 1,3-galactosil transferases (β 3GalTs). Ela mostrou uma significância média de similaridade com as β 3GalTs de 15 a 19% e compartilha estruturas conservados comparada com as β 3GalTs (Shiraishi *et al.*, 2001).

No entanto, ela exibia uma atividade de β 1,3-N-acetilglucosaminil transferase ao invés de atividade β 1,3-galactosil transferase. Assim, a β 3GnT1, comparada com a família β 3GalT, usa um distintos substratos doador (GlcNAc contra Gal) e também receptor (Gal contra GlcNAc), mas mantendo a mesma tipo de ligação específica (ligação β 1,3) (Shiraishi *et al.*, 2001).

Em seguida, durante o curso de um estudo para isolar homólogos da β 3GalT1, foram identificados três tipo adicionais de GTs relacionadas estruturalmente com a família das

β 3GalTs, mas que exibiam uma atividade de β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferase e não uma atividade de β 1,3-galactosil transferase. Sendo assim, foi indicado que as β 1,3-*N*-acetilglucosaminil transferases formavam uma família contendo similaridade estrutural a família β 3Gal-T (Shiraishi *et al.*, 2001).

Oito β 3GnTs, de β 3GnT1 a β 3GnT8, foram isoladas até agora e suas atividades enzimáticas caracterizadas *in vitro* (Togayachi *et al.*, 2007). Em 2001, usando sondas específicas, foram isolados três tipos de cDNA que codificavam novas proteínas, sendo duas delas a β 3GnT2 e T3, com 397 e 372 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e com similaridade estrutural com β 3GalT1 (Shiraishi *et al.*, 2001).

Experimentos de transfecção e de análise enzimática *in vitro* demonstraram que a β 3GnT2 e a β 3GnT3 são capazes de catalisar a iniciação e o alongamento de cadeias de açúcar de poliLacNAc. 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 (Shiraishi *et al.*, 2001).

β 3GnT2 e β 3GnT3

Atividade de β 3GnTs são detectadas em vários tecidos, células e soro. Se sabe que a β 3GnT2 é expressa ubiquamente nos tecidos e células (Shiraishi *et al.*, 2001), tendo diferentes níveis de expressão em diferentes tecidos e sendo preferencialmente expressa no cólon, próstata e cérebro (Seko and Yamashita, 2008). Já a β 3GnT3 é relativamente restrita a alguns tecidos, como cólon, jejuno, estômago (corpo e antro), esôfago, placenta e traqueia (Shiraishi *et al.*, 2001).

A β 3GnT2 se mostra como um tipo de proteína transmembrana do tipo 2, tipicamente como a maioria das GTs. Assim, é previsto que a β 3GnT2 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 β 3GnT2, a β 3GnT3 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).

β 3GnT2, dentro da família das β 3GnT, é a que tem a maior atividade específica para a síntese de cadeias poliLacNAcs, quando glicanos tetraantênários *N*-ligados são usados como substrato (Shimma *et al.*, 2006; Seko and Yamashita, 2008). Além disso, mesmo sendo os glicanos tetraantênários o melhor substrato, ela pode também agir eficientemente em glicanos tri, bi e monoantênados *N*-ligados (Seko and Yamashita, 2008).

A β 3GnT2 apresenta de 19 a 24% de identidade comparando com a família das β 3GalT e 15% quando comparada a β 3GnT1. Já a β 3GnT3 apresenta de 22 a 26% de identidade com a família das β 3GalT e 18% com a β 3GnT1. 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 β 3GalT são mantidos nas β 3GnT2 e β 3GnT3, sendo dois deles ausentes na β 3GnT1, indicando assim o porque ela ser um membro mais distinto da família β 3GnT, especialmente no contexto estrutural tridimensional. Com relação a potenciais sítios de *N*-glicosilação, existem cinco na β 3GnT2 e três na β 3GnT3 (Shiraishi *et al.*, 2001).

A árvore filogenética, destas proteínas, gerada usando a sequência de aminoácidos da possível região catalítica demonstra que β 3GnT2 e β 3GnT3 participam do mesmo subgrupo, indicando que elas possuem uma atividade enzimática similar (Shiraishi *et al.*, 2001).

Sabe-se que na presença de lactose como substrato receptor, ambas mostram uma quantidade significativa de atividade de *N*-acetilglucosaminil transferase. Porém, também foi demonstrado que utilizam substratos comuns, mas tem uma preferência de substrato diferente (Shiraishi *et al.*, 2001).

Por causa da β 3GnT2 possuir uma forte atividade de sintetizar poliLacNAcs, com oligossacarídeos como substrato, *in vitro*, ela é uma forte candidata que atua na síntese de poliLacNAc *in vivo* (Togayachi *et al.*, 2007). Então, pensa-se que a β 3GnT2 é uma enzima essencial para a biossíntese de poliLacNAcs em *N*-glicanos (Shiraishi *et al.*, 2001; Shimma *et*

al., 2006; Togayachi *et al.*, 2007) , assim como também a β 3GnT3 (Shiraishi *et al.*, 2001; Shimma *et al.*, 2006).

Biomarcadores glicídicos no câncer

Uma importante área de pesquisa sobre o câncer é a busca por biomarcadores que visem à detecção precoce da doença, evitando assim a progressão e a metástase (Chandrasekaran *et al.*, 2006). A glicosilação alterada de glicolípídeos de superfície celular e glicoproteínas associadas à membrana ou secretadas é quase que uma modificação universal no câncer, podendo contribuir com o fenótipo maligno em certos eventos oncogênicos, o que os torna biomarcadores cancerosos muito importantes (Chandrasekaran *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010). Isso foi demonstrado primeiramente por anticorpos produzidos contra células cancerosas que geralmente reconhecem estruturas glicídicas anormais (Reis *et al.*, 2010).

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).

Em proteínas, das quais metade são glicosiladas em eucariotos, tanto *N*-glicanos quanto *O*-glicanos podem ser sintetizados, e ambos podem ser afetados durante a progressão do câncer (Chandrasekaran *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010). Os *N*-glicanos têm um papel funcional na adesão celular, e modificações em células cancerígenas estão associadas com invasão e metastatização. A *O*-glicosilação de glicoproteínas, onde as mucinas são um componente importante por causa do seu alto teor de Ser e Thr e ao fato de que elas são altamente expressas em carcinomas, contribui para uma parte substancial dos biomarcadores de câncer (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 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 (Chandrasekaran *et al.*, 2006).

