



Ana Margarida Coelho Marques
Licenciada em Biotecnologia

Identificação de Glicanos no estudo do Microambiente Tumoral

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Maria Angelina de Sá Palma, UCIBIO, FCT-NOVA
Co-orientador: Ana Catarina Maurício Brito Ataíde Montes iBET &
ITQB-NOVA

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Salgueiro
Arguente: Doutora Lara Marcos da Silva
Vogal: Prof. Doutora Maria Angelina de Sá Palma



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2018

Ana Margarida Coelho Marques

Licenciada em Biotecnologia

**Identificação de Glicanos no estudo do
Microambiente Tumoral**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Maria Angelina de Sá Palma, UCIBIO, FCT/UNL
Co-orientador: Ana Catarina Maurício Brito Ataíde Montes, iBET &
ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Salgueiro
Arguente: Doutora Lara Marcos da Silva
Vogal: Prof. Doutora Maria Angelina de Sá Palma

Setembro 2018

‘Identificação de Glicanos no estudo do Microambiente Tumoral’

Copyright © em nome de Ana Margarida Coelho Marques, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora, **Doutora Angelina Palma**, e co-orientadora, **Doutora Catarina Brito**, por me terem dado esta oportunidade de realizar a tese de mestrado nos seus grupos de investigação, pela constante disponibilidade para esclarecerem as minhas questões, pelo carinho e simpatia que sempre demonstraram.

À **Professora Doutora Maria João Romão**, enquanto líder do grupo de investigação XTAL da FCT-UNL, pela forma como me recebeu e pelo seu empenho nas atividades desenvolvidas.

À **Doutora Márcia Correia**, que amavelmente me apresentou todos ‘os cantos’ do laboratório, me explicou cuidadosamente todos os procedimentos de segurança e me transmitiu preciosas dicas a nível prático.

À **Mestre Viviana Correia**, que esteve sempre lá nos momentos em que precisei e me direcionou para os caminhos corretos, quer a nível de parte prática quer a nível de conhecimentos teóricos, sempre disponível mesmo que tivesse inúmeras tarefas para fazer. A companheira das noites no laboratório. Aquela pessoa que sempre foi positiva embora eu por vezes fosse demasiado pessimista. Muito obrigada por tudo, minha querida!

À **Doutora Benedita Pinheiro**, que amavelmente me facultou material para que pudesse realizar os meus ensaios e que embora distante sempre acompanhou de perto todo o decorrer do projeto.

À **Professora Tem Feizi**, ao **Doutor Wengand Chai** e à **Doutora Lisete Silva** do Glycosciences Laboratory, Imperial College London pela colaboração na construção dos *microarrays* de hidratos de carbono.

Ao **Professor Paul Crocker**, da Universidade de Aberdeen pela colaboração de investigação e pela obtenção das lectinas.

Aos colegas do grupo **XTAL**, pela forma como me receberam, por toda a simpatia e apoio que demonstraram ao longo do meu trabalho. Obrigada pelas gargalhadas que partilhámos juntos! Aos colegas do grupo **Advanced Cell Models** pela forma muito simpática que sempre me receberam e acompanharam no laboratório. Um obrigado especial ao Nuno Lopes que sempre se prontificou para me esclarecer qualquer questão e me explicou a parte prática dos modelos ao pormenor.

Aos meus **colegas de bancada**. À Joana Gonçalves pela pessoa fantástica que é, que nunca desiste de nada embora as coisas corram de forma menos perfeita, que entrava cedo e saía tarde, mas que mesmo assim tinha sempre uma resposta afirmativa quando se tratava de atividades extracurriculares. Obrigada pelos teus conselhos e pela forma querida que sempre me falaste. Ao Bruno Carneiro pela sua constante boa disposição e espírito encorajador que em muitos dias fez falta e sem isso nada seria igual. À Filipa Trovão, que sempre estive ao nosso lado para ajudar na parte prática e nas atividades extra laboratório. Foi na zona do café que nos rimos das mais diversas peripécias, mas também foi lá que nos conhecemos um pouquinho mais. Nunca vou esquecer esses tempinhos que passámos juntos. Obrigado!

Aos **colegas de mestrado**, que partilharam comigo esta aventura, nomeadamente à Marina Bonifácio, Catarina Reis e Rui Gaspar, que apesar da distância sempre mantivemos uma ponte de ligação para esclarecer dúvidas, lamentações e realizar atividades. São amizades para a vida!

A todos os **docentes** do mestrado em Bioquímica, pelos conhecimentos que me transmitiram. Um agradecimento especial ao coordenador do mestrado em Bioquímica **Professor Ricardo Franco**, sempre disponível para qualquer esclarecimento.

À **Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa**, instituição na qual ingressei para o Mestrado em Bioquímica.

À minha família. Ao meu **namorado**, por estar comigo nos bons e maus momentos, por me incentivar e ouvir as minhas lamentações. À minha **mãe** que sempre acreditou em mim e me incentivou a continuar. Aos meus **avós**, pelo vosso amor e carinho, muitíssimo obrigado. Embora a vida tenha colocado as mais diversas peripécias no caminho, ambos sabemos que não foi fácil, mas juntos conseguimos! Um grande obrigado, adoro-vos. ♥ ♥ ♥ Sem vocês isto não teria sido possível e por isso dedico-vos esta tese. ♥

Resumo

Alterações na glicosilação desencadeiam mecanismos de desregulação no microambiente tumoral (TME), o qual desempenha um papel importante para o desenvolvimento e progressão do tumor. Como tal, a caracterização de interações proteína-glicano é um passo crucial para descodificar eventos que ocorrem no TME. Esta Tese teve como objetivo aplicar uma abordagem multidisciplinar para estudar estas interações que englobou: princípios da tecnologia de *microarrays* e modelos de cultura celular 3D que recapitulam aspetos do TME. Os *microarrays* de glicanos foram utilizados para análise de especificidade de um potencial alvo de interesse em TME expresso em macrófagos: a Siglec-15. Os resultados comprovam a especificidade para o antígeno sialil-Tn (STn) associado a tumor, e revelam uma especificidade alargada a estruturas α 2-3- e α 2-6-sialiladas, que podem revelar a função desta lectina no TME. Foram desenvolvidos *microarrays* de extratos de proteína obtidos de modelos celulares 3D de carcinoma mamário (recorrendo às linhas celulares MCF7 ou BT474. Os modelos celulares 3D combinam a microencapsulação em alginato e a tecnologia de biorreatores para gerar mono ou co-culturas celulares. Os *microarrays* foram analisados com lectinas e anticorpos para identificação de epítomos glicosilados. Identificaram-se os antígenos STn e H-tipo 2 como possíveis epítomos alvos em TME.

Palavras-chave: Glicosilação, *microarrays* de glicanos, Siglec-15, cancro da mama, extratos celulares MCF7 e BT474, modelos celulares 3D de microambiente tumoral, antígenos STn e H-tipo 2

Abstract

Alterations in the glycosylation trigger mechanisms of deregulation in the tumour microenvironment (TME), which play an important role for the development and progression of the tumour. As such, the characterization of protein-glycan interactions is a highly important step in decoding events that occur in the TME. This Thesis aimed to apply a multidisciplinary approach that encompassed the principles of microarray technology and 3D cell culture models that recapitulate features of the TME. Glycan *microarrays* were used for analysis of the specificity of a TME target of interest, expressed in macrophages: Siglec-15. The results corroborate the specificity towards the tumour-associated antigen sialyl-Tn (STn), but also showed a broad specificity towards α 2-3- and α 2-6-linked sialylated glycans, which may reveal the function of Siglec-15 in the TME. *Microarrays* were developed using protein extracts obtained from 3D cell culture models of MCF7 or BT474 breast cancer cell lines. The 3D cell models employed combine microencapsulation in alginate and bioreactor technology for mono- and co-culturing cells. The produced *microarrays* were used in the binding analysis with lectins and antibodies for identification of glycan epitopes. The STn and H-type 2 antigens were identified as possible targets in TME.

Keywords: Glycoylation, glycans *microarrays*, siglec-15, breast cancer, cell extracts MCF7 and BT474, tumor microenvironment 3D cell models; STn and H-type 2 antigens

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>III</i>
<i>Resumo</i>	<i>V</i>
<i>Abstract</i>	<i>VII</i>
<i>Índice</i>	<i>IX</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>XII</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>XIV</i>
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	<i>XVI</i>
Capítulo 1- Introdução e Objetivos	I
1.1 Glicosilação	3
1.1 N-glicosilação de proteínas	4
1.1.2 O-glicosilação de proteínas	4
1.2 Glicosilação em Cancro	6
1.2.1 Sialil-Tn (STn) e Tn	7
1.2.2 Antígenos Lewis	9
1.2.3 Siglecs	10
1.2.4 Anticorpos	11
1.3 Microambiente Tumoral	13
1.4 Modelos de cultura celular 3D	15
1.5 <i>Microarrays</i> de hidratos de carbono ou glicanos	16
1.5.1 Bibliotecas de sondas oligossacarídicas	16
1.5.2 Métodos de imobilização: covalente e não-covalente	17
1.3.2 Aplicações biológicas de <i>microarrays</i> de glicanos	19
1.4 Objetivos	20
Capítulo 2 – Estudo de Especificidade da Siglec-15	21
2.1 Introdução	23
2.2 Materiais e Métodos	23
2.2.1 Construção de <i>microarrays</i> de glicanos	23
2.2.2 Ensaio de ligação	26
2.2.3 Quantificação e introdução na Base de Dados	29
2.3 Resultados e Discussão	31
2.4 Conclusões	34
Capítulo 3 – Construção e análise de <i>microarrays</i> com extratos proteicos de linhas celulares de cancro	35

3.1 Introdução	37
3.2 Materiais e Métodos	37
3.2.1 Obtenção de extratos de proteína de linhas celulares	37
3.2.2 Ensaio de ligação em <i>microarrays</i>	39
3.3 Resultados e Discussão	49
3.3.1 Ensaio de otimizações iniciais	49
3.3.2 Avaliação de diferentes tipos de <i>slides</i> de nitrocelulose para o ensaio de ligação	58
3.3.3 Ensaio de ligação com anticorpos anti-Le ^X , anti-Le ^Y e anti-STn	59
3.3.4 Avaliação do perfil de glicosilação STn em extratos de culturas 2D e 3D	63
3.4 Conclusões	64
Capítulo 4 – Conclusões globais e trabalho futuro	67
4.1 Conclusões globais e trabalho futuro	69
Referências	71
Anexos	79
Anexo I - Condições do ensaio: Estudo de especificidade de Siglec-15	81
Anexo II - Protocolo: Ensaio de extratos celulares em <i>microarrays</i> com 16 blocos de nitrocelulose	82
Anexo III – Matriz de resultados proveniente do ensaio de especificidade de Siglec-15	83
Anexo IV – Esquema de impressão de extratos e controlos em <i>slide</i> constituído por 2 blocos de nitrocelulose	85
Anexo V - Protocolo: Ensaio de extratos celulares em <i>microarrays</i> com 2 blocos de nitrocelulose	86

