

# AVALIAÇÃO DA GLICOSILAÇÃO ABERRANTE E DOS EFEITOS DO REMODELAMENTO DO GLICOMA EM PROGÊNIES DERIVADAS DA IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL QUE EXIBEM FENÓTIPO MESENCHYMAL-LIKE

Jéssica de Andrade da Costa (IC)<sup>1</sup> · Lilian G. dos Reis Bastos<sup>2</sup> · Salomé S. de Pinho<sup>3</sup> · José A. Morgado-Díaz<sup>1</sup> · Julio Cesar M. de-Freitas-Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Biologia Estrutural, Programa de Biologia Celular, Instituto Nacional de Câncer (INCA); <sup>2</sup> Programa de Pesquisa Clínica, INCA;

<sup>3</sup> Grupo de Glicobiologia em Câncer, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** No Brasil, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais frequente em homens e o segundo em mulheres, sendo também responsável por 8,5% de todas as mortes relacionadas a esta doença. Em pacientes com câncer retal, a radioterapia (RT) tem sido empregada para o tratamento neoadjuvante de doença localmente avançada, promovendo redução do risco de recorrência local. No entanto, os protocolos com fracionamento de dose, que são importantes para preservação do tecido normal, possibilitam também a re-população por células tumorais radorresistentes. Recentemente, foi demonstrado por nosso grupo que os efeitos transgeracionais induzidos pela radiação potencializam características malignas na progênie resultante de células parentais de câncer colorretal (HT-29) irradiadas. **OBJETIVO:** Dessa forma, o objetivo do presente estudo é investigar alterações no perfil de expressão de *N*-glicanos e sua relação com a aquisição de fenótipo *mesenchymal-like* nestas progênies radorresistentes. **METODOLOGIA E RESULTADOS:** Inicialmente, através de *blotting* de lectinas e citometria de fluxo, utilizando as lectinas específicas L-PHA (*Phaseolus vulgaris* L, que reconhece majoritariamente *N*-glicanos complexos ramificados) e SNA (*Sambucus nigra*, que reconhece majoritariamente glicanos com sialilação terminal), foi observado que essas progênies exibem aumento dos níveis de expressão de *N*-glicanos tri- ou tetra-antenados, com ramificações do tipo  $\beta$ 1,6GlcNAc. Além disso, foi verificado por qRT-PCR um aumento nos níveis da enzima *N*-acetilglicosaminiltransferase 5 (MGAT5) que é responsável pela síntese dessa estrutura. Posteriormente, por eletroforese 2D seguida de *immunoblotting* foi observado que as progênies derivadas da irradiação das células HT-29 apresentam aumento dos níveis de *N*-glicosilação da E-caderina. Corroborando esses resultados, foi observada uma hiperglicosilação dessa mesma proteína por imunoprecipitação seguida de *blotting* de lectinas. Por imunofluorescência foi observado também aumento na intensidade de marcação de *N*-glicanos complexos ramificados em células que apresentavam uma redução na localização de E-caderina nos contatos celulares. Por fim, a inibição farmacológica da enzima  $\alpha$ -manosidase II, através do tratamento com swainsonina, que inibe a formação de *N*-glicanos do tipo complexo, impediu o aumento da invasividade que observa-se apenas nas progênies irradiadas e, ainda, induziu uma co-localização de E-caderina e actina nos contatos celulares, que é uma característica de junções aderentes íntegras. **CONCLUSÃO:** Portanto, nossos resultados indicam que a glicosilação aberrante pode estar relacionada a aquisição de fenótipo *mesenchymal-like* em progênies derivadas da irradiação de células de câncer colorretal. Além disso, os dados sugerem que a biossíntese de *N*-glicanos pode ser um potencial alvo para inibir o fenótipo maligno exibido por estas progênies radorresistentes.