Muitos biomarcadores usados na clínica, em ensaios de tecido ou de soro, são baseados nessas modificações nos carboidratos. Sua base e estrutura precisa, no entanto, ainda não é totalmente compreendida por aqueles que os utilizam na prática clínica. Isto decorre da complexidade molecular da expressão desses biomarcadores e da larga quantidade de vias regulatórias não conhecidas (Reis *et al.*, 2010). Os níveis de atividades de GTs podem se alterar em células cancerosas e, portanto, estruturas alvo podem ser selecionadas em uma base enzimática, considerando a especificidade das enzimas essenciais envolvidas na montagem desses antígenos glicídicos complexos (Chandrasekaran *et al.*, 2006).

Em estágios iniciais de estudos de glicanos associados ao câncer, tem sido geralmente assumido que a transcrição de alguns genes envolvidos na síntese destes glicanos deve ser de algum modo reforçada em células cancerosas, em comparação com células normais, e isso deve ser a razão para a expressão preferencial desses tipos de glicanos em câncer. Vários estudos têm apontado para genes envolvidos na síntese de glicanos que tem aumento da transcrição em cânceres (Kannagi *et al.*, 2008).

Grandes avanços recentes foram feitos em várias modalidades terapêuticas. Assim, os marcadores sorológicos tumorais tem 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. Há uma necessidade urgente de desenvolver novos marcadores séricos para os cânceres que tenham espectro ainda não cobertos por marcadores atualmente disponíveis. A maioria dos marcadores sorológicos atualmente em uso são epítomos de carboidratos em sua cadeia bioquímica. A razão exata, no entanto, do porque glicanos são tão úteis como marcadores tumorais ainda permanece indefinida (Kannagi *et al.*, 2008).

Isto tem solicitado o uso de lectinas para detectar mudanças na glicosilação terminal de glicoconjugados, onde as mudanças nas atividades de glicosiltransferases se refletem nas estruturas de glicanos expressas em células cancerosas. Assim, um conhecimento sobre a atividade das GTs, juntamente com o fenótipo glicídico, em células cancerosas pode revelar informações valiosas sobre as estruturas susceptíveis a serem expressas em células

cancerígenas e permitir a identificação e seleção de melhores epítomos glicídicos para a detecção no câncer (Chandrasekaran *et al.*, 2006).

Recentes estudos enfatizam a importância de entender as estruturas de carboidratos presentes em tecidos tumorais por duas razões clínicas. Primeiramente, anticorpos ligadores de antígenos de carboidratos associados à tumor, especialmente àqueles secretados no sangue, podem fornecer novos e melhores biomarcadores. Em segundo lugar, glicanos expressos unicamente em células cancerígenas podem fornecer novos alvos para terapias (Chandrasekaran *et al.*, 2006).

Lectinas

Do grego *legere*, lectina determina uma classe de proteínas, de origem não imunológica, que são capazes de se ligar não covalentemente e reversivelmente a carboidratos. Essas ligações podem ocorrer por meio de pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas ou ligações hidrofóbicas. Elas são expressas de forma ubíqua na natureza, estando presentes desde em bactérias, até nas plantas e nos mamíferos (Sharon and Lis, 2004).

A primeira descrição de hemaglutininas é atribuída à Stillmark, em 1888, em sua tese de doutorado. Em 1936, Summer e Howell relataram que uma proteína, denominada Concanavalin A (Con A), isolada duas décadas antes de forma pura por Summer, tinha capacidade de aglutinar eritrócitos e leveduras, e de precipitar glicogênio. Eles também demonstraram que essa capacidade era neutralizada por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade dessas moléculas. Porém, só em 1954, Boyd sugeriu o termo lectina para estas proteínas, que foi generalizada para agrupar todas as aglutininas açúcar específicas de origem não imune, independente da origem (Guo *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, o interesse pelo estudo das lectinas vem aumentando por elas terem se mostrado importantes ferramentas para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (Madera *et al.*, 2005; Monzo *et al.*, 2007; Sadik and Yan, 2007) e também na análise de superfícies celulares a fim de avaliar as mudanças que ocorrem na expressão dos

carboidratos, durante a embriogênese, crescimento e doença (Sobral *et al.*, 2010; de Melo-Junior *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2011).

O interesse nas lectinas foi grandemente estimulado pela demonstração que elas eram valorosas ferramentas na detecção, isolamento e caracterização dos glicoconjugados (Sharon and Lis, 2004), ganhando a reputação de tradutoras do código do açúcar (Gabiús *et al.*, 2011). Mudanças na extremidade exterior das cadeias de hidratos de carbono 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). Portanto, entender os papéis dos carboidratos no contexto dos glicoconjugados é, portanto, fundamentalmente importante (Wang and Huang, 2009).

Câncer

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes (WHO, 2009). É esperado, para 2020, que o número de novos casos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% destes ocorrerão em países em desenvolvimento. Também se sabe que pelo menos um terço deles poderiam ser prevenidos, demonstrando assim a importância da prevenção (INCA, 2007). O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo na próxima década. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento (WHO, 2009).

No Brasil, as estimativas para os anos de 2010 e 2011 apontavam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer (INCA, 2009). Destes casos, 253.030 são esperados para o sexo feminino, sendo o câncer de colo do útero o segundo mais frequente entre as mulheres, precedido apenas pelo câncer de mama (Kannagi *et al.*, 2008; INCA, 2009; Okonda *et al.*, 2009).

O termo *câncer* é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças (INCA, 2009), sendo usado como sinônimo para todas as neoplasias malignas. Então, é importante salientar que neoplasia é o termo que designa alterações celulares que

levam a um crescimento exagerado destas células, ou seja, uma proliferação celular anormal, sem controle, autônoma, onde os controles das vias de regulação são desrespeitados. As neoplasias também podem ser divididas em malignas ou benignas (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Quando benignas, as neoplasias apresentam um crescimento expansivo, por isso normalmente são macroscopicamente esféricas, ovaladas ou similares. Seu crescimento também se dá de forma lenta, sendo possível a formação de uma estrutura capilar ao redor do tumor para sua nutrição, bem como apresentar um padrão morfológico do tipo nodular, normalmente sendo delimitadas por uma cápsula fibrosa, esta resultante da proliferação do tecido conjuntivo ao seu redor (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Já quando malignas, elas apresentam um crescimento rápido, sendo assim, não havendo formação de estrutura capilar e nem de cápsula fibrosa, ocasionando comumente necrose dos tecidos adjacentes. Seu crescimento também pode ser invasivo. Todavia, a capacidade de metastatizar é a característica marcante de algumas neoplasias malignas. A capacidade invasiva adquirida por essas células possibilita sua permeação nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, criando a possibilidade para uma disseminação (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