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação de <i>N</i> e <i>O</i> -glicanos.	5
Figura 1.2 - Estrutura do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac).	5
Figura 1.3 - Representação de glicanos expressos em células normais e glicanos expressos em células de cancro (Glicosilação Aberrante).	7
Figura 1.4 - Representação da biosíntese do antígeno STn a partir de Tn.	8
Figura 1.5 - Representação dos determinantes de Lewis.	9
Figura 1.6 - Representação esquemática da ligação entre STn e Siglec-15.	11
Figura 1.7- Representação esquemática da estrutura da imunoglobulina G (IgG).	12
Figura 1.8 - Representação da diversidade biológica existente no microambiente tumoral.	13
Figura 1.9 - Esquema representativo de modelos de cultura celular em 3D.	15
Figura 1.10 - Representação esquemática de <i>microarrays</i>	18
Figura 2.1 - Representação esquemática do <i>slide</i> utilizado no ensaio da Siglec-15.	23
Figura 2.2 - Esquema de ensaio com <i>microarrays</i> de glicanos.	24
Figura 2.3 - Estruturas presentes nas mucinas.	24
Figura 2.4 - Representação esquemática de <i>slide</i> constituído por 16 blocos de nitrocelulose.	25
Figura 2.5 - <i>Slide</i> utilizado no ensaio de Siglec-15.	27
Figura 2.6 - Ficheiros obtidos antes e após o ensaio.	30
Figura 2.7 - Esquema representativo da utilização da base de dados.	30
Figura 2.8 - Análise de especificidade de quimeras hSiglec-15-Fc humanas e anti-STn 3F1.	32
Figura 3.1 - Esquema resumo do processo de obtenção de extratos proteicos.	39
Figura 3.2 - Esquema do ensaio de concentração de extratos proteicos por evaporação.	40
Figura 3.3 - Esquema do modo de impressão de <i>slide</i> com recurso a <i>arrayer</i> manual.	41
Figura 3.4 - Esquema de ensaio com <i>microarrays</i> de extratos proteicos.	42
Figura 3.5 - Processo de impressão de <i>slides</i> com recurso a <i>arrayer</i> manual.	42
Figura 3.6 - Esquema de ensaio de ligação com anticorpos e lectinas.	43
Figura 3.7 - Representação esquemática da forma como se realizou o ensaio.	44
Figura 3.8 - Esquema resumo das etapas do ensaio de ligação.	45
Figura 3.9 - Representação esquemática dos programas e tipos de ficheiros obtidos no decurso do ensaio.	48
Figura 3.10 - Comparação da morfologia dos <i>spots</i>	49

Figura 3.11 - Gráficos provenientes dos ensaios com anticorpos anti-STn (1:100) e anti-Le^Y(1:500)	50
Figura 3.12 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anticorpos anti-STn (1:100) e anti-Le^Y (1:500).....	51
Figura 3.13 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com a lectina UEA I (25µg/mL) e sistema de detecção (1:1000)	52
Figura 3.14 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A na semana 1, 3 e 5 após imobilização	53
Figura 3.15 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método B na semana 1, 3 e 5 após imobilização	54
Figura 3.16 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A na semana 1	55
Figura 3.17 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A	56
Figura 3.18 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A e método B	57
Figura 3.19 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL) nos diferentes slides	58
Figura 3.20 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-Le^X (1:500), anti-Le^Y (1:500), anti-IgM (1.67 mg/mL) e streptavidina (1:1000)	60
Figura 3.21 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-Le^Y (1:500) e anti-IgM (1.67 µg/mL).....	61
Figura 3.22 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-STn (1:100) e streptavidina (1:1000)	62
Figura 3.23 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-STn (1:100), anti-IgG conjugado com Alexa-Fluor-647 (2 µg/mL).....	63
Figura Suplementar 1	84
Figura Suplementar 2	85

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Lista de lectinas e anticorpos utilizados no ensaio Siglec-15.....	28
Tabela 1.2 - Lista ordenada de sondas para as quais Siglec-15 apresentou especificidade. ...	33
Tabela 2.1 - Lista de anticorpos e lectinas	46
Tabela 2.2 - Lista de glicoproteínas utilizadas como controlo para a imobilização	47
Tabela 2.3 - Concentrações dos diferentes extratos celulares, MCF7 e BT474, em mono e co-cultura	49
Tabela Suplementar 1	81

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% - Percentagem

% (w/v) – Percentagem peso/volume

2D - Bidimensional

3D – Tridimensional

A - Alanina

aa- aminoácido

Abs - anticorpos

ácido A - Ácido manurónico

ácido G - Ácido glucorónico

Asn - Asparagina

BSA - Albumina de Soro Bovino

BSM - Mucina submaxilar de bovino

CAFs - Fibroblastos associados a cancro

CDRs - Regiões que determinam a complementaridade

CFG - *Committee of the Consortium for Functional Glycomics*

CG - Complexo de Golgi

Cy3 - Cyanine 3

DHPE - 1,2-dihexadecil-sn-glicero-3fosfoetanolamina

DMEM - Dulbecco MEM

ECM - Matriz extracelular

ER - Recetor de estrogénio

Fab - Fragmentos de ligação ao antigénio

Fc - Fragmento cristalizável

fmol - Fentomol

Fuc - Fucose

GAGs - Glicosaminoglicanos

Gal - Galactose

GalNAc - N-acetilgalactosamina

GBPs - *Glycan binding proteins*

GlcA – ácido glucorónico

GlcNAc - Ácido N-acetilglucosamínico

Gluc - Glucose

GW112 – Fator de crescimento do tumor

hCP - Ceruloplasmina Humana

HER 2 -receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

Ig(s)- Imunoglobulina(s)

Lac - Lactose

Le^X - Lewis X

Le^Y - Lewis Y

LNnT - lacto-N-neo-tetraose

LNT - lacto-N-tetraose

Man - Manose

N - Azoto

NABS - Solução salina de actínio de sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NeuAc – Ácido neuramínico

NFs - Fibroblastos com fenótipo Normal

NGL(s) - Neo-glicolípido(s)

NH₄CO₃ - Carbonato de amónio

NHS - N-Hidroxisuccinimida

NK - Natural *killer*

PBS - Tampão de fosfato salino

PMT - *Photomultiplier tube*, ganho

PolyLacNAc - poli-N-acetilactosamina

PR - Recetor da Progesterona

Pro - Prolina

PSM - Mucina de estômago de porco

R - Arginina

RE - Retículo Endoplasmático

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

RPPA - *Microarrays* de proteína de fase reversa

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Ser - Serina

SLe^A - sialil Lewis A

SLe^X - sialil Lewis X

SNA/SNL - Lectina *Sambucus Nigra*

STn - Sialil-Tn

TAMs - Macrófagos associados a tumores

TBS - Solução salina de Tris

Thr – Treonina

TME – Microambiente tumoral, do inglês *Tumour microenvironment*,

Tn - *Thomsen-nouveau*

UEA I - Aglutinina *Ulex Europaeus* I

V_H - Região variável (cadeia pesada)

V_L - Região variável (cadeia leve)

VVL/VVA - Lectina *Vicia Villosa*

Capítulo 1- Introdução e Objetivos

1.Introdução e Objetivos

1.1 Glicosilação

A Glicosilação é um processo enzimático universal que consiste na ligação de hidratos de carbono (mono-, oligo- ou polissacáridos) a locais específicos de outras macromoléculas como proteínas (glicoproteínas) ou a lípidos (glicolípidos) formando os glicoconjugados. É comum referirem-se os hidratos de carbono de glicoproteínas ou glicolípidos como glicanos. Os glicanos são estruturas altamente diversificadas e complexas que decoram as superfícies de todas as células vivas formando o *glycocalyx*. Aí, são reconhecidos por proteínas de ligação a glicanos (do inglês, *glycans binding proteins*, GBPs) (Rillahan & Paulson, 2011; Schnaar, 2015). As funções biológicas dos glicanos são diversas e incluem: funções estruturais/modulatórias e reconhecimento intrínseco/extrínseco, essencial para interações célula-célula e célula-exterior (Varki, 2016; Varki & Lowe, 2009). Essas interações controlam processos fisiológicos e são especialmente importantes em organismos multicelulares, visto que dependem da cooperação entre as células. Deste modo, os glicanos estão envolvidos em quase todos os processos biológicos do corpo bem como nas principais doenças que afetam a humanidade.

A biossíntese de glicanos é realizada pela ação de glicosiltransferases, que catalisam a formação de ligações glicosídicas entre monossacáridos. Estas enzimas transferem monossacáridos de um dador glicosil para um aceitador glicosil e são consideradas as principais enzimas envolvidas no processo dinâmico de Glicosilação. Este processo, depende da expressão de enzimas, síntese de dadores glicosil, competição de diferentes enzimas pelo mesmo substrato, estrutura e conformação da enzima (Spiro, 2002). Em células eucarióticas, este processo pode ocorrer no lúmen do retículo endoplasmático (RE) ou no complexo de Golgi (CG). É uma das modificações pós-traducional mais elaboradas e complexas que as proteínas podem sofrer, proporcionando-lhes forma e função (Varki & Sharon, 2009).

Para a diversidade de glicanos existentes contribuem as diferenças na composição dos monossacáridos, como substituições nos glicanos existentes, a presença ou ausência de estruturas ramificadas e as diferentes ligações glicosídicas (Bertozzi & Rabuka, 2009; Pinho & Reis, 2015).

1.1.1 N-glicosilação de proteínas

Este processo corresponde à formação de *N*-glicanos e ocorre em dois compartimentos celulares distintos: inicia-se no retículo endoplasmático e termina no complexo de Golgi. O início do processo de *N*-glicosilação é caracterizado pela formação de um oligossacárido composto por 14 resíduos associados a um grupo *dolichol* (Maureen & Kurt, 2011). A primeira fase ocorre na membrana do retículo endoplasmático (lado citoplasmático) onde são adicionados dois ácido *N*-acetilglucosamínico (GlcNAc) e cinco resíduos de Manose (Man). De seguida, o glicano ligado ao lípido é translocado através da membrana para o lúmen, local onde ocorre a segunda fase. Esta, corresponde à adição sequencial de quatro Man e três Glucoses (Gluc). Após este processo é totalmente sintetizado o oligossacárido $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. No lúmen do retículo endoplasmático, a enzima oligossacariltransferase transfere o oligossacárido recém-sintetizado para o aminoácido Asparagina (Asn) do polipéptido nascente. Este passo corresponde à ligação covalente de GlcNAc, presente no oligossacárido, aos grupos amida presentes nas cadeias laterais do aminoácido Asn (Figura 1.1). Este processo requer uma sequência consenso de Asn-Xaa-Ser/Thr, reconhecida pela enzima, onde Xaa pode ser qualquer aminoácido exceto Prolina (Pro). Neste local, as glucoses são removidas por ação de glucosidases e, de seguida, a proteína é transferida do retículo para o complexo de Golgi, seguindo a ordem *cis*, médio e *trans* Golgi, onde sofre alterações de forma controlada por enzimas (Maureen & Kurt, 2011a). Este passo de hidrólise é importante para que a proteína possa ser direcionada para os respetivos locais.

1.1.2 O-glicosilação de proteínas

A biossíntese das cadeias de *O*-glicanos ocorre no complexo de Golgi (Bertozzi & Rabuka, 2009; Reis *et al.* 2010), e envolve a ação sequencial de diferentes glicosiltransferases análogas às que participam na *N*-glicosilação, no entanto, a sua organização é diferente (Maureen & Kurt, 2011b). O processo de *O*-glicosilação corresponde à adição de glicanos, um de cada vez, numa série de reações divididas por etapas que se iniciam com ligação covalente de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ao átomo de oxigénio presente no grupo hidroxilo dos aminoácidos Treonina (Thr) ou Serina (Ser). A extensão da cadeia ocorre por adição de outros monossacáridos que são adicionados enzimaticamente, de forma controlada, para construir estruturas lineares ou ramificadas (Bertozzi & Rabuka, 2009; Pinho & Reis, 2015). Comparativamente com a *N*-glicosilação, não existem sequências alvo específicas como Asn-X-Ser/Thr (Maureen & Kurt, 2011b).