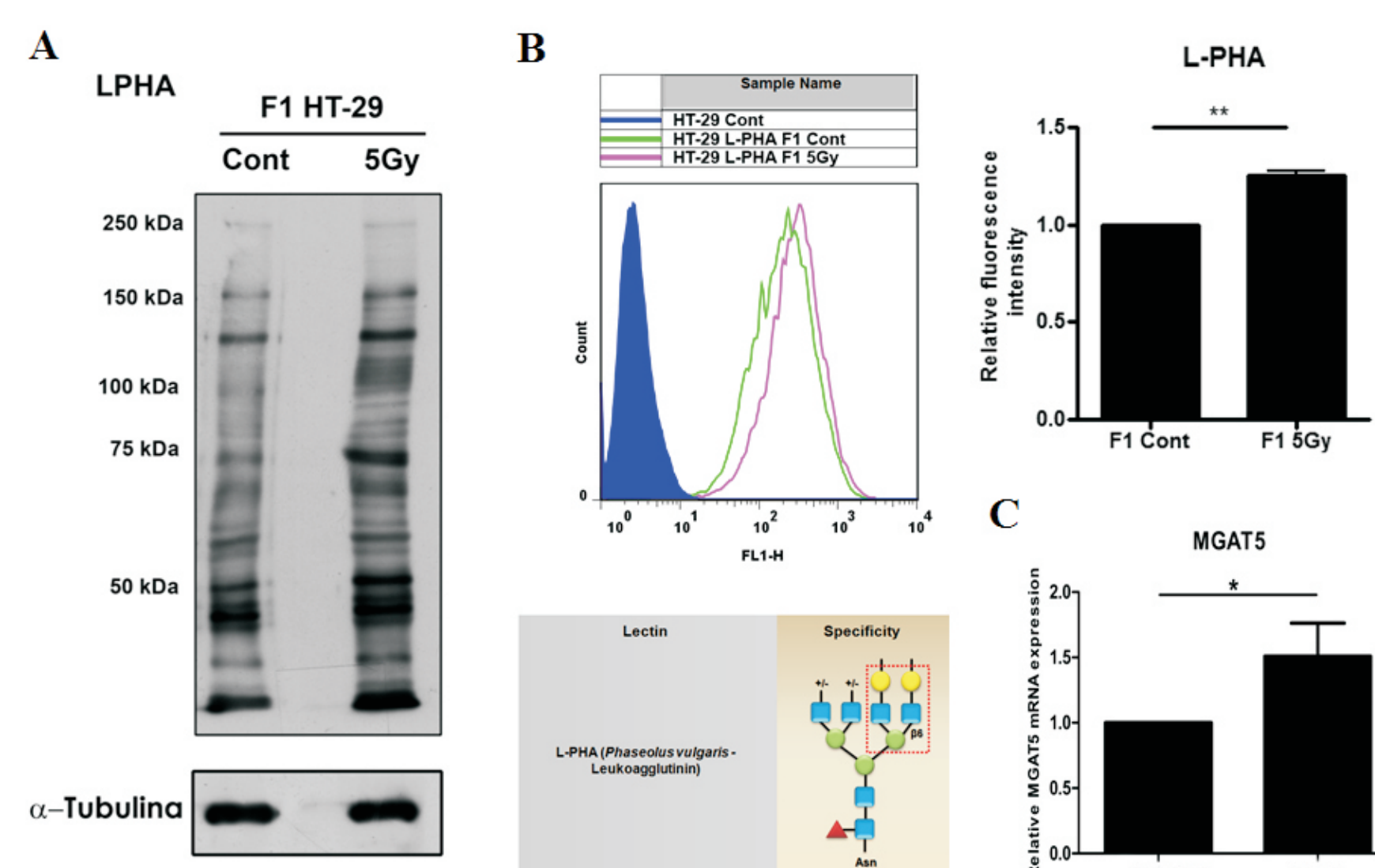


Figura 3: Progênies derivadas da irradiação de células HT-29 exibem aumento dos níveis de expressão de *N*-glicanos com ramificações do tipo  $\beta$ 1,6GlcNAc. (A) *Blotting* usando a lectina L-PHA indicou aumento global da expressão de glicanos  $\beta$ -1,6 ramificados nas progênies irradiadas. (B) Análise por citometria de fluxo usando a mesma lectina e quantificação da intensidade de fluorescência mostraram um aumento significativo na expressão do mesmo arranjo nos progênies irradiadas. (C) Níveis de expressão de mRNA de MGAT5 também aumentam em F1 5Gy. Mean  $\pm$  S.E.M. (N = 3), \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

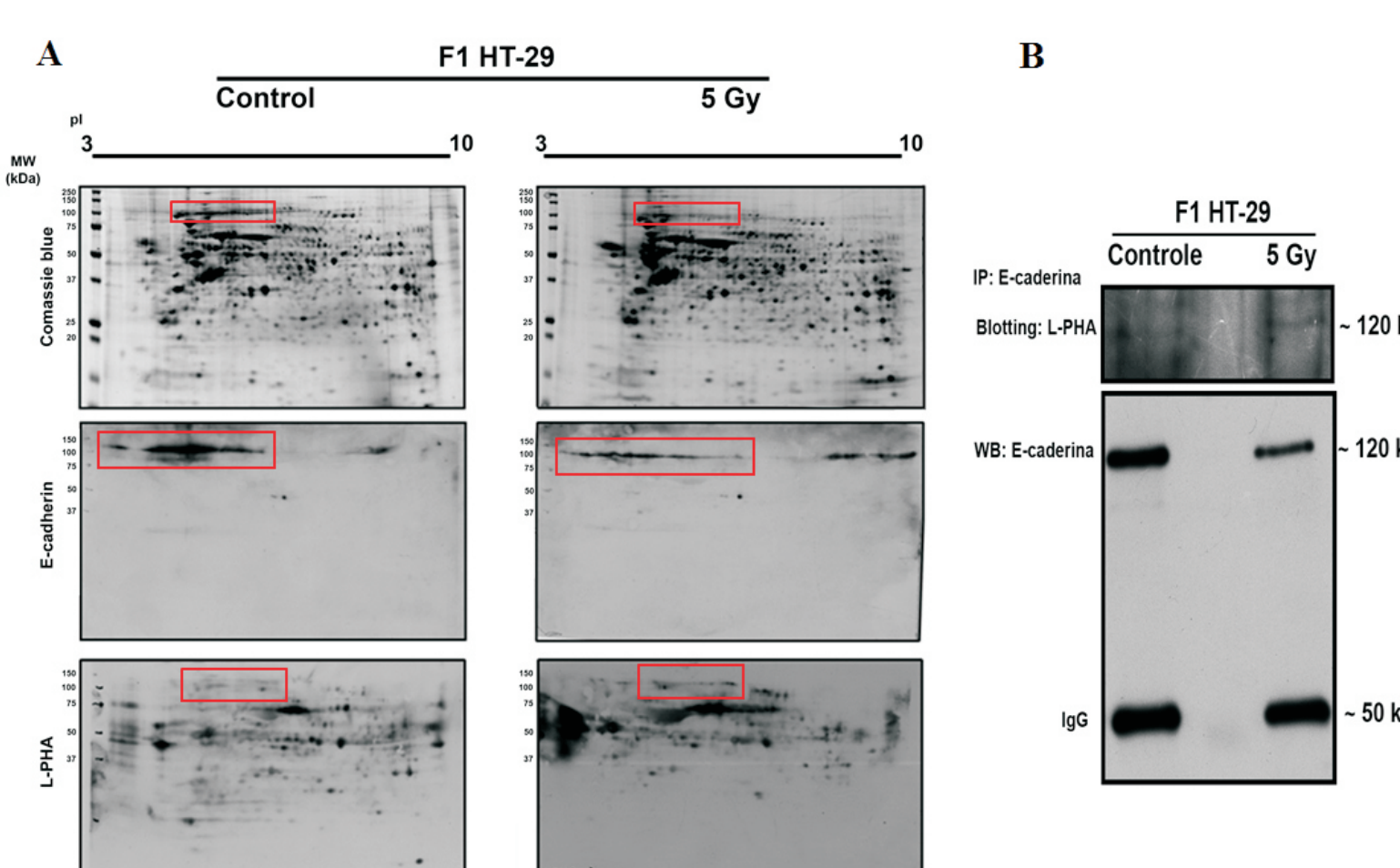


Figura 5: *N*-glicanos  $\beta$ -1,6 ramificados estão aumentados em moléculas de E-caderina de células F1 5Gy. (A) 2D e (B) 1D eletroforese foram realizadas para avaliar a expressão de E-caderina e glicosilação. Reduzida expressão de E-caderina em progênies F1 5Gy foi acompanhada por aumento de expressão de *N*-glicanos  $\beta$ -1,6 ramificados (*N*-glicanos L-PHA positivos), sugerindo que a E-caderina é hiperglicosilada nessas progênies. Dados representativos de dois experimentos independentes.