O câncer é caracterizado por ser uma doença que envolve violações das regras de comportamento pelos quais os organismos são construídos e mantidos, como a proliferação, diferenciação, migração celular e morte (Hanahan and Weinberg, 2000; Herzig and Christofori, 2002; Kreger and Lauffenburger, 2010; Hanahan and Weinberg, 2011). Por se apresentar fundamentalmente uma doença genética, ele surge como consequência de mudanças patológicas na informação contida em genes específicos (Beckman and Loeb, 2005), porém, a presença de um único dano não é capaz de levar ao desenvolvimento do câncer, o qual se procede de múltiplos estágios, a partir da célula normal, caracterizado pelo acúmulo de alterações, as quais podem dar às células vantagens competitivas em relação às células normais, não as desestabilizando, de modo que elas podem burlar as regras que regem a organização do organismo (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Para burlar essas regras, as células do câncer carregam uma capacidade proliferativa indefinida e, para atingir essa autonomia proliferativa, as células cancerosas precisam fugir ao

controle que mantém a organização do seu respectivo tecido. Elas o fazem produzindo os fatores que controlam essa organização ou, alternativamente, adquirindo alterações nos componentes das vias de transdução de sinal deste controle (Hanahan and Weinberg, 2000; Herzig and Christofori, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011). Esta capacidade proliferativa indefinida não somente ocorre assim, mas também por mutações nos genes que regulam a apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

O modelo mais aceito para se explicar o processo da carcinogênese é o da iniciação/promoção. Conforme ele, a primeira etapa é a da iniciação, onde uma única célula, aparentemente normal, sofre o efeito de agentes cancerígenos ou carcinógenos que promovem certas alterações genotípicas. Na fase seguinte, a da promoção, aquela célula geneticamente alterada passa a multiplicar-se descontrolada e irreversivelmente, e de forma autônoma, levando à formação de um aglomerado de células-filhas que terão as características fenotípicas da célula-mãe. Neste aglomerado de células podem surgir fenótipos com potencial de invasão tecidual e metastatização, caracterizando, então, a fase de progressão (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Quaisquer que sejam os agentes cancerígenos ou carcinógenos envolvidos (físicos, químicos ou biológicos) e seus respectivos mecanismos de ação, o aglomerado neoplásico apresenta células com tendência a se tornarem heterogêneas e com um potencial de crescimento maior do que as células-mãe (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Nas últimas décadas, os esforços científicos têm se direcionado para a identificação e caracterização de moléculas com importância específica e única de células transformadas. Uma das observações mais consistente associada à tumorigênese é a expressão alterada de carboidratos em glicoconjugados, de modo que o seu perfil de carboidratos se torna diferente do que era apresentado antes da transformação neoplásica (Reddi *et al.*, 2000; Chandrasekaran *et al.*, 2006).

Câncer de colo uterino

Para os anos 2010 e 2011, eram esperados no Brasil 18.430 novos casos de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo do útero é o mais incidente na região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000), ocupa a segunda posição mais frequente e nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000), a terceira posição (INCA, 2009).

O câncer de colo do útero é responsável por aproximadamente 500 mil novos casos por ano no mundo, e pela morte de cerca de 230 mil mulheres por ano (INCA, 2009). Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos, do que nos mais desenvolvidos e evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos, com o risco aumentando rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 59 anos (Giorgi Rossi *et al.*, 2009; INCA, 2009; Okonda *et al.*, 2009).

O câncer de colo uterino pode ser dividido, 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 (Bastos, 2006; Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006). Entre as lesões neoplásicas do colo uterino, o carcinoma de células escamosas (CCE) é do tipo histológico mais comum, correspondendo a cerca de 90% de todas as neoplasias cervicais. O carcinoma cervical constitui um problema de grande impacto populacional, já que o tumor incide predominantemente em mulheres jovens, em idade fértil e profissionalmente produtivas (Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006).

Há cerca de 50 anos, o CCE representava a primeira causa de morte por neoplasia maligna em mulheres em todo o mundo, o que despertou o interesse de vários grupos de investigadores. Nos anos seguintes, muitos esforços e ações foram empreendidos na tentativa de se conhecer melhor esta doença. Hoje, é uma das neoplasias mais estudadas e conhecidas, sendo bem estabelecidos os fatores de risco e as lesões precursoras, cujo diagnóstico pode ser feito precocemente, diminuindo a mortalidade e a morbidade e aumentando a taxa de cura (Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006).

No início do século XX, a observação das semelhanças morfológicas entre as células do carcinoma de colo uterino francamente invasor e as células de áreas adjacentes ao tumor, representou o marco inicial da identificação das lesões precursoras do CCE (Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006).

A história do câncer de colo uterino tem um marco importante, em 1941, quando Papanicolaou & Traut (Papanicolaou and Traut, 1997) analisando esfregaços citológicos vaginais, demonstrando a presença de células atípicas, sem características evidentes de malignidade, mas que julgaram serem modificações malignas incipientes. A partir daí tiveram início o diagnóstico e o estudo das formas iniciais da neoplasia do colo uterino, uma vez que, até aquele momento, praticamente só se diagnosticava o carcinoma invasor clinicamente manifesto.

Em 1960, foi introduzido o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para referir-se a um espectro de alterações intraepiteliais que se iniciariam com a displasia leve e culminariam com o carcinoma invasor. Usando essa nomenclatura, as lesões precursoras do CCE foram graduadas em três grupos, denominados NIC I, II e III (Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006).

Com os conhecimentos sobre o Papilomavírus Humano (HPV) e sua influência na progressão da doença, o sistema de classificação foi reformulado. Em 1988, foi proposto o Sistema Bethesda, posteriormente revisto em 1991, que é aplicável tanto para diagnósticos citológicos quanto histopatológicos e vem sendo utilizado também no Brasil. Nesse sistema, as lesões são subdivididas em dois grupos, as chamadas lesões intraepiteliais cervicais de baixo grau e as lesões intraepiteliais cervicais de alto grau, respectivamente LSIL (*low grade squamous intraepithelial lesion*) e HSIL (*high grade squamous intraepithelial lesion*), que correspondem a NIC I (baixo grau) e NIC II e III (alto grau) (Bastos, 2006; Bogliolo and Brasileiro Filho, 2006; Suwannarurk *et al.*, 2009).