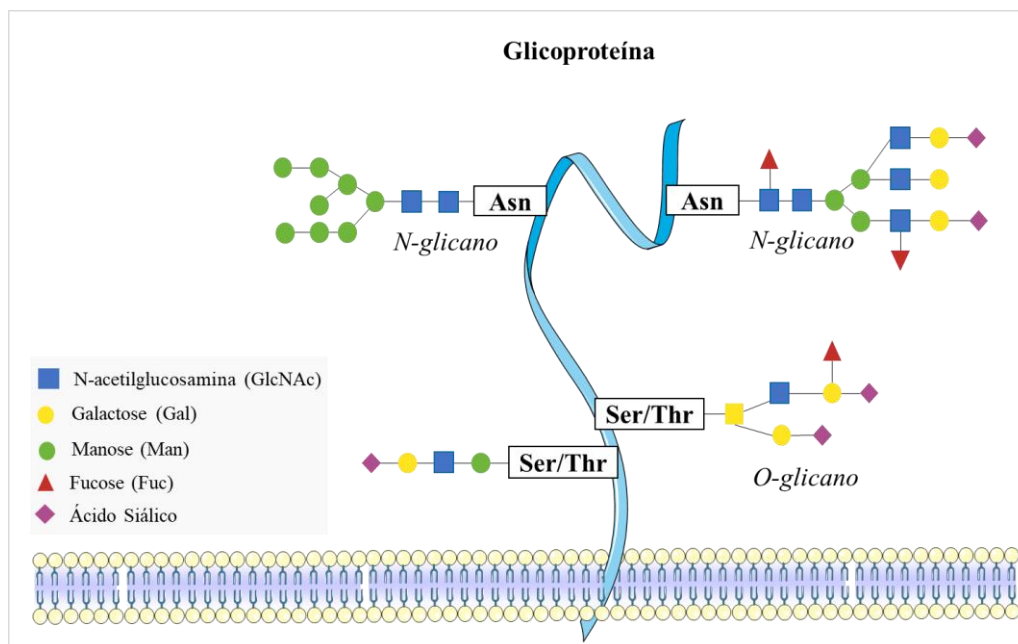


Figura 1.1 - Representação de N e O-glicanos. N-glicanos ligados à proteína através de ligação ao azoto (N) da amida presente no resíduo de aminoácido Asparagina (Asn) e de O-glicanos, ligados à glicoproteína através de uma ligação ao grupo hidroxilo de resíduos aminoácidos Serina (Ser) ou Treonina (Thr). Adaptado de Schnaar, 2015

Os ácidos siálicos podem ser encontrados ligados a posições terminais de N- ou O-glicanos em glicoconjugados (Schultz *et al.* 2012). Corresponde a uma grande família de glicanos onde se inclui o ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), composto por 9 carbonos (Figura 1.2) formados por condensação do piruvato com N-acetilmanosamina (Maureen & Kurt, 2011b). Em células de mamíferos, NeuAc, é a variante mais comum, com um grupo N-acetil no carbono 5 (Schultz *et al.* 2012; Varki & Schauer, 2009).

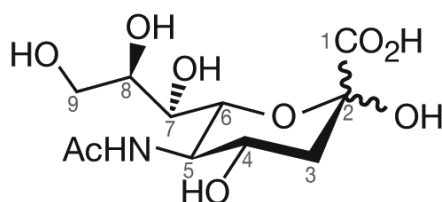


Figura 1.2 - Estrutura do ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Adaptado de Varki, A., & Schauer, R., 2009

1.2 Glicosilação em Cancro

O facto da Glicosilação mediar várias interações que ocorrem na célula, controlar processos fisiológicos, exercer papel nas interações célula-célula e célula-matriz, sinalização celular e imunidade faz com que se associe a inúmeras doenças entre as quais se inclui o cancro (Pinho & Reis, 2015). Por essa razão, variações nos glicoconjugados podem interferir nos processos celulares do cancro, como a inflamação ou microambiente tumoral, associado à transformação oncogénica caracterizada por crescimento, progressão do tumor e metástase. A transformação de células normais em células malignas, ocorre devido a alterações radicais no genoma.

O cancro apresenta capacidade de disseminação para diversos órgãos, quer estes se encontrem perto ou distantes do local de foco inicial. Tal característica é possível graças a estas células possuírem capacidade para se infiltrarem nos vasos sanguíneos e linfáticos, circulando pelo fluxo intravascular com possibilidade de proliferação em outro local, fenómeno este que se designa de metástase. Este suporte, de estabelecimento dos novos vasos sanguíneos (angiogénese) e linfáticos (linfagiogénese), funciona de modo a fornecer nutrientes e oxigénio bem como de via de escape às células de cancro (Nishida *et al.* 2006). Estas células podem exibir estruturas particulares na superfície celular, o que potencialmente permite que sejam diferenciadas das células normais. A **Glicosilação Aberrante** ocorre com elevada frequência no cancro (Figura 1.3), desempenhando um papel fundamental na progressão tumoral, angiogénese e metástase. As células tumorais superexpressam glicanos sialilados, levando à repulsão entre cargas negativas. Essa repulsão pode diminuir a força de adesão célula-célula, contribuindo para o descolamento celular da massa tumoral (Loureiro *et al.* 2015). A glicosilação aberrante impede o reconhecimento e eliminação de células de cancro pelo sistema imune, pois os glicanos estão modificados e é impedida a ligação ligando-recetor necessária ao bom funcionamento do sistema imunológico (Pinho & Reis, 2015; Salem, 2015).

Os principais processos de alteração de glicanos associados ao tumor são a síntese incompleta e a neossíntese. O primeiro processo é encontrado nos estados iniciais da doença e resulta em deficiência na síntese de glicanos complexos, expressos em células epiteliais normais, que leva a que surjam estruturas truncadas em tecidos cancerígenos (Julien *et al.* 2006; Kannagi *et al.* 2008; Pinho & Reis, 2015). O segundo processo é observado em estados avançados da doença e resulta na indução de genes associados ao cancro que estão associados á subexpressão de glicanos em tecido cancerígeno. As alterações mais comuns na Glicosilação são a fucosilação, sialilação, O-glicanos truncados, como referido anteriormente, e ramificações de glicanos ligados a O- ou N-. Estas alterações influenciam a sinalização e metabolismo celular: divisão, diferenciação e localização celular (Stowell *et al.* 2015).

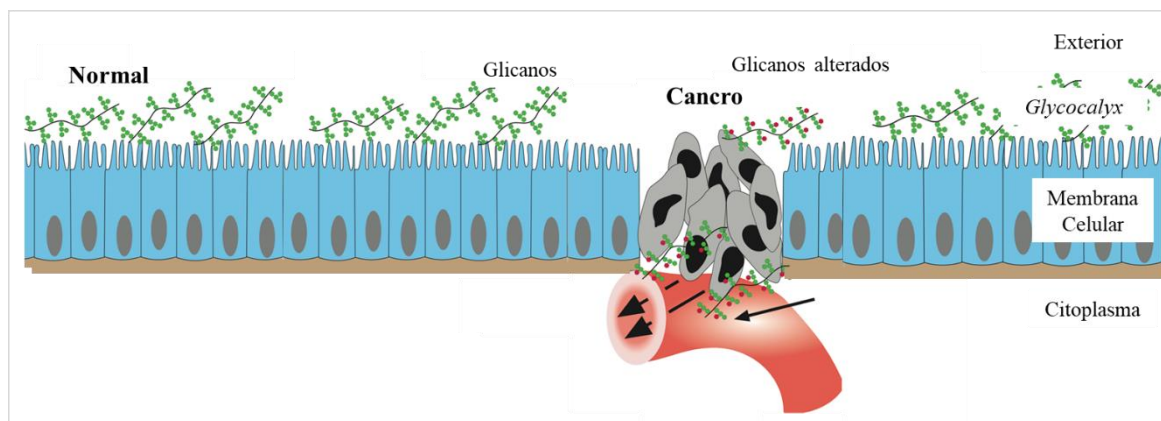


Figura 1.3 - Representação de glicanos expressos em células normais e glicanos expressos em células de cancro (Glicosilação Aberrante) Adaptado de Mulloy *et al.* 2009

O processo de sialilação corresponde à adição de ácidos siálicos por enzimas específicas designadas sialiltransferases (Schultz *et al.* 2012; Varki & Schauer, 2009) que se localizam no complexo de Golgi. Nesta família de enzimas, cada elemento é responsável por determinado tipo de ligação. Ácidos siálicos podem ser adicionados pela sialiltransferase ST3Gal-I na ligação α 2-3 à galactose (Gal); pela ST6Gal-I e ST6Gal-II em ligação α 2-6 a Gal ou pela família das polissialiltransferases a uma ligação α 2-8 a outro ácido siálico. A expressão aberrante destas enzimas é observada em cancro (Schultz *et al.* 2012). Os ácidos siálicos exibem uma diversidade significativa devido às diferentes ligações alfa que podem ser formadas e são frequentemente encontrados nas posições terminais de *N*- e *O*-glicanos.

As funções biológicas dos ácidos siálicos caracterizam-se por: fornecer estabilidade à membrana e modular interações entre moléculas/células/microambiente, sendo considerados uma assinatura molecular que permite o reconhecimento celular por recetores de proteínas ou protegem recetores da ação de proteases ou glicosidasas (Schauer *et al.* 2000).

1.2.1 Sialil-Tn (STn) e Tn

As células tumorais apresentam variações na Glicosilação de proteínas quando comparadas com células saudáveis, tais como glicanos truncados comumente encontrados em glicoproteínas secretadas e de membrana. Alterações na função desempenhada por glicosiltransferases podem levar à formação de glicanos truncados durante o cancro como o *O*-glicano sialil-Tn (STn), presente em mais de 80% dos carcinomas humanos (Munkley, 2016; Pinho & Reis, 2015). A expressão deste antígeno é evidenciada em carcinomas como cancro da mama, ovário e pulmão (Kudelka *et*

al. 2015; Pinho & Reis, 2015). Desta forma, não é considerado um precursor biossintético normal, tal como o antígeno T.

A biossíntese de O-glicanos inicia-se com a adição de GalNAc a resíduos de Ser ou Thr por uma GalNAc-transferase, dando origem ao antígeno *Thomsen-nouveau* (**Tn**) (Figura 1.4). A adição de um resíduo de ácido siálico ao carbono 6 de GalNAc (ligação 2-6) no antígeno Tn origina o dissacárido **sialil-Tn** ($\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-6GalNAc}\alpha\text{1-Ser/Thr}$) também conhecido como CD175s (Loureiro *et al.* 2015), o mais simples O-glicano expresso nas mucinas (Munkley, 2016).

Em **células normais**, no processo no O-glicosilação, a adição sequencial de diversos monossacáridos por glicosiltransferases produz O-glicanos alongados e ramificados. Em oposição, em **células tumorais** ocorre aumento de sialilação do antígeno Tn que bloqueia a normal extensão da cadeia de O-glicanos, levando à expressão de glicanos imaturos como o STn. Uma vez que esta estrutura não pode ser mais alongada, é bloqueada a síntese de outras estruturas glicosídicas (Brockhausen *et al.* 2009; Kudelka *et al.* 2015).

A expressão do antígeno STn está correlacionada com a proteção de células tumorais contra células do sistema imunitário (impedindo o seu reconhecimento e destruição) (Munkley, 2016), diminuição de adesão célula-célula (aumentando os processos de metástase e invasão) (Pinho & Reis, 2015) e, consequentemente, a modulação do fenótipo maligno. Assim, está diretamente associado ao mau prognóstico em pacientes com cancro (Ju *et al.* 2008; Munkley, 2016; Pinho & Reis, 2015).

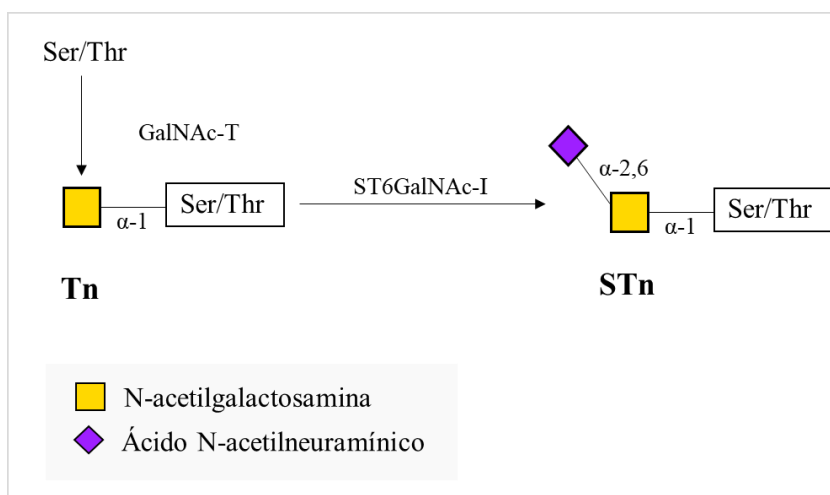


Figura 1.4 - Representação da biossíntese do antígeno STn a partir de Tn. Um resíduo GalNAc é transferido por uma peptidil-N-acetilgalactosaminiltransferase (GalNAc-T) para um resíduo de Ser/Thr, formando o antígeno Tn. Este, pode ser sialilado por ST6GalNAc-I formando $\text{Neu5Ac}\alpha\text{2-6GalNAc}\alpha\text{1-Ser/Thr}$ originando STn. Adaptado de Loureiro *et al.* 2015

1.2.2 Antígenos Lewis

Glicanos recém-sintetizados geralmente surgem em estados mais avançados de cancro devido à indução da expressão de certos genes, dando origem a novos antígenos tais como os determinantes de Lewis (Figura 1.5): Lewis X (Le^X), Lewis Y (Le^Y), sialil Lewis A (SLe^A) e sialil Lewis X (SLe^X) (Sylvain *et al.* 2012). A expressão aberrante destes antígenos está associada a tumores e envolvida no processo de metástase. A expressão de Le^X tem sido relatada em linhas celulares de cancro da mama e está associada ao mau prognóstico da doença (Koh *et al.* 2013). SLe^X encontra-se na parte terminal de glicolípidos e glicoconjugados presentes na superfície da célula (Schiffmann *et al.* 2012) e é constitutivamente expresso em granulócitos e monócitos (Sperandio, 2006) característica que permite a sua mobilidade celular em conjunto com mucinas contribuindo desse modo para a disseminação e metástase de células tumorais (Byrd & Bresalier, 2004). O antígeno Le^Y pertence à família de oligossacáridos difucosilados e a sua expressão está aumentada em 60-90% dos cancros epiteliais humanos (Krug *et al.* 2007) como é o caso do cancro da mama.