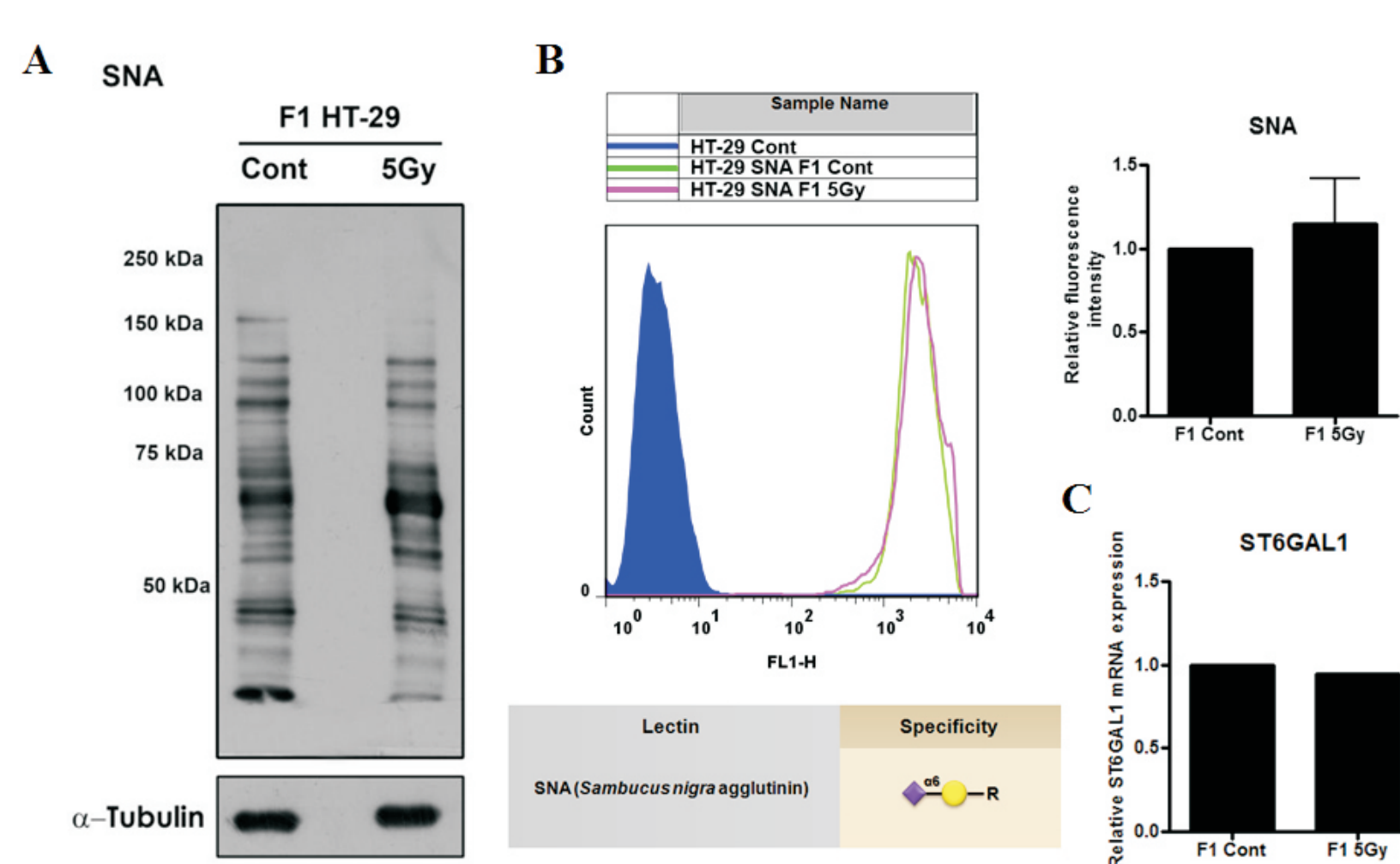


Figura 4: Radiação não parece interferir nos níveis de expressão da sialilação terminal. (A) *Blotting* usando a lectina SNA indicou que a expressão global de glicanos terminais não parece estar alterada na progênie F1 5Gy quando comparada com a progênie Controle F1. Confirmando esse resultado em (B) Análise por citometria de fluxo usando a mesma lectina e quantificação também não indicou aumento na intensidade de fluorescência de tais estruturas. Mean  $\pm$  S.E.M. (N = 3). Assim como não houve mudanças nos (C) níveis de expressão de mRNA de ST6GAL1 em F1 5Gy. Mean  $\pm$  S.E.M. (N = 2).