Sabe-se hoje que, para o desenvolvimento da lesão intraepitelial de alto grau e do câncer invasivo do colo do útero, o HPV é condição necessária; porém, por si só, não é uma causa suficiente, uma vez que, para o desenvolvimento, manutenção e progressão das lesões intraepiteliais, é necessário, além da persistência do HPV, a sua associação com outros fatores de risco (Rolon *et al.*, 2000; Berlin Grace, 2009; INCA, 2009). Aproximadamente todos os casos de câncer do colo do útero são causados por um dos 13 tipos do HPV atualmente

reconhecidos como oncogênicos pela WHO (WHO, 2009). Destes, os tipos mais comuns são os HPV-16 e o HPV-18. Outros fatores que contribuem para a etiologia desse tumor são o tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, baixas condições sócio-econômicas, higiene íntima inadequada, multiparidade, baixa ingestão de vitaminas, iniciação sexual precoce e coinfeção por agentes infecciosos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus Herpes Simples (HSV), *Trichomonas vaginalis*, e *Chlamydia trachomatis* (INCA, 2005; Bastos, 2006).

Por ser uma evolução lenta, é necessário um longo tempo para que uma neoplasia ocorra a partir de uma NIC, o que torna o câncer de colo uterino com uma boa capacidade de prevenção, de diagnóstico precoce e de tratamento. É bem estabelecido que o teste de Papanicolaou, como método de triagem, tem grande importância na redução da incidência do câncer do colo do útero (INCA, 2005; Decker *et al.*, 2009), o que o tornou a principal estratégia utilizada em programas de rastreamento que objetivam o controle do câncer do colo do útero, por possibilitar um diagnóstico precoce, sendo o Brasil a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente para mulheres de 25 a 59 anos (INCA, 2009).

Objetivos

Geral

Investigar a expressão glicosiltransferases em amostras de tecidos cervical humanas com lesões pré-malignas (NIC 1, NIC 2 e NIC3) e malignas (carcinoma escamoso) uterinas e tecidos humanos normais.

Específicos

- Avaliar a expressão de *N*-acetilglucosaminil transferases (β 3Gn-T2 e β 3Gn-T3) em tecidos uterinos humanos normais e transformados;
- Avaliar a expressão de poli-*N*-acetillactosaminas, um possível produto dessas enzimas;
- Avaliar a expressão de *N*-acetilglucosamina, o carboidrato específico dessas enzimas através de histoquímica com lectinas;
- Estabelecer uma correlação entre o genótipo (expressão das enzimas) e o fenótipo (carboidratos) nos tecidos estudados;
- Correlacionar o padrão de expressão das enzimas e/ou carboidratos com o nível de transformação histológico característico para os diagnósticos estudados;

Referências

- An, H. J., S. R. Kronewitter, et al. (2009). "Glycomics and disease markers." Curr Opin Chem Biol **13**(5-6): 601-607.
- Bastos, A. C. (2006). Ginecologia. São Paulo, Atheneu.
- Beckman, R. A. and L. A. Loeb (2005). "Genetic instability in cancer: theory and experiment." Semin Cancer Biol **15**(6): 423-435.
- Berlin Grace, V. M. (2009). "HPV type 18 is more oncopotent than HPV16 in uterine cervical carcinogenesis although HPV16 is the prevalent type in Chennai, India." Indian J Cancer **46**(3): 203-207.
- Bogliolo, L. and G. Brasileiro Filho (2006). Patologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Chandrasekaran, E. V., J. Xue, et al. (2006). "The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans." Carbohydr Res **341**(8): 983-994.
- Chen, G. Y., N. Kurosawa, et al. (2001). "Functional analysis of promoter activity of murine beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase." Gene **275**(2): 253-259.
- Chen, S., T. Zheng, et al. (2007). "Analysis of cell surface carbohydrate expression patterns in normal and tumorigenic human breast cell lines using lectin arrays." Anal Chem **79**(15): 5698-5702.
- de Melo-Junior, M. R., R. G. de Lima-Neto, et al. (2011). "Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis." Mycopathologia **171**(6): 403-409.
- Decker, K., A. Demers, et al. (2009). "Papanicolaou test utilization and frequency of screening opportunities among women diagnosed with cervical cancer." Open Med **3**(3): e140-147.
- Freeze, H. H. and M. Aebi (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." Curr Opin Struct Biol **15**(5): 490-498.
- Gabius, H. J., S. Andre, et al. (2011). "From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code." Trends Biochem Sci **36**(6): 298-313.

- Ghazarian, H., B. Itoni, et al. (2011). "A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics." Acta Histochem **113**(3): 236-247.
- Giorgi Rossi, P., A. Ricciardi, et al. (2009). "Epidemiology and costs of cervical cancer screening and cervical dysplasia in Italy." BMC Public Health **9**: 71.
- Guo, H. B., A. Nairn, et al. (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 (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Herzig, M. and G. Christofori (2002). "Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 97-113.
- INCA (2005). "Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: Um Estudo Exploratório. – Rio de Janeiro: INCA." 61.
- INCA (2007). "Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA." 94.
- INCA (2009). "Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA." 98.
- Kannagi, R., J. Yin, et al. (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.
- Kreeger, P. K. and D. A. Lauffenburger (2010). "Cancer systems biology: a network modeling perspective." Carcinogenesis **31**(1): 2-8.
- Leal, A. F., N. E. Lopes, et al. (2011). "Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry." Med Mycol.

- Maccioni, H. J., R. Quiroga, et al. (2011). "Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex." FEBS Lett **585**(11): 1691-1698.
- Madera, M., Y. Mechref, et al. (2005). "Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides." Anal Chem **77**(13): 4081-4090.
- Meany, D. L. and D. W. Chan (2011). "Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers." Clin Proteomics **8**(1): 7.
- Monzo, A., G. K. Bonn, et al. (2007). "Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates." TrAC Trends in Analytical Chemistry **26**(5): 423-432.
- Okonda, S., C. Wright, et al. (2009). "The status of cervical cytology in Swaziland, Southern Africa: a descriptive study." Cytojournal **6**: 14.
- 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.
- Reddi, A. L., K. Sankaranarayanan, et al. (2000). "Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patients with SCC of the uterine cervix." Cancer Lett **149**(1-2): 207-211.
- Reis, C. A., H. Osorio, et al. (2010). "Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection." J Clin Pathol **63**(4): 322-329.
- Rolon, P. A., J. S. Smith, et al. (2000). "Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay." Int J Cancer **85**(4): 486-491.
- 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. and H. Lis (2004). "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules." Glycobiology **14**(11): 53R-62R.