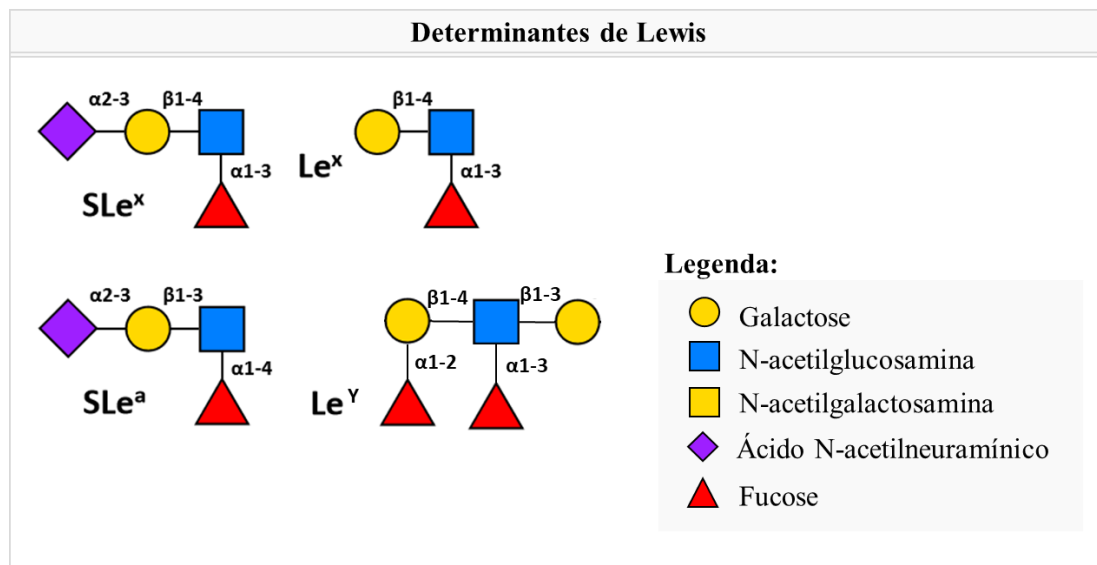


Figura 1.5 - Representação dos determinantes de Lewis Estrutura de sialil Lewis A (SLe^A), sialil Lewis X (SLe^X), Lewis X (Le^X) e Lewis Y (Le^Y). Adaptado de Bertozzi, C. R., & Rabuka, D., 2009; Varki *et al.* 2009)

1.2.3 Siglecs

As lectinas são um grupo de proteínas que reconhecem glicanos específicos e se ligam a estes de forma reversível, sem alterar as suas estruturas, quer estes se encontrem livres ou presentes nos glicoconjugados.

A família Siglec ou proteínas de ligação a ácido siálico (do inglês *acid sialic-binding*), é uma subfamília da superfamília de imunoglobulinas (Ig) (MacAuley *et al.* 2014; Rillahan & Paulson, 2011), é o maior grupo conhecido de lectinas de vertebrados que apresentam em comum um domínio N-terminal de Ig que reconhece glicanos sialilados (Angata *et al.* 2007). A Siglec-9 e Siglec-15 pertencem a esta família e exercem importantes funções de reconhecimento.

Siglec-9 contém a maioria das características do subgrupo Siglec da grande família de proteínas Ig (Zhang *et al.* 2000) e é considerada um recetor inibitório (Tomioka *et al.* 2014). É expressa em células do sistema imunitário: leucócitos (Ohta *et al.* 2010), monócitos (Zhang *et al.* 2000), neutrófilos, (Ohta *et al.* 2010; Briard *et al.* 2018) e em níveis mais baixos nas subpopulações de linfócitos T e B (Salem, 2015) e células natural killer (NK), responsáveis pela lise de células de cancro (Briard *et al.* 2018; MacAuley *et al.* 2014). A Siglec-9 reconhece glicoconjugados com sequências oligossacarídicas terminais constituídas por ácido siálico ligado a Gal por ligações $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ (Belisle *et al.* 2010). Liga-se também a *O*-glicanos com ácidos siálicos terminais expressos em mucinas (Belisle *et al.* 2010). Em particular apresenta afinidade de ligação para o antígeno STn, expresso em mucinas de células de carcinoma mamário.

Siglec-15 é uma proteína transmembranar tipo I, constituída por 2 domínios semelhantes a imunoglobulina Ig e 1 domínio transmembranar que contém resíduo de Lisina e apresenta cauda citoplasmática curta. Associa-se a proteínas adaptadoras de ativação (DAP12 e DAP10) através do resíduo de Lisina no domínio transmembranar, o que implica que este funcione como proteína ativadora de sinalização. Esta lectina é expressa em osteoclastos, macrófagos e células dendríticas. Foi reportado que a Siglec-15 reconhece o antígeno STn (Angata *et al.* 2007) (Figura 1.6) e que esta interação induz a produção de TGF- β por macrófagos associados a tumores (TAMs), contribuindo para um fenótipo imunossupressor, favorecendo a progressão do tumor (Takamiya *et al.* 2012).

Siglec-15 é importante para a formação e sinalização de osteoclastos, regulando positivamente a diferenciação destes. Como tal, esta lectina constitui um potencial alvo terapêutico para novas terapias contra o cancro e osteoporose (Briard *et al.* 2018).

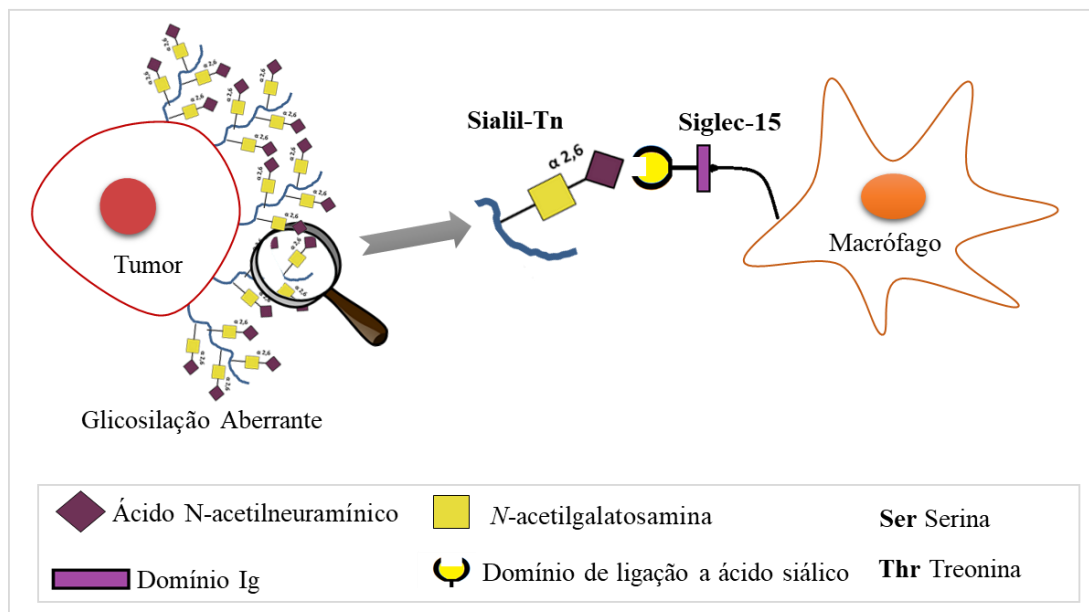


Figura 1.6 - Representação esquemática da ligação entre STn e Siglec-15. O antígeno STn é expresso nas mucinas presentes no tumor, e a lectina Siglec-15, expressa na superfície dos macrófagos. Adaptado de Loureiro *et al.* 2015

1.2.4 Anticorpos

Anticorpos (Abs) ou imunoglobulinas (Igs) são moléculas sintetizadas por linfócitos B, que apresentam capacidade de reconhecer antígenos. Caso apresentem afinidade, ligam-se a estes promovendo a sua inativação ou eliminação. São compostos por dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) (Figura 1.7), ligados por uma região extensível, e uma região constante designada como região cristalizável do fragmento (Fc). Funcionalmente, existem duas regiões principais: N-terminal ou variável, responsável pelo reconhecimento do antígeno e a região C-terminal ou constante que promove a ligação a outras moléculas e a células do sistema imune. O local de ligação ao antígeno é formado por uma região variável de cadeia leve (V_L) adjacente a uma região variável de cadeia pesada (V_H). A especificidade para antígeno é determinada por regiões que determinam a complementaridade (CDRs) presentes em V_H e V_L . Estruturalmente os anticorpos apresentam características idênticas, no entanto, as regiões de ligação ao antígeno podem variar (Loureiro *et al.* 2015). Os anticorpos podem ser divididos em cinco classes distintas de isotopos: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM.

A especificidade tumoral e quase ausência de expressão de antígenos Tn e STn em células normais, aliada à associação destes antígenos com a progressão do cancro, torna-os potenciais alvos para utilizar em terapias (Loureiro *et al.* 2015). Uma abordagem atraente para cancro da mama é a imunoterapia, ou seja, o uso do próprio sistema imunitário para atacar as células tumorais. Anticorpos anti-tumorais podem retardar o crescimento do tumor por citotoxicidade. As células epiteliais adultas saudáveis não expõem o antígeno STn ao sistema imune, como tal, o uso de STn

como antígeno de imunização é uma opção atraente. Estudos clínicos demonstraram que a imunização com vacinas anti-STn pode induzir a produção de IgGs específicos para STn (Miles *et al.* 2011) e em modelos de murganhos foi descoberto que as vacinas STn induzem a proteção tumoral mediada por anticorpos (S. Julien *et al.* 2009). No entanto, em alguns tecidos, o ácido siálico de STn pode ser O-acetilado, mascarando o STn e o reconhecimento por anti-STn é inibido (Loureiro *et al.* 2015).