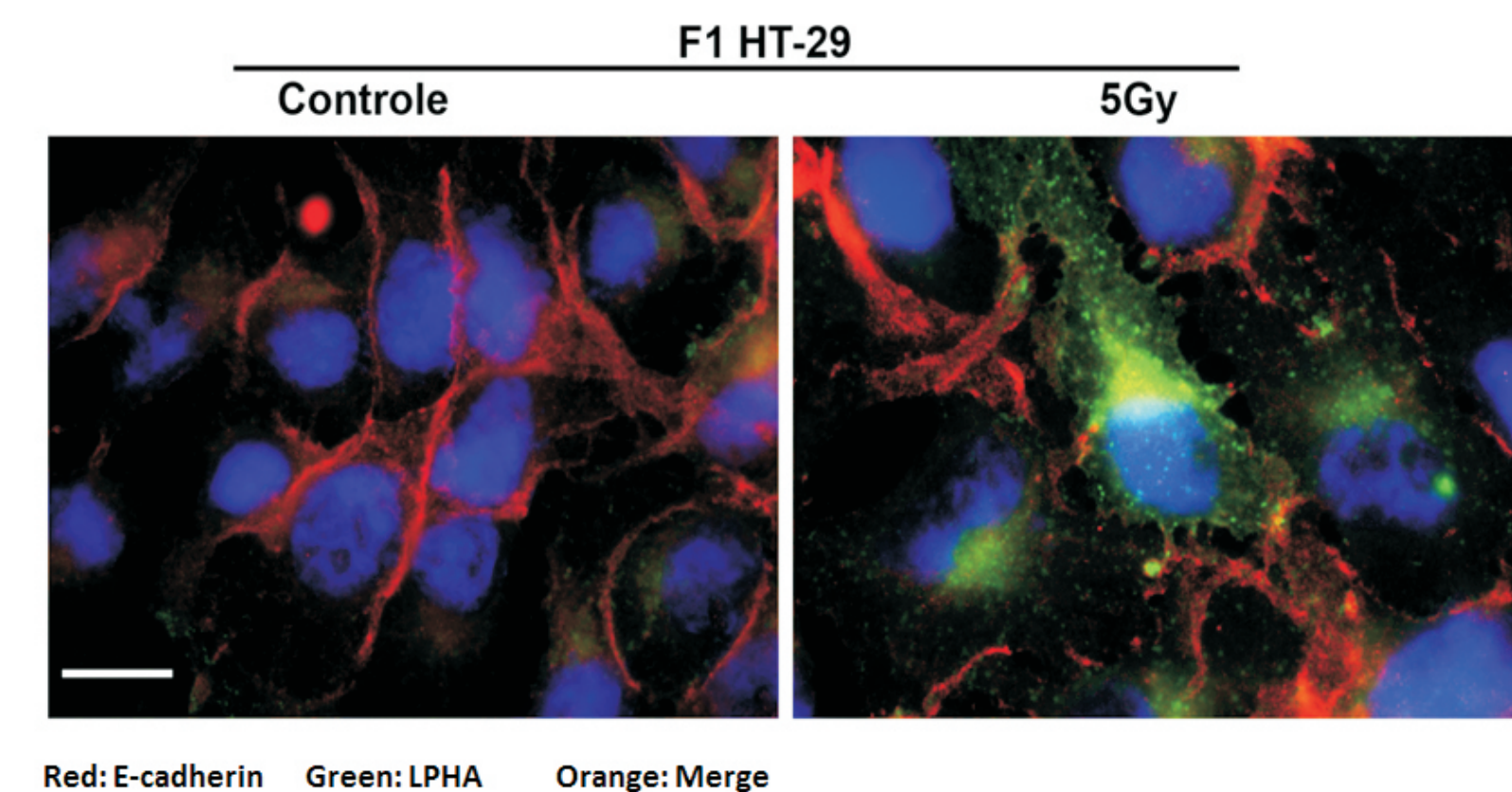


Figura 6: Localização subcelular da E-caderina e *N*-glicanos ramificados por imunofluorescência. Em células F1 5Gy há um aumento na marcação para a lectina L-PHA (verde) assim como redução na intensidade de marcação para E-caderina (vermelho). Dado representativo de experimento único.

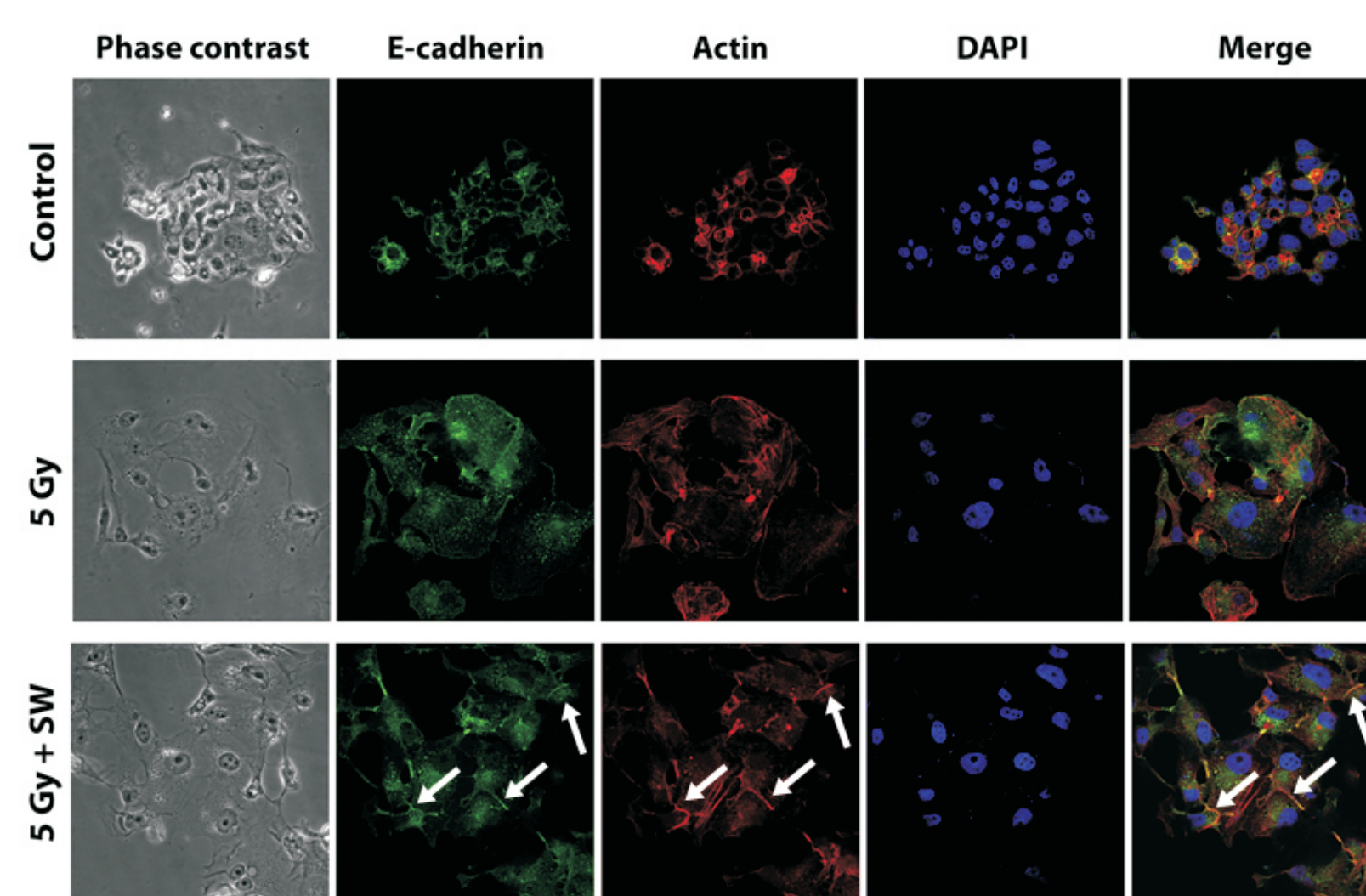


Figura 9: Análise da localização subcelular da E-caderina e da organização do citoesqueleto em progênies derivadas de células sobreviventes a radiação após o tratamento sustentado com swainsonina. Imunofluorescência da progênie F1 5Gy+SW indicou que depois de 24 horas de tratamento sustentado com swainsonina a droga induziu a co-localização de ambas, E-caderina e actina, nas regiões de contatos celulares. Setas: regiões de contato célula-célula.