- Shimma, Y., F. Saito, et al. (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, et al. (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.
- Sobral, A. P., M. J. Rego, et al. (2010). "ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma." J Oral Sci **52**(1): 49-54.
- Suwannarurk, K., S. Bhamarapavati, et al. (2009). "The accuracy of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia diagnosis with loop electrosurgical excisional procedure under colposcopic vision." J Gynecol Oncol **20**(1): 35-38.
- Togayachi, A., Y. Kozono, et al. (2007). "Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15829-15834.
- Wang, L. X. and W. Huang (2009). "Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis." Curr Opin Chem Biol **13**(5-6): 592-600.
- WHO (2009). "World Cancer Report 2008." Anticancer Research **29**(11).

Artigo**EVALUATION OF *N*-ACETYLGUCOSAMINYL TRANSFERASES
IN HUMAN UTERINE TISSUES**

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

Vilma M L G da Costa, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

Lívia B Costa, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50670-901, Brazil

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

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

Phone: +55 81 21012504, Fax: +55 81 21258484, e-mail: ebeltrao@hotmail.com.br

Keywords: cancer, lectin, *N*-acetylglucosaminyltransferase, poly-*N*-acetyllactosamine

Abstract

Aim: polyLactosamine (polyLacNAc) is a fundamental structure in glycoconjugates and expressed in specific cells/tissues associated with development and carcinogenesis. β 3GnTs play an important role in synthesis of polyLacNAc, however the roles of these β 3GnTs *in vivo* synthesis are still unclear.

Methods and results: expression of two glycosyltransferases, β 3GnT2 and β 3GnT3, were evaluated in normal, malignant (squamous carcinoma) and premalignant (cervical intraepithelial neoplasia - CIN - grades 1, 2 and 3) lesions of uterine cervix samples using immunohistochemistry. 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. β 3GnT3 was expressed in almost all samples (99%) and β 3GnT2 was higher expressed in disease samples ($p = 0,0093$). The expression of polyLacNAc ($p = 0,0002$) and GlcNAc ($p = 0,0001$) also showed most frequently in lesion samples.

Conclusions: our data suggest that β 3GnT2 is the major enzyme responsible for the synthesis of polyLacNAc chains in uterine cervix and can be used as a potential biomarker for the presence of lesions.

Introduction

Mammalian cells in nature are covered with a dense and complex array of glycans called glycocalyx, which comprises of various forms of glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids and proteoglycans) (Tateno *et al.*, 2007). It has been assumed that different cell types express distinct sets of this glycans, and that glycosylation of a single cell type significantly changes during cell development and differentiation (Couldrey and Green, 2000; Kataoka and Huh, 2002; Tateno *et al.*, 2007; Togayachi *et al.*, 2007).

Glycosylation is one of the most common post-translational modifications to proteins in eukaryotic cells (Kato *et al.*, 2005; Dojima *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011). Glycoproteins and glycolipids are ubiquitous components of the cell membrane and of cytoplasm, and the patterns of those glycoconjugates are regulated in cell type- and developmental stage-specific manner (Kataoka and Huh, 2002). Those glycosylated molecules are involved in a broad variety of biological events, such as cell activation (Demetriou *et al.*, 2001), differentiation (Couldrey and Green, 2000; Nakamura *et al.*, 2001), infection (Teneberg *et al.*, 2002), cell-cell, receptor-ligand, and carbohydrate-carbohydrate interactions (Gromova *et al.*, 2001; Togayachi *et al.*, 2007; Togayachi *et al.*, 2010). Furthermore, cell malignant transformations are often associated with structural alteration of carbohydrate chains in glycoconjugates (Couldrey and Green, 2000; Gromova *et al.*, 2001; Kataoka and Huh, 2002; Tateno *et al.*, 2007), and may be involved directly or indirectly in cancer progression and malignancy (Gromova *et al.*, 2001; Kataoka and Huh, 2002; Tateno *et al.*, 2007).

The structure of these glycans depends on the glycosylation enzymes, glycosidase and glycosyltransferases, and the presence of appropriate sugar donors and receptors in the Endoplasmic Reticulum and the Golgi apparatus of the eukaryotic cell (Kato *et al.*, 2005; Seko and Yamashita, 2008; Dojima *et al.*, 2009), and are very complex (Kataoka and Huh, 2002; Coutinho *et al.*, 2003).

β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferases (β 3GnTs) transfer an GlcNAc from UDP-GlcNAc to Gal on the nonreducing end of the carbohydrate chain with a β 1,3-linkage (Shiraishi *et al.*, 2001; Togayachi *et al.*, 2001; Togayachi *et al.*, 2010). Eight β 3GnTs, β 3GnT1 to β 3GnT8, have been isolated, and there *in vitro* activities have been characterized (Shiraishi *et al.*, 2001; Ishida

et al., 2005; Narimatsu, 2006; Togayachi *et al.*, 2006; Togayachi *et al.*, 2007; Seko and Yamashita, 2008; Togayachi *et al.*, 2010). However, the roles of these multiple β 3GnTs *in vivo* polyN-acetyllactosamine synthesis are still unclear.

The polyLacNAc structure, a linear glycan, which containing repeats of the *N*-acetyllactosamine (LacNAc) unit ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3}$) $_n$ (Ishida *et al.*, 2005; Togayachi *et al.*, 2007; Seko and Yamashita, 2008), is the fundamental structure of carbohydrate chains in glycoproteins and glycolipids (Ishida *et al.*, 2005; Togayachi *et al.*, 2007; Seko and Yamashita, 2008). In *N*- and *O*-glycans is coordinately synthesized by the alternative action of a β 1,4-galactosyltransferase and a β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (Togayachi *et al.*, 2007; Seko and Yamashita, 2008). and expressed in specific cells/tissues associated with development and carcinogenesis and to serve as a cell-recognition molecule by binding to several lectin proteins (Seko and Yamashita, 2008).

In cancer metastasis, polyN-acetyllactosamine and related structures play important roles in cell-cell interaction, in cell-extracellular matrix interaction, in immune response and in determining metastatic capacity (Ishida *et al.*, 2005).