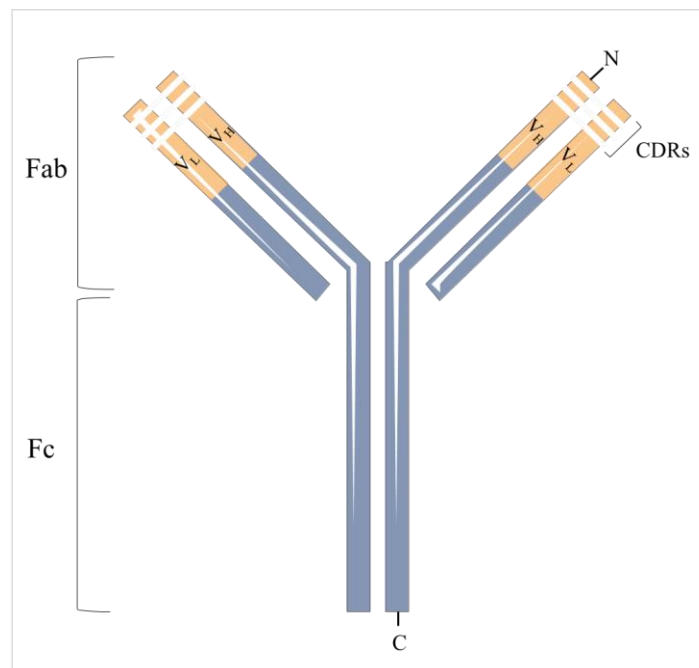


Figura 1.7- Representação esquemática da estrutura da imunoglobulina G (IgG). Identificação dos fragmentos Fab e da região Fc bem como das cadeias V_L e V_H com os respectivos CDRs . Adaptado de Loureiro *et al.* 2015

1.3 Microambiente Tumoral

O Microambiente Tumoral (do inglês *tumour microenvironment*, TME) desempenha um papel importante para o desenvolvimento e progressão do tumor (Hanash & Schliekelman, 2014) (Figura 1.8) e é constituído essencialmente por: células do sistema imunitário (macrófagos e linfócitos) (Kim *et al.* 2015), células sanguíneas, fibroblastos e matriz extracelular (ECM), composta principalmente por colagénios, lamininas e várias glicoproteínas (Hanash & Schliekelman, 2014; Madar *et al.* 2013)

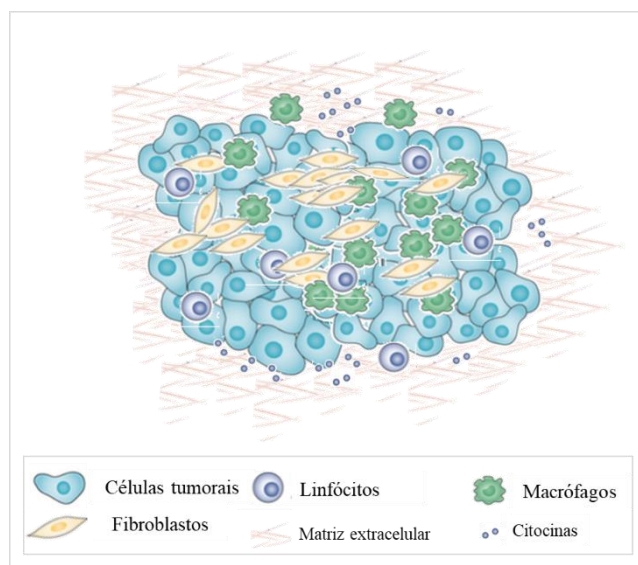


Figura 1.8 - Representação da diversidade biológica existente no microambiente tumoral. Para além das células tumorais, o microambiente é composto por linfócitos, fibroblastos, macrófagos matriz extracelular e fatores solúveis secretados, como citocinas. Adaptado de Hanash & Schliekelman, 2014

Os **Fibroblastos** com fenótipo normal (NFs) são células alongadas (Kalluri & Zeisberg, 2006; Madar *et al.* 2013) presentes no tecido conjuntivo. Apresentam como funções a participação na cicatrização de feridas, síntese de matriz extracelular (Kalluri & Zeisberg, 2006) bem como a produção de fatores de crescimento que controlam processos de crescimento e diferenciação celular. Após contacto com o microambiente tumoral, os NFs transforma-se em fibroblastos associados a cancro (do inglês *cancer associated fibroblasts*, CAFs) onde perdem a sua função normal e passam a exercer funções a favor do crescimento tumoral. Estes, estão presentes no microambiente tumoral, infiltrados entre as células tumorais (Madar *et al.* 2013) ou na matriz (Kalluri & Zeisberg, 2006; Madar *et al.* 2013). Os CAFs apresentam características tais como: abundância de citoplasma quando comparado com NFs, pouca polaridade, crescimento não controlado (Huang *et al.* 2017) com rápida taxa de proliferação, superior a NFs (Madar *et al.* 2013). Intervêm em processos essenciais na promoção e desenvolvimento do tumor (Madar *et al.* 2013), como proliferação, angiogénese, invasão, metástase (Huang *et al.* 2017) e podem promover a

resistência a fármacos (Madar *et al.* 2013). São responsáveis pela produção de citocinas (pequenas proteínas secretadas que promovem comunicação célula-célula atuando ao nível do crescimento e diferenciação celular), quimiocinas bem como fatores de crescimento. Por um lado, as células tumorais secretam fatores que ativam CAFs, tais como IL-1 e TNF- α por outro, as CAFs medeiam o crescimento do tumor por intermédio de quimiocinas capazes de induzir angiogénese e aumentar a capacidade proliferativa das células tumorais quando aliada a TGF- β (Madar *et al.* 2013).

Os **Macrófagos** constituem uma população de células inflamatórias (Tang, 2013) presentes em diversos locais tais como pulmões, fígado, rins, sistema nervoso e tecido conjuntivo (Obeid *et al.* 2013). Dependendo do local em que se encontram, exercem funções na imunidade inata e condicionam a imunidade adaptativa por intermédio da fagocitose de moléculas invasoras. É no microambiente tumoral que se encontram os macrófagos associados a tumores (TAMs) (Mantovani *et al.* 2017) no qual libertam citocinas (Geissmann *et al.* 2010), quimiocinas (Mantovani *et al.* 2004) e fatores de crescimento (Kim *et al.* 2015) que desempenham importantes funções no que respeita a invasão, proliferação e metástases tumorais (Mantovani *et al.* 2017; Taylor *et al.* 2005), estando desta forma associados à progressão do tumor (Allavena *et al.* 2010; Luo *et al.* 2006).

Os monócitos são percursores de macrófagos que circulam na corrente sanguínea migrando para os tecidos onde se diferenciam. Esta diferenciação ocorre entre Macrófagos M1 e M2 (Kim *et al.* 2015). Os primeiros são ativados na presença de mediadores inflamatórios bem como de citocinas Th1, são anti-tumorais pois produzem citocinas pró-inflamatórias, TNF (Cavnar *et al.* 2013) e quimiocinas (Kim *et al.* 2015). Apresentam elevada importância no que respeita à defesa contra agentes patogénicos (Allavena *et al.* 2010) pois recrutam células T para o local (Cavnar *et al.* 2013). Macrófagos M2 diferenciam-se em microambientes ricos em mediadores anti-inflamatórios e/ou citocinas Th2 (Allavena *et al.* 2010; Kim *et al.* 2015) produzindo vários fatores de crescimento (Allavena *et al.* 2010; Luo *et al.* 2006) que suprimem a atividade de células T (Cavnar *et al.* 2013). Numa fase inicial, TAMs podem adotar o fenótipo M1 tendo como função inibir a angiogénese bem como ativar a imunidade mas seguidamente alteram o fenótipo para M2 adotando novas características (Chanmee *et al.* 2014) favoráveis para o tumor (Mantovani *et al.* 2017).

1.4 Modelos de cultura celular 3D

Nos últimos anos, muitos modelos *in vitro* foram desenvolvidos na tentativa de traduzir a complexidade existente no microambiente tumoral (Weigelt *et al.* 2014). Na maioria dos modelos, as células tumorais são cultivadas em culturas monotípicas aderentes (culturas 2D). No entanto, este modelo celular não possui a tridimensionalidade (3D) conferida pelo microambiente tumoral pois as células não se conseguem organizar em estruturas semelhantes a tecidos (Hirt *et al.* 2015). Para este fim, foram desenvolvidos modelos de co-culturas 3D, em que as células do tumor podem ser cultivadas com células do microambiente tumoral. Nestes modelos podem estabelecer-se interações célula-célula e célula-matriz extracelular, mais semelhantes ao que acontece no tumor, importantes quer para a sinalização tumoral quer para respostas tumorais a agentes terapêuticos (Ekert *et al.* 2014).

Os agregados tumorais são cultivados em condições de baixa aderência ou de agitação (Smart *et al.* 2013), podendo posteriormente ser embebidos em componente de matriz celular ou em hidrogéis (Figura 1.9). O alginato é um hidrogel composto pelos ácidos β -D-manurónico (M) e α -L-gulorónico (G) obtidos de espécies de algas castanhas (Andersen *et al.* 2015). O alginato é caracterizado pelas suas propriedades inertes, pela fácil recuperação das células, alta plasticidade, resistência mecânica e por fornecer suporte físico de confinamento celular, compatível com os sistemas em agitação (Estrada *et al.* 2016).

A microencapsulação em alginato tem sido utilizada para estudar o efeito de forças biomecânicas exercidas sobre os agregados tumorais (Alessandri *et al.* 2013), e no estudo da interação entre diferentes tipos de células do microambiente tumoral (Estrada *et al.* 2016, Rebelo *et al.* 2018). Para isto, as microcápsulas de alginato são cultivadas em suspensão, recorrendo a tanques agitados. Esta estratégia é compatível com culturas de longa duração, sem limitações difusionais e permite monitorizar e avaliar a cultura ao longo do tempo.

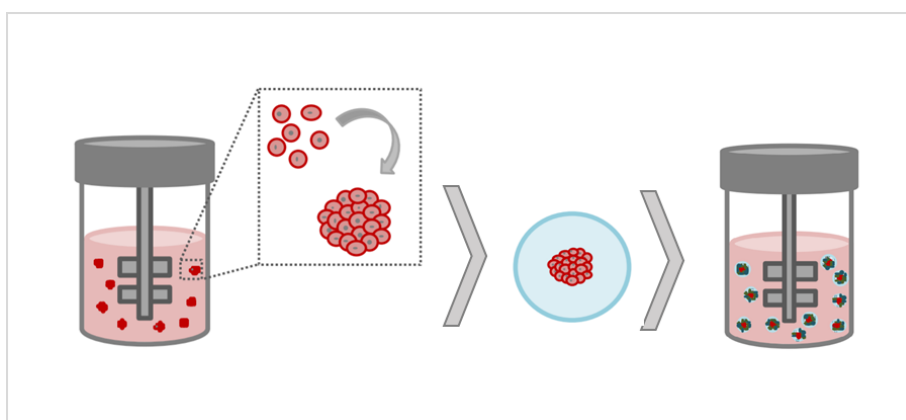


Figura 1.9 - Esquema representativo de modelos de cultura celular em 3D. Cultura de células tumorais em *spinner* por forma a gerar agregados celulares seguido de processo de microencapsulação em alginato (com ou sem adição de fibroblastos/macrófagos) e cultura em *spinner* para que se estabeleçam as condições do microambiente tumoral. Adaptado de Estrada *et al.* 2016

1.5 *Microarrays* de hidratos de carbono ou glicanos

A tecnologia dos *microarrays* de hidratos de carbono ou glicanos (do inglês *carbohydrate or glycans microarrays*) foi introduzida em 2002 (Rillahan & Paulson, 2011) como um método sensível para estudar sistemas de reconhecimento de glicanos associados a vários processos biológicos (Fukui *et al.* 2014).

Por meio desta técnica, é possível analisar uma elevada diversidade de glicanos, imobilizados em *microspots* numa superfície sólida com orientação definida e apresentados de forma multivalente (Hyun *et al.* 2017). Assim, pretende-se reproduzir a apresentação da diversidade estrutural de glicanos expressos na superfície celular.

Características como o uso de pequenos volumes e baixa concentração de amostra, quer na imobilização de glicanos, quer no ensaio de ligação, e a possibilidade de realizar vários ensaios de ligação em paralelo tornam a técnica miniaturizada. A ampla gama de glicanos imobilizados em matrizes sólidas e a possibilidade de testar diferentes analitos de interesse (lectinas, anticorpos, patógenos, soro) fazem desta técnica única e poderosa, constituindo, desta forma, as principais vantagens associadas à sua utilização (Wang *et al.* 2014). Desde a sua introdução, esta tecnologia veio revolucionar estudos na área da Glicobiologia (Heimburg-Molinaro *et al.* 2011) possibilitando a identificação de proteínas que se ligam a glicanos e o estudo da especificidade de ligação (Loureiro *et al.* 2015), de forma a compreender a sua função em processos biológicos (Fukui *et al.* 2002; Wang *et al.* 2014).