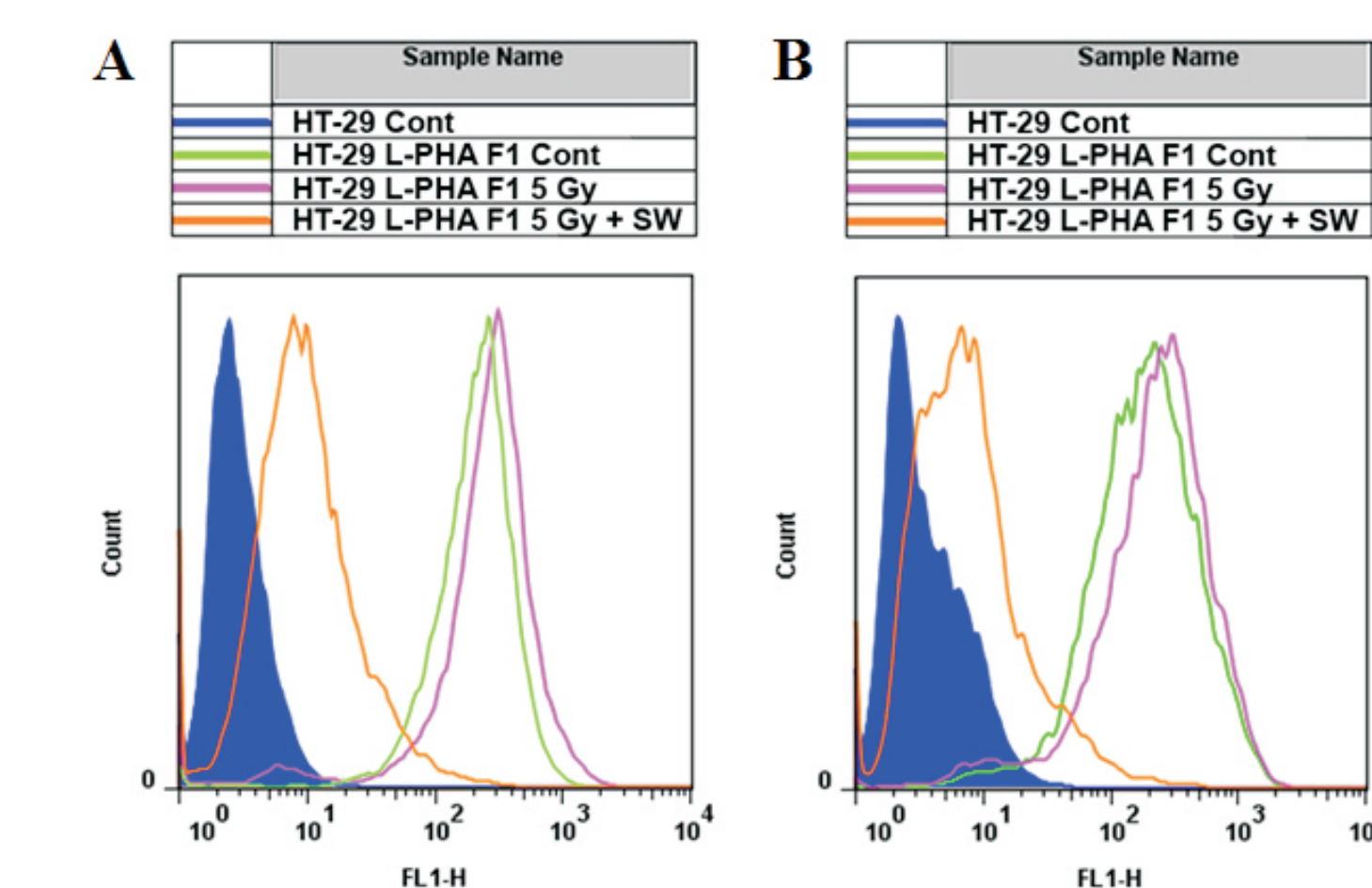


Figura 11: Monitoramento da eficiência do tratamento pós-irradiado por citometria de fluxo usando a lectina L-PHA. (A) Análise do tratamento pós-irradiado com swainsonina em tempos de 24 horas e (B) 48 horas após a irradiação indicou que ele é capaz de inibir a síntese de estruturas  $\beta$ -1,6 ramificadas em *N*-glicanos.

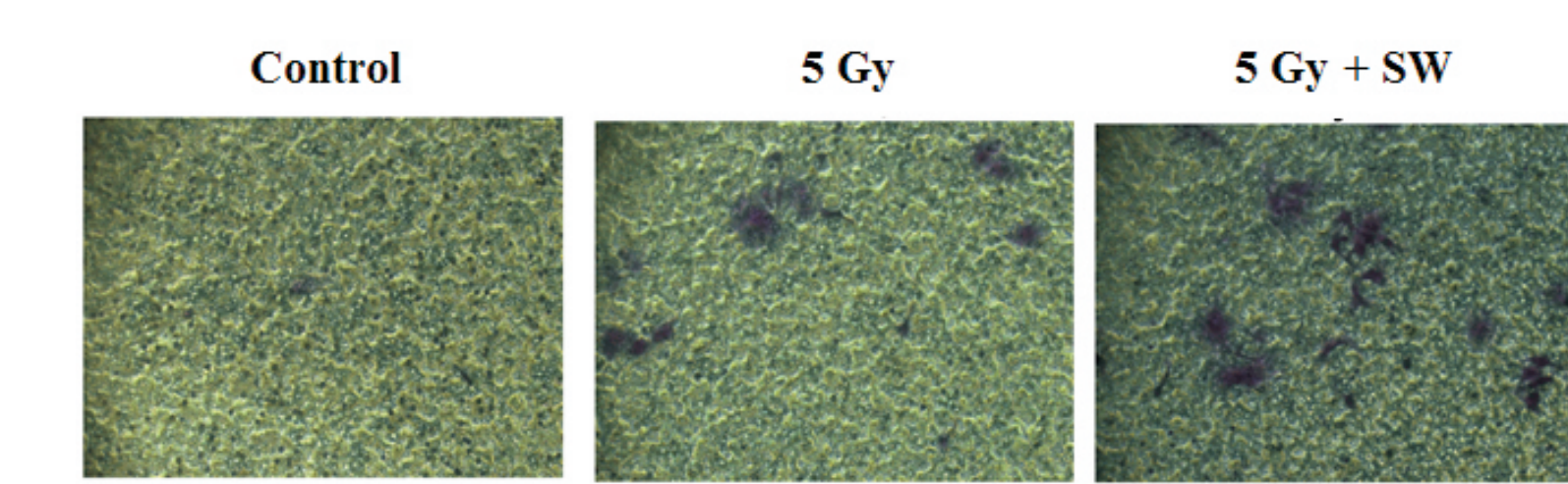


Figura 13: Análise do potencial invasivo de progênies submetidas a radiação após tratamento pós-irradiado com swainsonina. O tratamento pós-irradiado de células sobreviventes não é capaz de reverter o fenótipo mais invasivo adquirido pelas células após a irradiação.