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 (Sharon and Lis, 2004; Tateno *et al.*, 2007). The oligosaccharides polyLacNAc and GlcNAc can be identified in tissues by the lectin from *Phytolacca americana* (PWM), which binds with high affinity to polyLacNAc glycans bearing three or more linear *N*-acetyllactosamine repeats, and from *Wheat Germ* agglutinin, respectively.

This study involved histochemical analysis of human uterine cervix tissues using lectins and antibodies to investigate the relationship between the presences of *N*-acetylglucosaminyl transferases (β 3GnT2 β 3GnT3), their specific carbohydrate (GlcNAc), their product (polyLacNAc) and clinicopathological characteristics of the tissues. Our results indicate the involvement of β 3GnT2 with the progression of uterine cervix lesions.

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) e anti-B3GNT3 (HPA024298) were purchased from Sigma-Aldrich. The visualization system, Advanced™ HRP (K406889-2), and the chromogenic substrate (K346811-2), liquid diaminobenzidine (DAB) and substrate, were obtained from DAKO. Entellan® (107960) was purchased from Merck.

Samples: malignant and premalignant lesions of uterine cervix were obtained from the Tissue Bank of the University Hospital of the Federal University of Pernambuco, Brazil. One hundred and thirty formalin fixed and paraffin embedded cases were collected, divided into 30 cases of squamous-cell carcinoma, 30 cases of grade 1 cervical intraepithelial neoplasia (CIN), 30 cases of grade 2 CIN, 30 cases of grade 3 CIN and 10 cases of normal epithelium. Patients age range of patients at the time of diagnosis was 23-83 years (mean 48.86 ± 14.78), to squamous-cell carcinoma, 24-89 years (mean 40.79 ± 14.93) to CIN 3, 25-89 years (mean 38.10 ± 15) to CIN 2 and 18-46 years (mean 33.08 ± 8.75) to CIN 1. The normal tissues samples were obtained from patients with 28-68 years-old age range (mean 40.77 ± 12.23). This work was approved by Health Science Ethical Committee at Federal University of Pernambuco (SISNEP FR – 272931, CEP/CCS/UFPE N° 195/09).

Immunohistochemistry: tissues sections (4 μ m) were deparaffinized in xylene and hydrated in alcohol, treated with 10% (v/v) ammonium hydroxide solution for 10 min at 25° C and with 10mM citrate buffer pH 6,0 for 30 min at 100° C on a steamer (Lopes *et al.*, 2005; Pedroso *et al.*, 2008). Afterwards samples were treated with a 0.3% (v/v) methanol-H₂O₂ solution for 15 min at 25° C. Tissues were incubated with PBS-BSA, a 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) solution in PBS (100mM phosphate-buffered saline pH 7.2, containing 150mM NaCl), for 1 h at 25° C and then incubated with the primary antibodies diluted in PBS-BSA (B3GnT2 1:50 and B3GnT3 1:100) for 2 h at 37° C. Secondary antibodies incubation, a biotin free visualization system, and visualization system protocol (using DAB solution) were carried out for 45 min at 25° C and according to manufacturer, respectively. Sections were finally

counterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated and mounted with Entellan®. Between each step, samples were washed twice (5 min each) with PBS. Positive staining control was developed with gastrointestinal tract samples (Shiraishi *et al.*, 2001) and negative ones by incubating tissues sections in with PBS replacing the primary antibodies.

Lectin histochemistry: after deparaffination in xylene and hydration in alcohol, four micrometer thick tissues were treated with a 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37° C, followed by 100mU/mL neuraminidase solution for 1 h at 37° C and a 0.3% (v/v) methanol-H₂O₂ solution for 15 min at 25° C. Lectin PWM and WGA incubations (20 µg/mL) were carried out for 2 h at 4° C. Biotinylated lectins were 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 de manufacturer's instructions. Sections were then counsterstained with Harry's hematoxylin, dehydrated and mounted with Entellan®. Between each step, samples were washed twice (5 min each) with 100mM PBS solution pH 7.2, containing 150mM NaCl. Inhibition control was developed by incubating tissues sections with sugar-inhibited lectin (*N*-acetyl-D-glucosamine), and negative staining control by replacing the lectins for PBS.

Staining analisys 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 (version2.30). Tissue stainings were classified as negative and as positive.

Statistical analysis: The Fischer's test was used to evaluate the relationship between positive staining and lesions grades. Differences of $p < 0.05$ were considered significant. GraphPad Prism vesion 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) statistical software was used for data analysis.

Results and Discussion

β3GnT3 showed to be expressed in small amounts in the cytoplasm of almost all samples (99%) (figure I), and have not presented significant differences between any type of sample (table I). β3GnT2 expression occurred in the cytoplasm higher than β3GnT3, and was

more expressed in disease samples (figure I) when compared to normal samples ($p=0.0093$) (table I).

The presence of *N*-acetylglucosamine terminal residues were also most commonly found in a cytoplasmic and cell surface in lesions samples ($p=0.0002$) (table I and figure I), with no differences between the different degrees of lesions, which may reflect the $\beta 3\text{GnT}2$ increased expression of these samples. There were statistically significant differences between samples for the expression of poly-*N*-acetylglucosamine chains. Still, their presence occurred more frequently in lesions samples ($p = 0.0001$) (table I and figure I), which may reflect the increased $\beta 3\text{GnT}2$. It was also observed that in 50% of squamous carcinoma samples, the expression of polyLacNAc was observed only in nucleus while in premalignant lesions it was observed in cytoplasm and cell surface (figure V).

Recently, Seko and Yamashita (Seko and Yamashita, 2008) have reported that increase of polyLacNAc content was resulted from the up-regulation of mRNA and enzyme activity of the key glycosyltransferase responsible for the synthesis of polyLacNAc, the $\beta 3\text{GnT}2$ in HL-60 cells. As they and Togayachi and co-workers (Togayachi *et al.*, 2001; Togayachi *et al.*, 2007), our data suggest that $\beta 3\text{GnT}2$ is the major enzyme responsible for the synthesis of polyLacNAc chains, as in the samples with lesions was observed an increased expression of this enzyme and of the polyLacNAc chains and terminal residues of *N*-acetylglucosamine.