1.5.1 Bibliotecas de sondas oligossacarídicas

Existem duas categorias de *microarrays*: *microarrays* de polissacáridos ou glicoconjugados e *microarrays* de oligossacáridos (Liu *et al.* 2009). Polissacáridos ou glicoconjugados podem ser imobilizados em matrizes sólidas por adsorção (Wang *et al.* 2014) enquanto que oligossacáridos apresentam natureza hidrofílica que impede a sua adsorção eficiente na superfície sólida durante o ensaio de ligação. Assim, os oligossacáridos precisam de ser modificados por derivatização a outras moléculas ou a grupos funcionais (sondas oligossacarídicas) para que a sua imobilização seja eficiente (Liu *et al.* 2009). Os principais desafios para a construção de *microarrays* de oligossacáridos incluem: 1) a produção de bibliotecas de sondas oligossacarídicas com sequências conhecidas e bem definidas, e 2) a otimização de estratégias eficientes de imobilização (Wang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015).

As bibliotecas englobam a diversidade de oligossacáridos expressos em glicoproteínas ou glicolípidos de mamíferos e utilizadas na análise da especificidade de proteínas de ligação a glicanos (do inglês *glycan binding proteins*, GBPs). Todas essas bibliotecas são compostas por

oligossacáridos produzidos por síntese química ou químioenzimática, e/ou oligossacáridos isolados de fontes naturais (Rillahan & Paulson, 2011). As bibliotecas de sondas oligossacarídicas mais diversas (estruturalmente e em número) e utilizadas para construção de *microarrays* incluem: a do *Consortium Functional Glycomics* (<http://www.functionalglycomics.org/>) nos *microarrays* desenvolvidos por *Cummings* e colegas, que englobam aproximadamente 700 sondas (*Loureiro et al.* 2015); e a biblioteca nos *microarrays* baseados na tecnologia de neo-glicolípido (NGL) desenvolvidos por *Feizi* e colegas no Imperial College (<https://www.imperial.ac.uk/glycosciences>), que engloba aproximadamente 900 sondas (*Palma et al.* 2014).

1.5.2 Métodos de imobilização: covalente e não-covalente

Foram desenvolvidos diferentes métodos de imobilização para a construção de *microarrays*, nos quais os oligossacáridos são imobilizados de forma covalente ou não-covalente (*Park et al.* 2008; Rillahan & Paulson, 2011; Wang *et al.* 2015).

Nas estratégias de **imobilização covalente**, é necessário que tanto os oligossacáridos como a superfície de imobilização sejam modificados quimicamente. Os primeiros trabalhos de Shin e colegas (*Park et al.* 2004) relataram o uso de oligossacáridos funcionalizados com maleimida para imobilização em *slides* de vidro funcionalizados com um grupo tiol. A imobilização covalente mais conhecida baseia-se na química de amina, na qual os oligossacáridos são funcionalizados com um grupo funcional, amina (Rillahan & Paulson, 2011). Além dos grupos funcionais maleimida e amina, outros exemplos de grupos funcionais específicos, incluem o tiol (*Houseman et al.* 2003), hidrazida (*Hyun et al.* 2017; *Park et al.* 2007) e azida para fixação de oligossacáridos em superfícies sólidas.

Os métodos de **imobilização não-covalente** dependem de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta imobilização é, geralmente, realizada por deposição dos glicanos em matriz de nitrocelulose (Rillahan & Paulson, 2011; Wang *et al.* 2014). O trabalho de *Feizi e colegas* demonstrou a imobilização não-covalente de NGLs e glicolípídios na matriz de nitrocelulose (Figura 1.10). Esta tecnologia envolve a conjugação entre os oligossacáridos e um lípido por meio de ligação oxima (*Liu et al.* 2007) ou via aminação redutora a um aminolípido, 1,2-dihexadecil-sn-glicero-3fosfoetanolamina (DHPE). O lípido promove flexibilidade e movimento do oligossacárido, no ensaio de ligação, o que pode ser essencial para determinados sistemas de reconhecimento.

Este tipo de *microarrays*, baseados em NGL, compreendem NGL preparados a partir de oligossacáridos isolados de uma fonte natural ou obtidos por síntese química, e glicolípídios naturais ou sintéticos. Com recurso a *robot*, NGL e glicolípídios são impressos em *slides*, nos quais são depositados em baixa concentração na ordem de femtomol (equivalente a 10-15 mol) (Palma *et al.* 2014).

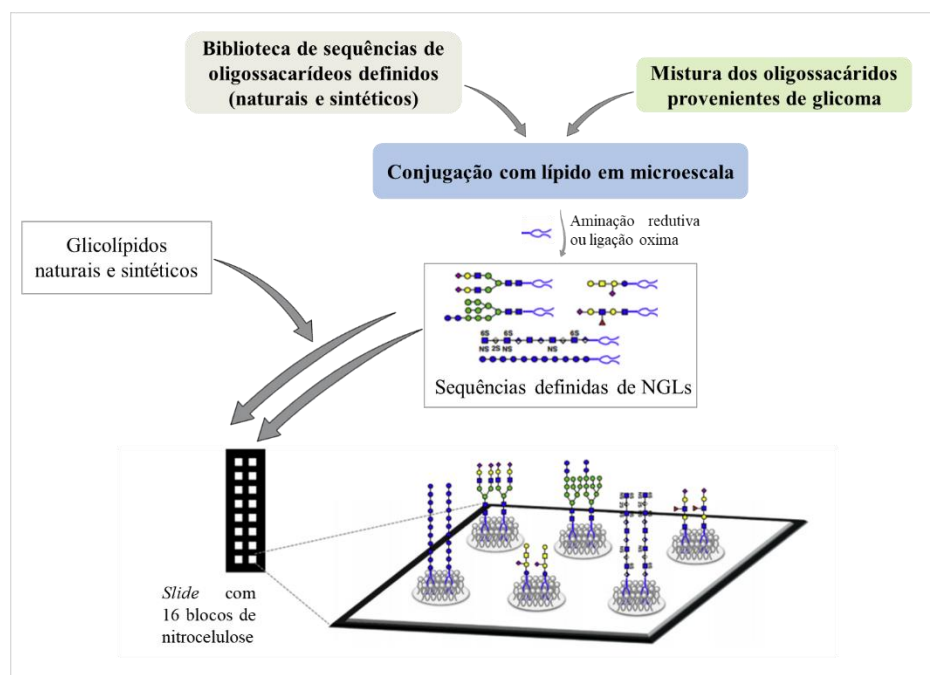


Figura 1.10 - Representação esquemática de *microarrays*. *Microarrays* elaborados por imobilização não-covalente de neo-glicolípídios e glicolípídios. Adaptado de Palma *et al.* 2014

1.3.2 Aplicações biológicas de *microarrays* de glicanos

O sucesso desta técnica está diretamente associado à sua aplicabilidade. Por intermédio dos *microarrays* foi possível mapear interações e desse modo contribuir significativamente para o avanço de áreas como a Glicobiologia. Exemplos disso mesmo são: compreensão de interações glicano-proteína de ligação em sistemas biológicos, detecção de patógenos e rápida avaliação de especificidades substrato-enzimas, identificação de glicanos funcionais que provocam respostas celulares mediadas por lectinas na superfície celular... (Heimburg-Molinari *et al.* 2011). Atualmente são diversas as aplicações desta técnica em investigação associada a doenças. Exemplos disso é a sua aplicabilidade na determinação das especificidades de ligação do vírus influenza (espécie de vírus causador de gripe) ao recetor onde os *microarrays* de glicanos têm sido poderosos. Os neo-glicolípidos (NGL) foram úteis para elucidar um ligando endógeno para estudos da malectina (proteína altamente conservada em mamíferos) (Palma *et al.* 2014). A coordenação entre de *microarrays* constituídos por NGL e espetrometria de massa permitiu a construção de *microarrays* de plantas, fungos e bactérias (Palma *et al.* 2015). Estes *microarrays* têm sido utilizados para identificar e associar novos ligandos a diversos sistemas de reconhecimento de glicanos incluindo lectinas ou anticorpos terapêuticos.

1.4 Objetivos

Um passo importante para decodificar eventos que ocorrem no microambiente tumoral (TME), é a caracterização de interações entre lectinas e anticorpos com sequências específicas de glicanos. Para tal o objetivo principal desta tese é desenvolver ferramentas para estudar interações de glicanos descritas em cancro no TME e investigar a existência de assinaturas específicas de glicanos para CAF. Utilizar-se-á uma abordagem multidisciplinar que engloba os princípios da tecnologia de *microarrays* de glicanos e modelos de cultura celular 3D que mimetizam o TME.

Os objetivos específicos desenvolvidos nesta tese focam-se essencialmente nos seguintes tópicos:

1) Análise da especificidade de ligação da Siglec-15 a glicanos

Siglec-15 é um alvo de interesse pois esta lectina é expressa em macrófagos e células dendríticas. Sabe-se que esta lectina apresenta afinidade para o antigénio sialil-Tn (Neu5Ac α 2–6GalNAc α), associado ao tumor e que essa interação induz a produção de TGF- β por TAM, contribuindo para um fenótipo imunossupressor associado à progressão do tumor. Deste modo, Siglec-15 é considerada um potencial alvo terapêutico para novas terapias contra o cancro. Com base nisso foi realizada a análise da Siglec-15 num *microarray* de glicanos que apresenta diversas estruturas de glicanos de forma a: 1) identificar ligandos para a Siglec-15 e 2) estudar a especificidade da interação.

2) Desenvolvimento de *microarrays* de extratos proteicos de linhas celulares de cancro

Numa primeira fase aplicar-se-á o modelo de cultura celular desenvolvido pelo grupo *Advanced Cell Models Lab – Animal Cell Technology Unit*, iBET e ITQB-NOVA, no qual se combina a microencapsulação em alginato e a tecnologia de birreatores para mono e co-cultura celular. O trabalho vai ser focado nas linhas celulares de carcinoma mamário, MCF7 e BT474, que serão mantidas em cultura 3D. Aqui serão utilizados agregados do tumor e fibroblastos com vista a promover a recapitulação do TME. Os *microarrays* serão desenvolvidos a partir de extratos proteicos de células em monocultura e co-cultura (agregados tumorais e CAFs). Os *microarrays* produzidos vão ser utilizados para estudos de ligação com diversas lectinas associadas ao desenvolvimento de cancro, como por exemplo as siglecs, as galectinas, e recetor de manose.

Capítulo 2 – Estudo de Especificidade da Siglec-15

2. Estudo de Especificidade da Siglec-15

2.1 Introdução

Estudos *in vitro* reportaram a ligação da Siglec-15 humana a Neu5Ac α 2-6GalNAc α (antigénio STn) (Angata *et al.* 2007). O aminoácido Arginina 143 foi identificado como resíduo essencial para a ligação, devido à evidência de que o mutante Siglec-15(R143A) perdia a capacidade de ligação. No entanto, não se sabe se a Siglec-15 apresenta afinidade para outros glicanos sialilados. Um estudo recente que utilizou *microarrays* de células em que foi modulada a glicosilação, identificou um glicano específico, com alta afinidade para Siglec-15 (exibiu uma modificação não natural do NeuAc no Carbono 5) (Briard *et al.* 2018). No entanto, este ligando não foi isolado ou caracterizado e como tal, a sua sequência é desconhecida.

Neste trabalho, pretendeu-se identificar se a Siglec-15 liga a outro tipo de glicanos e validar a especificidade de Siglec-15 humana utilizando *microarrays* de glicanos que apresentam diversidade estrutural. Para o estudo foram analisadas duas proteínas Siglec-15 *wild-type* de fontes diferentes, o mutante da Siglec-15(R143A) e o anticorpo anti-STn 3F1.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Construção de *microarrays* de glicanos

Para a construção dos *microarrays* de glicanos foi utilizado *arrayer* robótico no qual a impressão ocorreu por não contacto em *slides* de vidro constituídos por 16 blocos de nitrocelulose (FAST®, Whatman) (Figura 2.1), formando *spots* com aproximadamente 150 μ m de diâmetro. As vantagens deste *arrayer* passam pela formação de *spots* com diâmetro menor comparativamente aos impressores de forma manual (Capítulo 3), e permite imprimir 100 *slides* em simultâneo, garantindo a sua uniformidade.