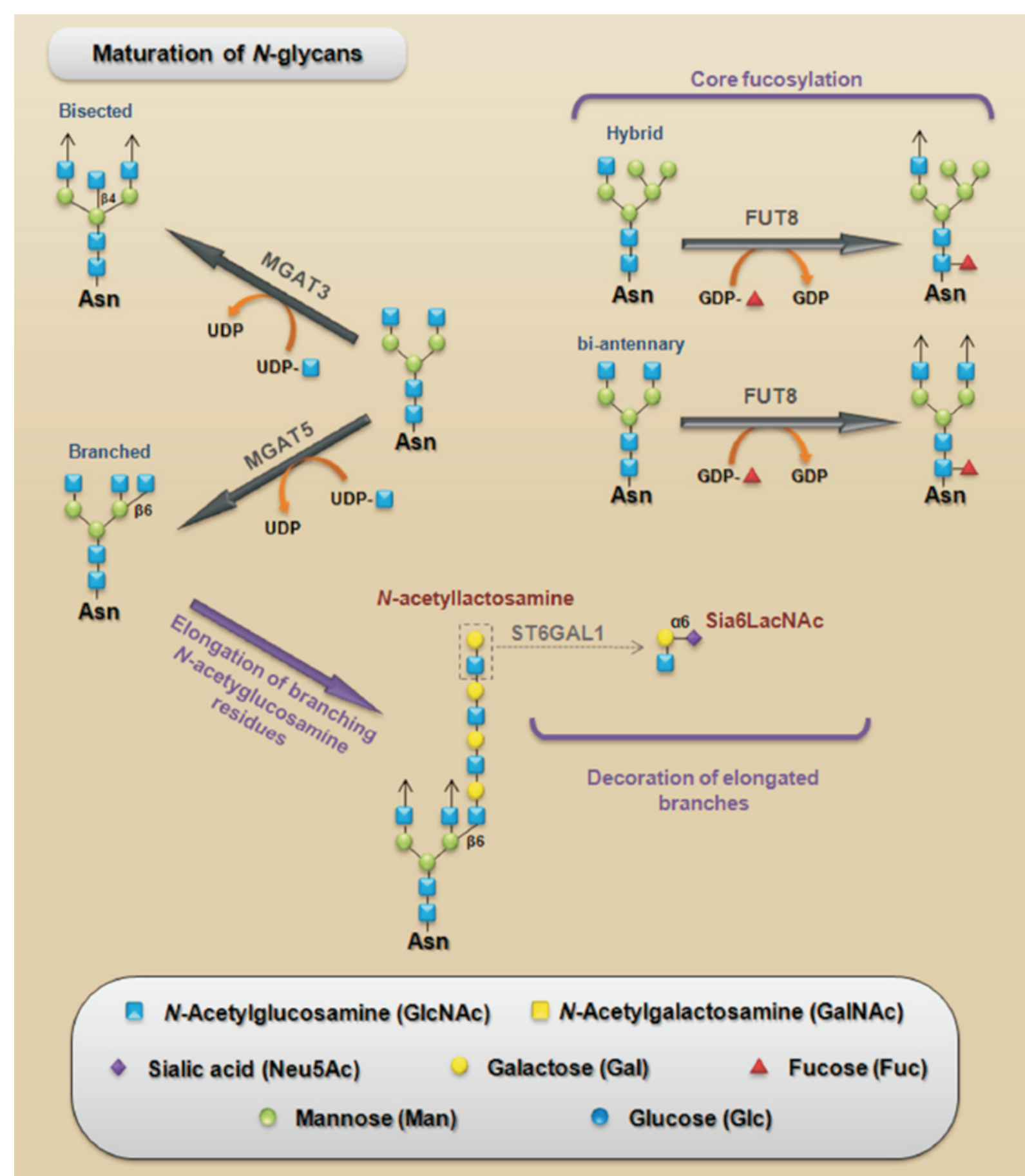


Figura 7: Representação esquemática dos três componentes da maturação de *N*-glicanos: (I) core fucosilação; (II) extensão de ramificações formadas por *N*-acetilglicosamina; e (III) decoração das extensões (antenas). Ramificações formadas por  $\beta$ 1,6-*N*-acetilglicosamina e Sia6LacNAc são exemplos de antígenos de carboidrato associados ao CCR. MGAT3 cataliza a transferência de GlcNAc de UDP-GlcNAc para a core manose por uma ligação  $\beta$ 1,4, gerando, assim *N*-glicanos bisectados e MGAT5 cataliza a transferência de GlcNAc por uma ligação  $\beta$ 1,6, gerando *N*-glicanos ramificados. MGAT5, *N*-acetilglicosaminiltransferase V; MGAT3, *N*-acetilglicosaminiltransferase III; FUT8,  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferase; ST6GAL1,  $\alpha$ 2,6-sialiltransferase.