Glycosylation is important in eukaryotic cells (Dojima *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2011) and alterations in this event is commonly observed in various human carcinomas and seems to be involved in cancer progression and malignancy (Couldrey and Green, 2000; Gromova *et al.*, 2001; Kataoka and Huh, 2002; Tateno *et al.*, 2007). regarding cell-cell adhesion, interaction, communication and differentiation (Couldrey and Green, 2000; Demetriou *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001). Our results indicate a close relationship between $\beta 3\text{GnT}2$ expression and polyLacNAc chains with the progression of lesions of uterine cervix. A study in bladder transitional cell carcinoma show a decline of $\beta 3\text{GnT}2$ in more advanced lesions, unlike our results (Gromova *et al.*, 2001).

These findings show the importance of glycosylation in biological events, especially those related to cancer, and has significant implications for the understanding and helping of treatment choice of this disease. Therefore, in future, by identifying of additional mechanisms

involved in the cancer progression, specific inhibitors of glycosylation may be used in the treatment or control. Additional researchers on the relationship between glycosylation and tumor progression should be provide news insights into tumor progression.

References

- An, H. J., S. R. Kronewitter, et al. (2009). "Glycomics and disease markers." Curr Opin Chem Biol **13**(5-6): 601-607.
- Bastos, A. C. (2006). Ginecologia. São Paulo, Atheneu.
- Beckman, R. A. and L. A. Loeb (2005). "Genetic instability in cancer: theory and experiment." Semin Cancer Biol **15**(6): 423-435.
- Berlin Grace, V. M. (2009). "HPV type 18 is more oncopotent than HPV16 in uterine cervical carcinogenesis although HPV16 is the prevalent type in Chennai, India." Indian J Cancer **46**(3): 203-207.
- Bogliolo, L. and G. Brasileiro Filho (2006). Patologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Chandrasekaran, E. V., J. Xue, et al. (2006). "The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans." Carbohydr Res **341**(8): 983-994.
- Chen, G. Y., N. Kurosawa, et al. (2001). "Functional analysis of promoter activity of murine beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase." Gene **275**(2): 253-259.
- Chen, S., T. Zheng, et al. (2007). "Analysis of cell surface carbohydrate expression patterns in normal and tumorigenic human breast cell lines using lectin arrays." Anal Chem **79**(15): 5698-5702.
- Couldrey, C. and J. E. Green (2000). "Metastases: the glycan connection." Breast Cancer Res **2**(5): 321-323.
- Coutinho, P. M., E. Deleury, et al. (2003). "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." J Mol Biol **328**(2): 307-317.
- de Melo-Junior, M. R., R. G. de Lima-Neto, et al. (2011). "Comparative analysis of extracellular matrix and cellular carbohydrate expression in the sporotrichosis and chromoblastomycosis." Mycopathologia **171**(6): 403-409.
- Decker, K., A. Demers, et al. (2009). "Papanicolaou test utilization and frequency of screening opportunities among women diagnosed with cervical cancer." Open Med **3**(3): e140-147.

- Demetriou, M., M. Granovsky, et al. (2001). "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation." Nature **409**(6821): 733-739.
- Dojima, T., T. Nishina, et al. (2009). "Comparison of the N-linked glycosylation of human beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 expressed in insect cells and silkworm larvae." J Biotechnol **143**(1): 27-33.
- Freeze, H. H. and M. Aebi (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." Curr Opin Struct Biol **15**(5): 490-498.
- Gabius, H. J., S. Andre, et al. (2011). "From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code." Trends Biochem Sci **36**(6): 298-313.
- Ghazarian, H., B. Idoni, et al. (2011). "A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics." Acta Histochem **113**(3): 236-247.
- Giorgi Rossi, P., A. Ricciardi, et al. (2009). "Epidemiology and costs of cervical cancer screening and cervical dysplasia in Italy." BMC Public Health **9**: 71.
- Gromova, I., P. Gromov, et al. (2001). "A novel member of the glycosyltransferase family, beta 3 Gn-T2, highly downregulated in invasive human bladder transitional cell carcinomas." Mol Carcinog **32**(2): 61-72.
- Guo, H. B., A. Nairn, et al. (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 (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Herzig, M. and G. Christofori (2002). "Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 97-113.
- INCA (2005). " Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer.Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: Um Estudo Exploratório. – Rio de Janeiro: INCA." 61.
- INCA (2007). "Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro:

INCA." 94.

INCA (2009). " Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA." 98.

Ishida, H., A. Togayachi, et al. (2005). "A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetyllactosamine, is dramatically upregulated in colon cancer." FEBS letters **579**(1): 71-78.

Kang, J. G., J. H. Ko, et al. (2011). "Pros and cons of using aberrant glycosylation as companion biomarkers for therapeutics in cancer." BMB Rep **44**(12): 765-771.

Kannagi, R., J. Yin, et al. (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.

Kataoka, K. and N. H. Huh (2002). "A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase involved in invasion of cancer cells as assayed in vitro." Biochem Biophys Res Commun **294**(4): 843-848.

Kato, T., M. Suzuki, et al. (2005). "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 **329**(2): 699-705.

Kreeger, P. K. and D. A. Lauffenburger (2010). "Cancer systems biology: a network modeling perspective." Carcinogenesis **31**(1): 2-8.

Leal, A. F., N. E. Lopes, et al. (2011). "Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry." Med Mycol.

Lopes, F. F., M. C. F. N. d. Cruz, et al. (2005). "Análise imuno-histoquímica das citoqueratinas em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide." Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial **41**: 425-430.