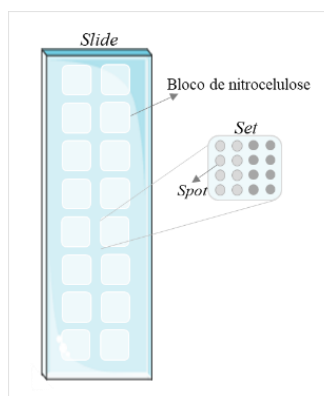


Figura 2.1 - Representação esquemática do *slide* utilizado no ensaio da Siglec-15. Exemplo de *slide* constituídos 16 blocos de nitrocelulose com a respetiva identificação de *set* e *spot*

Neste método, oligossacáridos de fonte natural e sintética foram imobilizados na matriz sólida de nitrocelulose com recurso ao *robot* e seguidamente foi realizado o ensaio de ligação com proteínas e anticorpos de interesse (Figura 2.2). Após obtenção de resultados e por análise de gráficos, tabelas e matrizes foi possível caracterizar alvos de interesse e depositar essas informações em base de dados acessível para posterior consulta.

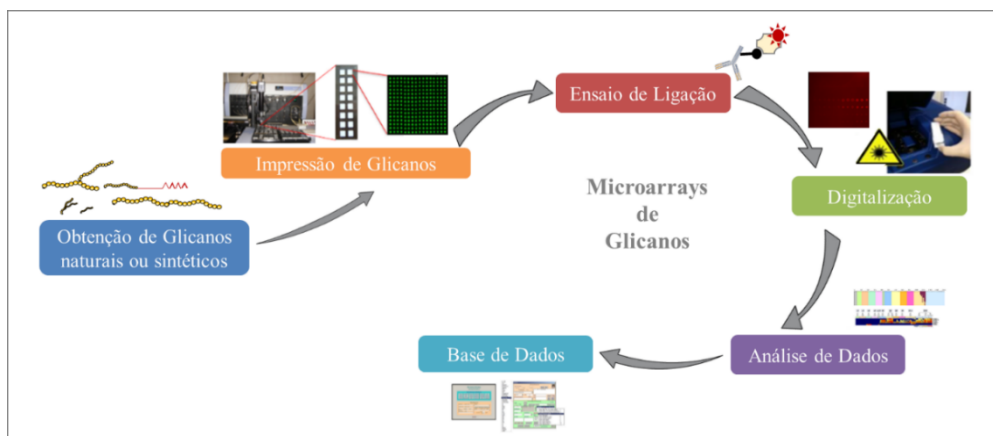


Figura 2.2 - Esquema de ensaio com *microarrays* de glicanos. Neste método os glicanos são obtidos de fonte natural ou sintetizados e imobilizados na matriz sólida de nitrocelulose. É realizado o ensaio de ligação entre os alvos e glicanos imobilizados e as características de interações são conhecidas por intermédio da interpretação de gráficos, tabelas e matrizes. Todos estes resultados são depois introduzidos em base de dados criadas para o efeito. Adaptado de Palma *et al.* 2014

Os *microarrays* de glicanos utilizados neste estudo, foram compostos por uma diversidade de neo-glicolípidos (NGLs), em que glicanos com sequência definida são derivatizados a um lípido, permitindo a adsorção em superfícies de nitrocelulose através de uma interação não covalente (Palma *et al.*, 2014). Este *microarray set* apresenta estruturas tais como *N*-glicanos, *O*-glicanos (Core 1, 2, 3 e 4), e glicanos extendidos sialilados (Stanley & Cummings, 2009) relevantes para o estudo da especificidade Siglec-15 (Figura 2.3 e matriz Anexo III).

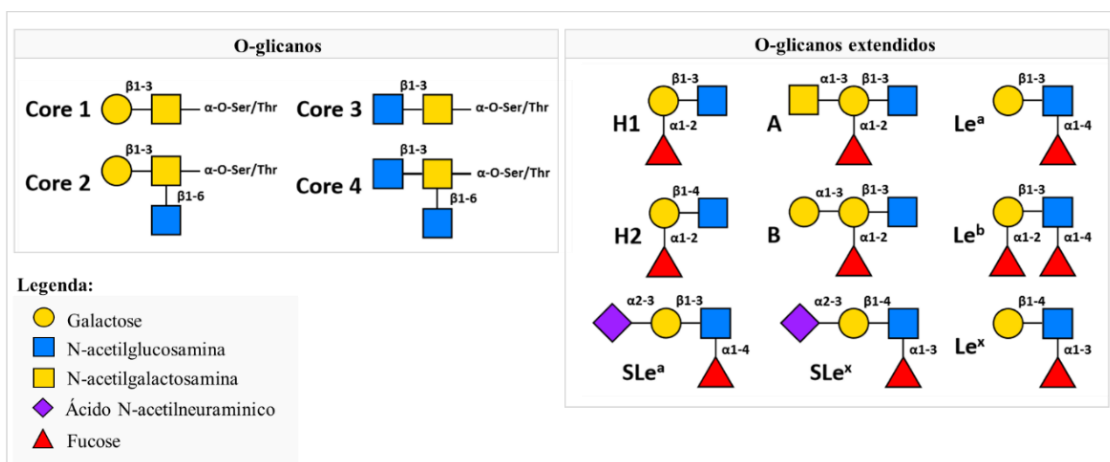


Figura 2.3 - Estruturas presentes nas mucinas. Alguns destes epítomos encontram-se reunidos no *microarray set* utilizado para o estudo de especificidade de Siglec-15 (Anexo III). Adaptado de Stanley & Cummings, 2009

A imobilização de glicanos foi realizada *slides* de vidro (FAST™) constituídos por 2 colunas cada uma com 8 blocos, num total de 16 blocos de nitrocelulose, sendo que na coluna A e B estavam imobilizados NGLs com sequências de glicanos diferentes de forma a serem analisados em paralelo (Figura 2.4).

À solução de impressão foi adicionado o fluoróforo Cyanine 3 (Cy3), que funcionou como marcador de controlo da qualidade da impressão e permitiu dessa forma a visualização e localização dos *spots* impressos nos blocos antes do ensaio de ligação, por meio da digitalização dos *slides*. Esta solução foi de seguida transferida para microplaca *source plate* por forma a estar acessível ao *robot*, tendo em conta que o esquema de disposição das amostras foi previamente planeado. Cada ligando foi impresso a concentrações de 2 e 5 fmol cada uma em duplicados, sendo que o *arrayer* robotizado (Piezorray, Perkin Elmer, Sear Green, UK), depositou cerca de 330 pI por *spot*. Esta parte do trabalho foi realizado pela minha orientadora, Dr. Angelina Palma, em colaboração com o grupo da Professora *Ten Feizi*, no laboratório de *Glycosciences* no *Imperial College* em Londres.

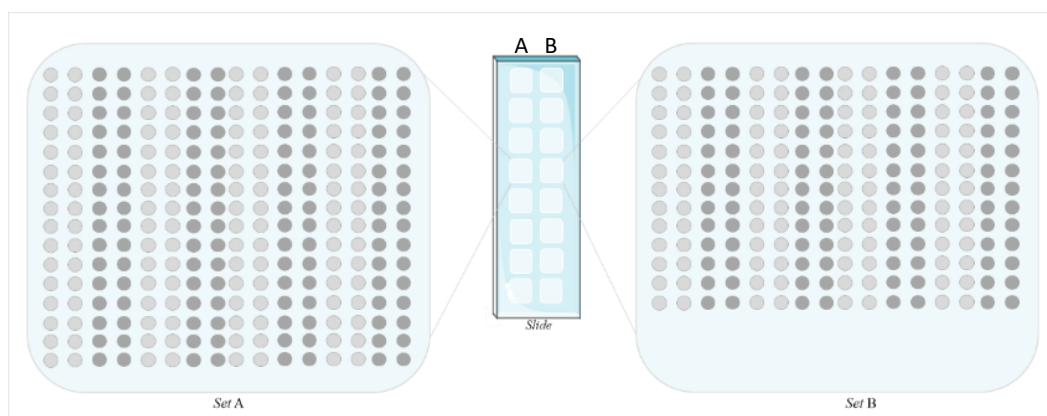


Figura 2.4 - Representação esquemática de *slide* constituído por 16 blocos de nitrocelulose. Identificação dos locais de impressão de cada um dos respetivos *sets*

2.2.2 Ensaio de ligação

Toda a informação relativa a proteínas testadas e controlos encontra-se na tabela 1.1 apresentada de seguida. As proteínas Siglec-15 *wild-type* e o mutante foram preparadas como proteínas quiméricas, em que o domínio de ligação a hidratos de carbono (do inglês, *carbohydrate-recognition domain*, CRD) foi ligado ao domínio Fc da IgG humana (Siglec-15-Fc). Foram testadas 2 condições: sem e com pré-complexo, em 2 tampões distintos. Este pré-complexo, permite otimizar os tempos de espera e consiste na elaboração do complexo lectina-anticorpo secundário. De seguida, o pré-complexo é adicionado ao *slide* e, caso haja afinidade da lectina a testar para os glicanos imobilizados, é formado o complexo glicano-lectina-anticorpo secundário. A informação relativa aos ensaios encontra-se no Anexo I e a descrição pormenorizada de ensaio de ligação para 16 blocos de nitrocelulose está em Anexo II.

Inicialmente realizou-se a digitalização do *slide* para a visualização do Cy3 ($\lambda_{\text{excitação}} = 532$ nm) com recurso ao equipamento de digitalização, *GenePix® 4300A (Molecular Devices)*. Seguidamente, procedeu-se à centrifugação de ambas as lectinas (14 x g, 4°C durante 2 minutos). Na condição sem pré-complexo, os blocos de nitrocelulose foram humedecidos cada um com H₂O Milli-Q (150 µL) seguindo-se a adição da solução de bloqueio/diluyente (150 µL), sendo que cada bloco foi bloqueado com a respetiva solução, e ambos foram incubados durante 60 minutos.

As soluções de bloqueio utilizadas foram 0.02% Caseína, 1% albumina de soro bovino (BSA) em tampão de fosfato salino (PBS): elaborada a partir do *stock* de 1% Caseína (*Casein in TBS 37583*, lote NL174641, *Thermo Scientific*) e BSA de *stock* a 30 % (*Albumin solution from bovine serum A8577*, lote 081M7013, *Sigma-Aldrich*). A solução 2% BSA em PBS: partiu do mesmo *stock* de BSA e o PBS utilizado em ambas as soluções e apresentou a seguinte constituição, 0.15M NaCl (*Sodium Chloride for analysis 131659.1211*, lote 0001013841, *PanReac AppliChem ITW Reagents*), 10mM PBS em H₂O Milli-Q.

Enquanto os blocos de matriz sólida estavam a incubar, iniciou-se o ensaio com pré-complexo. Começou-se por preparar h-Siglec-15-Fc WT, h-Siglec-15-Fc R143A e h-Siglec-15-R&D ambas a 2 µg/mL cada uma com anticorpo anti-IgG humano também a 2 µg/mL e os microtubos foram incubados em gelo durante 60 minutos. Note-se que o tampão de diluição das Siglecs e anticorpo foi 2% BSA em PBS. De seguida, as soluções de bloqueio foram retiradas individualmente e os blocos lavados 4 vezes com PBS, solução de lavagem (150 µL). De acordo com o ensaio, foram adicionadas as Lectinas/anticorpo primário a testar (100 µL) aos blocos de cima (Figura 2.5 a) e incubadas durante 1.30h. Aos blocos de baixo (Figura 2.5 b) adicionaram-se os pré-complexos e incubou-se 2.00h. Após terminar o tempo de incubação de (a) os blocos foram lavados 4 vezes com solução de lavagem (150 µL) e os Anticorpos Secundários (100 µL) foram adicionados e incubados 60 minutos. Depois de terminarem ambos os tempos de incubação, todos

os blocos foram lavados 4 vezes com solução de lavagem e foi adicionada Alexa-Fluor-647 conjugada com streptavidina (*Streptavidin, AlexaFluor®647 conjugate* S21374, lote 1705889, *Life Technologies*), o Sistema de Detecção, (100 μL) e incubado 45 minutos. Posto isto, lavaram-se os blocos 4 vezes com solução de lavagem (150 μL), retiram-se dos separadores de blocos, lavou-se o *slide* em H_2O Milli-Q e secou-se na centrifuga de *slides* (VWR, Galaxy MiniArray) durante aproximadamente 3 minutos.