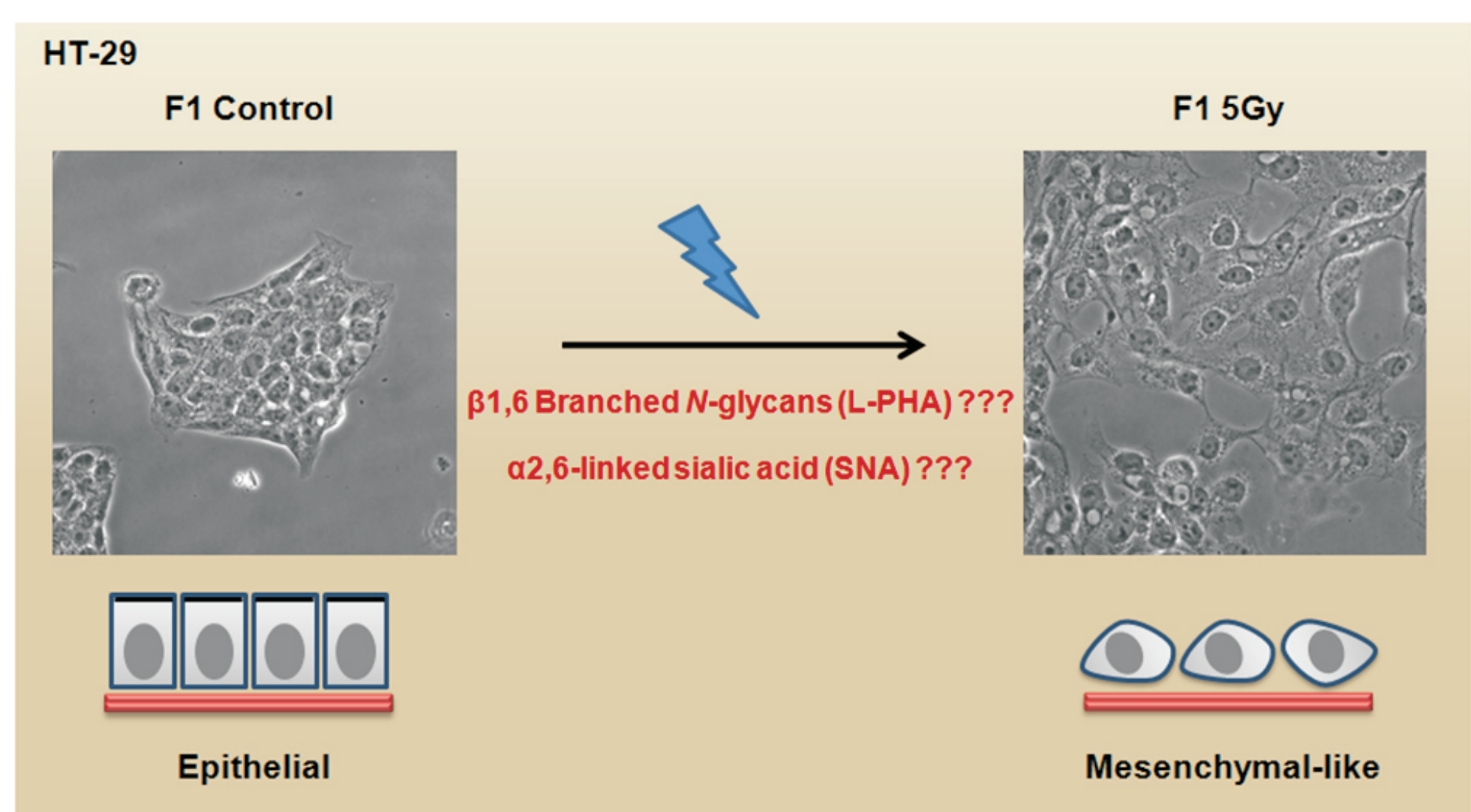


Figura 2: Morfologia celular por microscopia de contraste de fase. As progênies derivadas de células irradiadas exibem um fenótipo *mesenchymal-like* com formação de colônias anormais e células mais dispersas quando comparadas com as

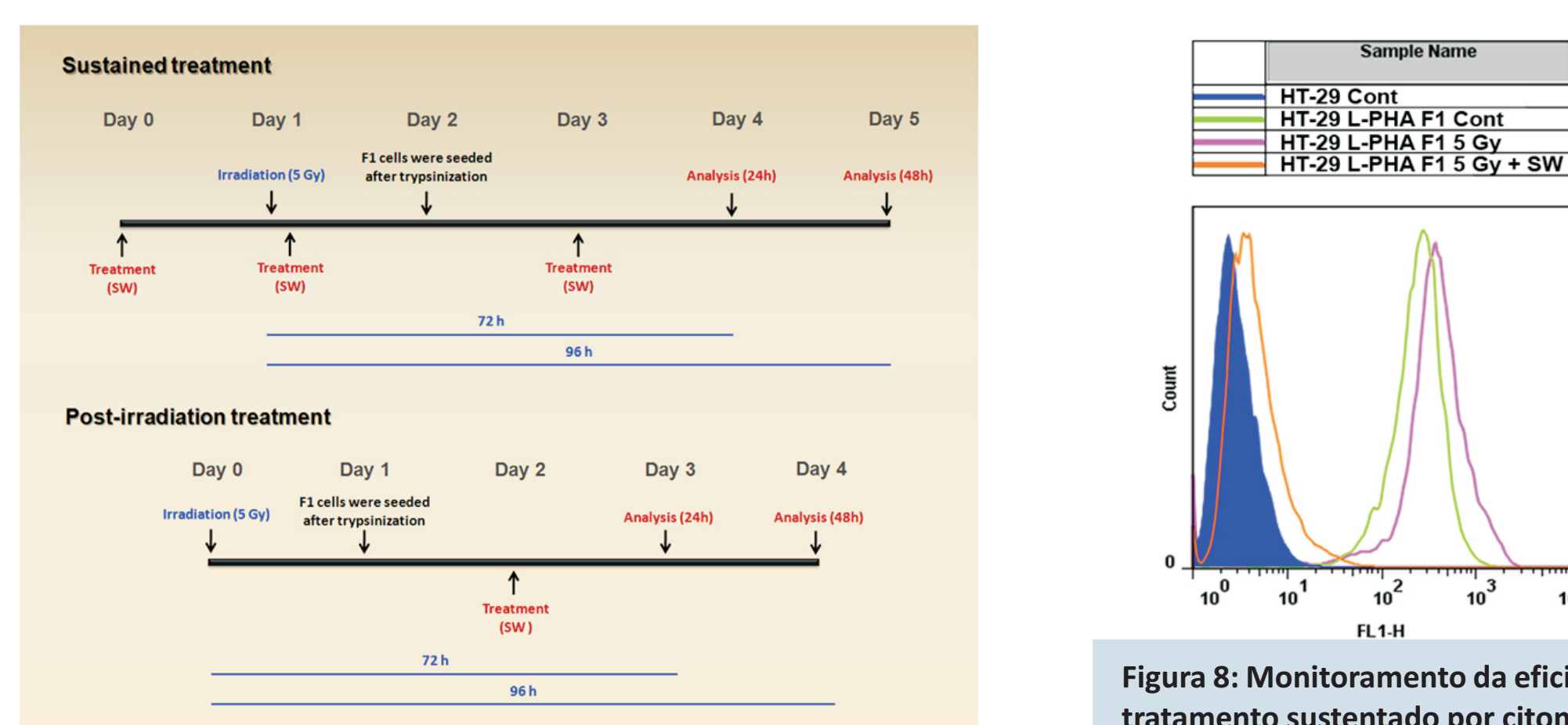


Figura 8: Estratégias de tratamento usando swainsonina. Dois protocolos de tratamento foram desenvolvidos, o tratamento sustentado e o tratamento pós-irradiado. No primeiro, a progênie é tratada com swainsonina antes e depois da exposição a radiação. No segundo, a progênie é tratada com swainsonina apenas após a exposição a radiação.