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

- Madera, M., Y. Mechref, et al. (2005). "Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides." *Anal Chem* **77**(13): 4081-4090.
- Meany, D. L. and D. W. Chan (2011). "Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers." *Clin Proteomics* **8**(1): 7.
- Monzo, A., G. K. Bonn, et al. (2007). "Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**(5): 423-432.
- Nakamura, N., N. Yamakawa, et al. (2001). "Differential gene expression of beta-1,4-galactosyltransferases I, II and V during mouse brain development." *J Neurochem* **76**(1): 29-38.
- Narimatsu, H. (2006). "Human glycogene cloning: focus on beta 3-glycosyltransferase and beta 4-glycosyltransferase families." *Curr Opin Struct Biol* **16**(5): 567-575.
- Okonda, S., C. Wright, et al. (2009). "The status of cervical cytology in Swaziland, Southern Africa: a descriptive study." *Cytojournal* **6**: 14.
- 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.
- Pedroso, P. M. O., C. A. Pescador, et al. (2008). "Padronização da técnica de imunohistoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina." *Pesquisa Veterinária Brasileira* **28**: 627-632.
- Reddi, A. L., K. Sankaranarayanan, et al. (2000). "Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patients with SCC of the uterine cervix." *Cancer Lett* **149**(1-2): 207-211.
- Reis, C. A., H. Osorio, et al. (2010). "Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection." *J Clin Pathol* **63**(4): 322-329.
- Rolon, P. A., J. S. Smith, et al. (2000). "Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay." *Int J Cancer* **85**(4): 486-491.
- 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. and H. Lis (2004). "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules." Glycobiology **14**(11): 53R-62R.
- Shimma, Y., F. Saito, et al. (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, et al. (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.
- Sobral, A. P., M. J. Rego, et al. (2010). "ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma." J Oral Sci **52**(1): 49-54.
- Suwannarurk, K., S. Bhamarapavati, et al. (2009). "The accuracy of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia diagnosis with loop electrosurgical excisional procedure under colposcopic vision." J Gynecol Oncol **20**(1): 35-38.
- Tateno, H., N. Uchiyama, et al. (2007). "A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray." Glycobiology **17**(10): 1138-1146.
- Teneberg, S., I. Leonardsson, et al. (2002). "Lactotetraosylceramide, a novel glycosphingolipid receptor for *Helicobacter pylori*, present in human gastric epithelium." J Biol Chem **277**(22): 19709-19719.
- Togayachi, A., T. Akashima, et al. (2001). "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 **276**(25): 22032-22040.
- Togayachi, A., Y. Kozono, et al. (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, et al. (2010). "Beta3GnT2 (B3GNT2), a major polylectosamine synthase: analysis of B3GNT2-deficient mice." Methods Enzymol **479**: 185-204.

Togayachi, A., T. Sato, et al. (2006). "Comprehensive enzymatic characterization of glycosyltransferases with a beta3GT or beta4GT motif." Methods Enzymol **416**: 91-102.

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

WHO (2009). "World Cancer Report 2008." Anticancer Research **29**(11).

Tables

Table I

	Normal	Lesion				total	<i>p</i>
		CIN ^a 1	CIN 2	CIN 3	SC ^b		
β 3GnT2							
Positive	6	28	28	29	26	111	<i>p</i> = 0.0093
Negative	4	2	2	1	4	9	
β 3GnT3							
Positive	10	30	29	30	30	119	
Negative	-	-	1	-	-	1	
WGA							
Positive	5	29	29	28	29	115	<i>p</i> = 0.0002
Negative	5	1	1	2	1	5	
PWM							
Positive	1	25	24	18	26	93	<i>p</i> = 0,0001
Negative	9	5	6	12	4	27	

a: CIN = cervical intraepithelial neoplasia; b: SC = squamous carcinoma.

Acknowledgments

This work was supported by Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Hospital da Clínicas (HC) from the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and 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).

Figures and legends

Figure 1

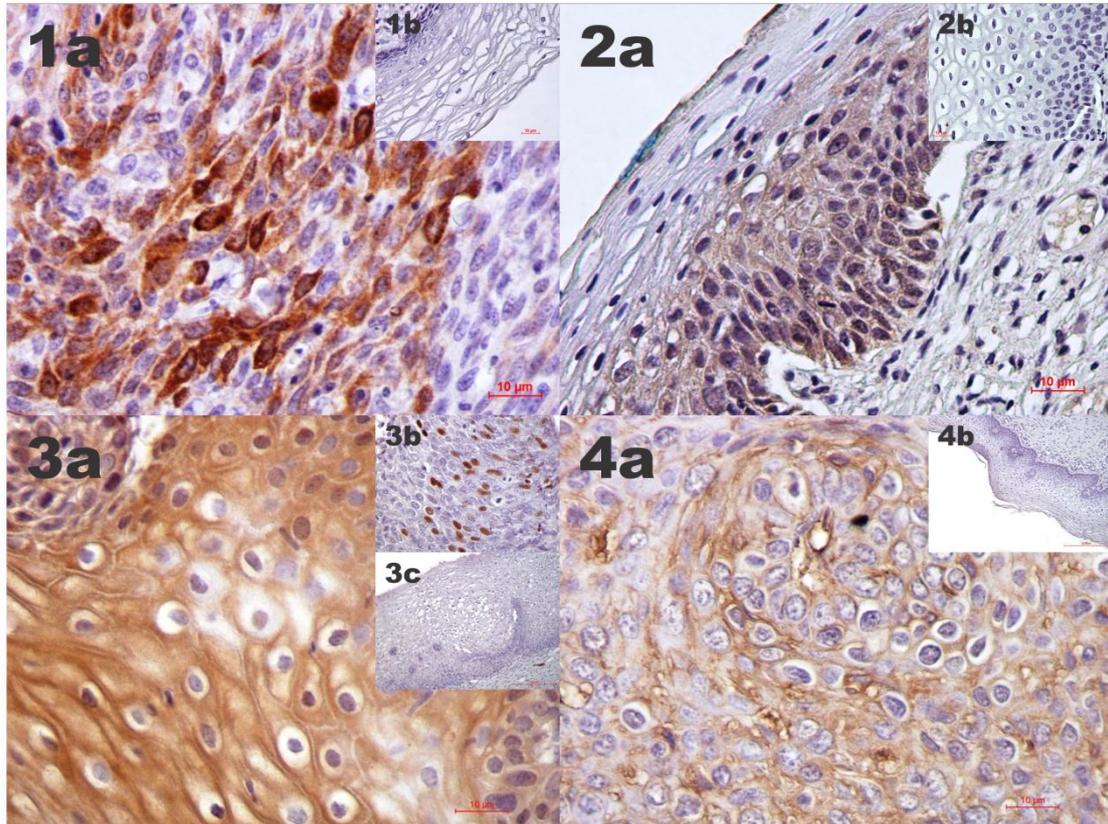


Table I: Expression of β 3GnT2, GlcNAC and polyLacNAc in uterine cervix samples.

Figure I: Immunohistochemistry and lectin histochemistry (a) of lesions of human uterine cervix tissues and their respective negative controls (b): (1) immunohistochemistry of squamous cells carcinoma using anti- β 3GnT2; (2) immunohistochemistry CIN grade 2 using anti- β 3GnT3; (3) lectin histochemistry of CIN grade 1 using PWM; (4) lectin histochemistry of CIN grade 2 using WGA; (3c) lectin histochemistry using PWM of squamous cells carcinoma showing a positive marking in nucleus.