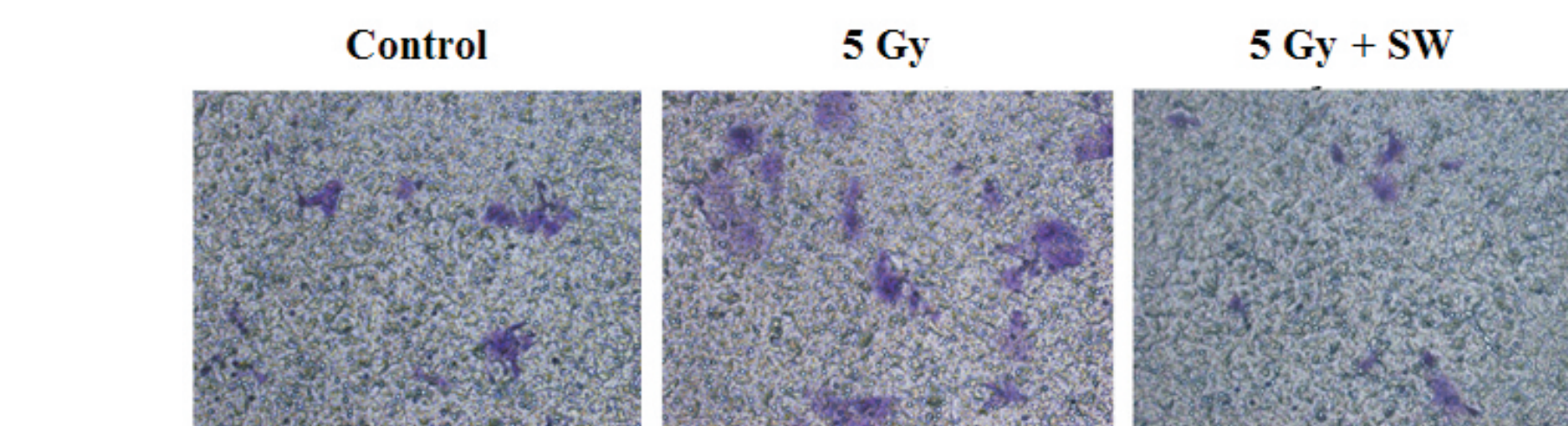


Figura 10: Análise do potencial invasivo das progênies sujeitas a radiação após tratamento sustentado com swainsonina. As células F1 5Gy+SW mostraram menor invasividade quando comparadas com as células F1 5Gy.

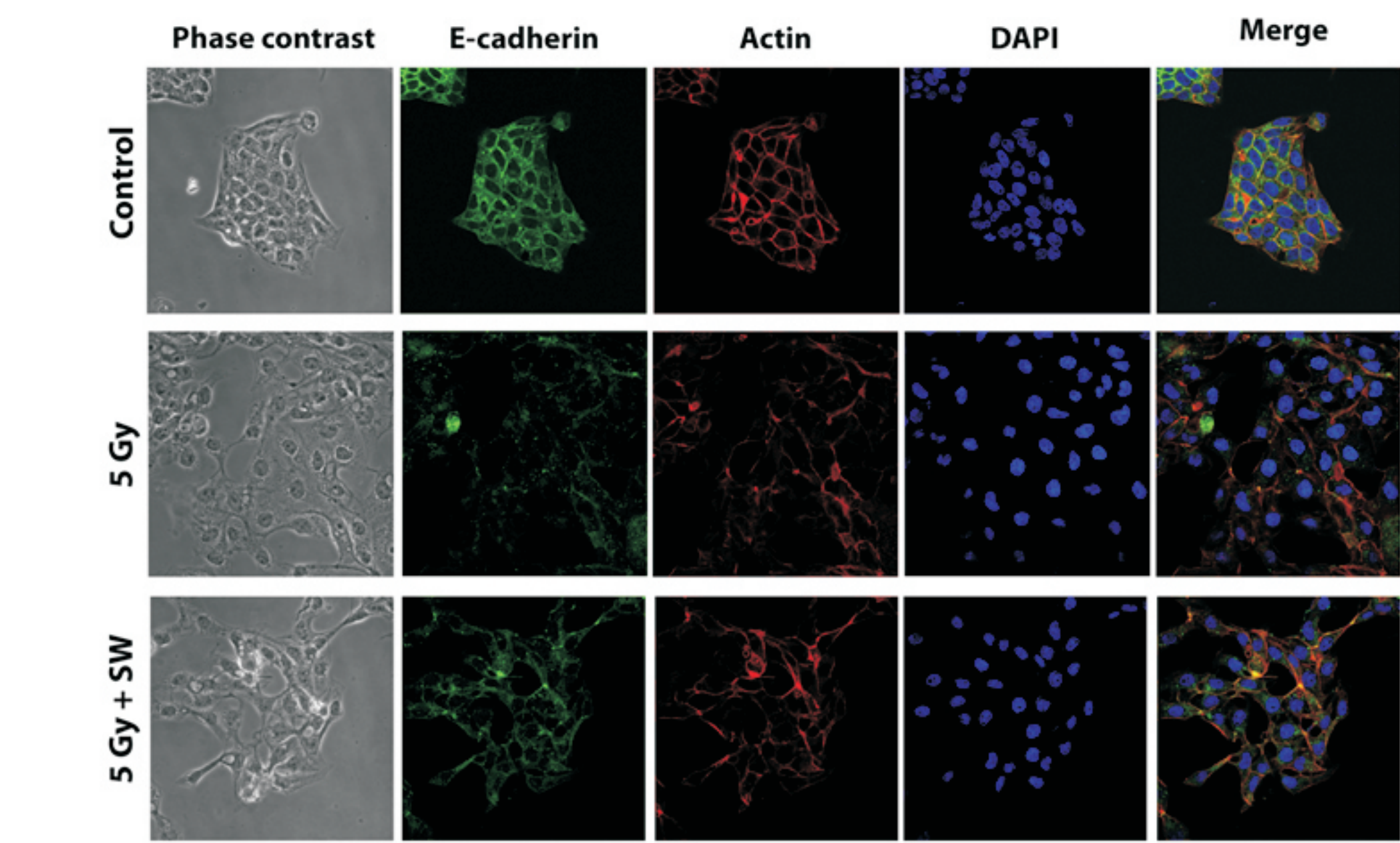


Figura 12: Análise da localização subcelular da E-caderina e da organização do citoesqueleto de progênies derivadas de células sobreviventes a radiação após o tratamento pós-irradiado com swainsonina. Imunofluorescência da progênie F1 5Gy+SW depois de 48 horas de tratamento pós-irradiado indicou que a E-caderina se mantinha apresentando uma localização citoplasmática, similar àquela observada em células F1 5Gy.