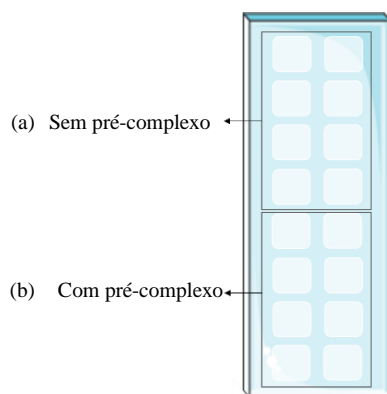


Figura 2.5 - Slide utilizado no ensaio de Siglec-15. Representação do local onde se incubaram as condições sem e com pré-complexo

Após tempo de espera de 10 minutos, seguiram-se as digitalizações Alexa-Fluor-647 ($\lambda_{\text{excitação}} = 635 \text{ nm}$) do *slide* a diferentes intensidades de *laser*, utilizando GenePix® 4300A microarray.

De realçar que o *slide* foi reservado à temperatura ambiente e protegido de exposição direta da luz ao longo de todas as incubações no decurso do ensaio.

Tabela 1.1 - Lista de lectinas e anticorpos utilizados no ensaio Siglec-15. Identificação de lectinas e anticorpos bem como as concentrações: *stock* e utilizada nos ensaios.

Lectinas / Anticorpos	Origem	Concentração <i>stock</i>	Concentração testada
Lectinas			
h-Siglec-15-Fc R&D	Humana (obtida comercialmente da R&D, <i>systems</i> , 9227-SL)	200 µg/mL	2 µg/mL 5 µg/mL
h-Siglec-15-Fc WT	Humana (Colaboração – Grupo Professor Paul Crocker, Universidade de Aberdeen)	740 µg/mL	2 µg/mL 5 µg/mL
h-Siglec-15-Fc R143A	Humana (Colaboração – Grupo Professor Paul Crocker, Universidade de Aberdeen)	230 µg/mL	2 µg/mL
Anticorpo Primário			
3F1 anti-STn	Ratinho (obtido comercialmente da SBH Sciences, 010812)	640 µg/mL	2,56 µg/mL 12,8 µg/mL
Anticorpos secundários biotinilados			
anti-IgG	Humano (Vector Lab, BA-3000, Y0418)	1500 µg/mL	2 µg/mL 3 µg/mL
anti-IgG	Ratinho (Sigma-Aldrich, B7264, SLBK5415V)	600 µg/mL	2 µg/mL

2.2.3 Quantificação e introdução na Base de Dados

Os programas associados ao equipamento de digitalização de fluorescência de *microarrays*, tais como o programa *GenePixPro7* da *Molecular Devices* permitiram obter, analisar e quantificar as imagens obtidas. Antes de realizar cada um dos *scans* definiram-se parâmetros como: comprimento de onda adequado (nm) e os respectivos filtros de emissão (verde ou vermelho); o ganho, dispositivo que converte a quantidade de luz que atinge o detetor em valor numérico (*photomultiplier tube*, PMT) e a intensidade de *laser* (%). Antes de começar o ensaio de ligação, obteve-se a digitalização com fluoróforo Cy3 (532nm) para visualizar e localizar os *spots*, na nitrocelulose, onde cada amostra/controlo foi impresso, como referido anteriormente. A digitalização Alexa-Fluor-647 (635 nm) realizou-se após o ensaio para determinar ligações entre os glicanos impressos na matriz de nitrocelulose e os alvos utilizados no ensaio. De notar que, em todas as digitalizações foram utilizadas diferentes intensidades de *laser*, de acordo com a saturação dos pontos. Ambos os *scans* foram essenciais para os passos seguintes: quantificação da ligação, processamento e análise de dados.

Após aquisição das imagens, os passos de processamento e quantificação foram divididos em três etapas: 1) Criação de uma matriz/grelha que englobou todos os *spots* impressos no bloco de nitrocelulose; 2) Quantificação das intensidades de fluorescência de cada *spot*; 3) Processamento e apresentação de resultados em forma de gráficos, tabelas ou matrizes.

O primeiro passo consistiu no ajuste de uma grelha a cada um dos *spots* (Figura 2.6). Para tal, foi utilizada a imagem da digitalização Cy3 em formato (.tiff) à qual se ajustou a grelha/matriz que serviu como referência de ajuste à grelha da imagem Alexa-Fluor-647 (.tiff). Destes ajustes, surgiram os ficheiros Cy3 (.gps) e Alexa-Fluor-647 (.gps). Após se dar entrada de ambos os ficheiros .tiff e .gps dos respetivos *slides*, no mesmo programa, surgiu o arquivo (.gpr) onde consta toda a informação adquirida, inclusive a intensidade de fluorescência associada a cada *spot*, calculada tendo em conta a região do mesmo (identificada como círculo), a região fora do *spot*, *background*, (identificada como quadrado) e a sua área (Figura 2.6). O programa fez a quantificação subtraindo a área da zona delimitada entre o círculo (identifica o local de impressão) e o quadrado, à área do círculo, de modo a obter uma quantificação o mais exata possível.

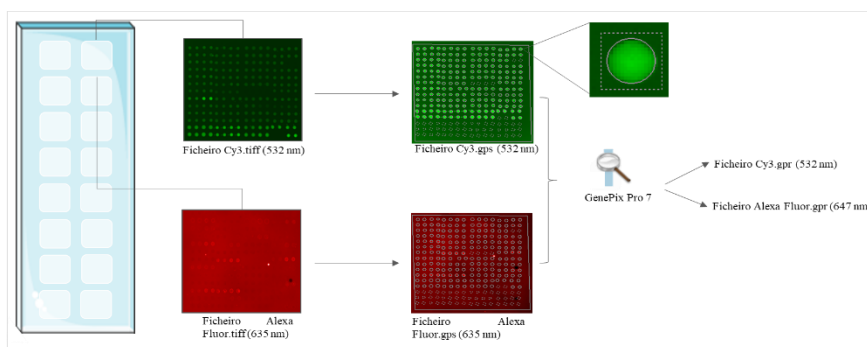


Figura 2.6 - Ficheiros obtidos antes e após o ensaio. Representação esquemática da visualização dos *spots* impressos no bloco de nitrocelulose e a construção da respetiva grelha para cada digitalização de cada *slide* utilizando GenePixPro7 da *Molecular Devices*

Com o aumento do número de ensaios realizados por *slide*, a complexidade dos resultados também aumenta, dificultando deste modo a sua organização e apresentação. Em ensaios como o referido neste capítulo, onde o número de experiências é elevado e é necessário consultar informação de ensaios anteriores, esta tarefa apresentava elevada complexidade. Para tal, surgiu a criação de programas associados a base de dados de *microarrays* (Palma *et al.* 2014), desenvolvidos no grupo da Professora *Ten Feizi* (*Imperial College*, Londres) onde é possível realizar a análise dos dados de forma semi-automatizada permitindo a introdução de informações relativas às experiências como método utilizado, alvos testados, características das proteínas/anticorpos, condições experimentais, o que estava imobilizado nos *slides* e resultados dos ensaios para posterior consulta. Este é um programa interativo composto por duas partes (Figura 2.7) : 1) ‘*PiezoRay*’, um componente de entrada de todos os dados experimentais, tais como o arquivo .gpr, onde constam os dados de intensidades de fluorescência; 2) ‘*DisplayArray*’, um componente de saída que permite a recuperação, análise e apresentação de dados na forma de gráficos, tabelas e matrizes. Estas duas partes comunicam com a central de dados de *microarrays*, onde estão armazenadas todas as informações relativas a ensaios já realizados e se encontram acessíveis para consulta aos utilizadores da mesma.

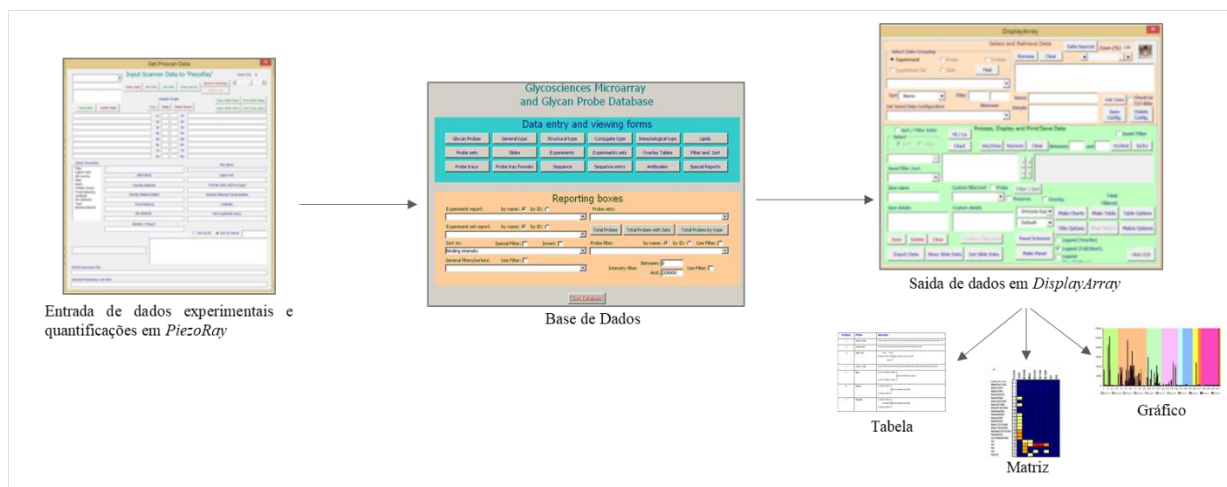


Figura 2.7 - Esquema representativo da utilização da base de dados. Programa interativo, composto pelos 2 componentes, o *PiezoRay* e *DisplayArray*, com vista ao processamento e representações de dados na forma de gráficos, tabelas e matrizes. Adaptado de Palma *et al.* 2014

2.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Figura 2.8 onde são apresentados os gráficos de ligação, na Tabela 2 onde estão representadas as sequências dos glicanos para os quais ocorreu maior ligação e na matriz que é apresentada em Anexo III.

Foi detetado um perfil de ligação idêntico para as duas Siglec-15-Fc *wild-type* o que valida os resultados de especificidade de ligação para a Siglec-15. A ligação da Siglec-15-Fc *wild-type* foi observada ao antígeno STn, *O*-glicano ligado a Ser ou Thr (sequências 31 e 32, respetivamente). A Siglec-15 também se ligou ao *O*-glicano estendido α 2-3, α 2-6-disialil core 1, ligado a Ser ou Thr (sequências 39 e 40). Embora a ligação da Siglec-15-Fc pudesse ser detetada no antígeno STn e a sequências de *O*-glicanos relacionadas, observou-se ligação predominante desta a outros glicanos sialilados com sequência lacto-*N*-tetraose ou de poli-*N*-acetilactosamina, incluindo ao α 2-6-sialil LSTb e α 2-3, α 2-6-disialil DSLNT e DSMFLNH (sequências 11-13). A ligação de Siglec-15 aos diversos ligandos foi inibida quase por completo no mutante R143A, o que confirma que o aminoácido Arginina é essencial para que ocorra ligação.

Os resultados de Siglec-15 contrastam com a ligação restrita observada no ensaio com o anticorpo 3F1-IgG para o antígeno STn. Observou-se uma ligeira preferência de ligação, por parte de Siglec-15 e do anticorpo anti-STn 3F1-IgG a pequenos *O*-glicanos ligados a Ser em comparação com Thr.

Adicionalmente a estes resultados, foi também detetada ligação em 2 sequências não sialiladas que requerem alguma atenção: *O*-glicano, com epítipo *core* 3 ligado a Thr (sequência 44) e os tetrassacáridos derivados de heparina (sequências 54 e 55). De notar que, a ligação de Siglec-15-Fc a estas sequências foi observada nas diferentes condições de ensaio testadas.

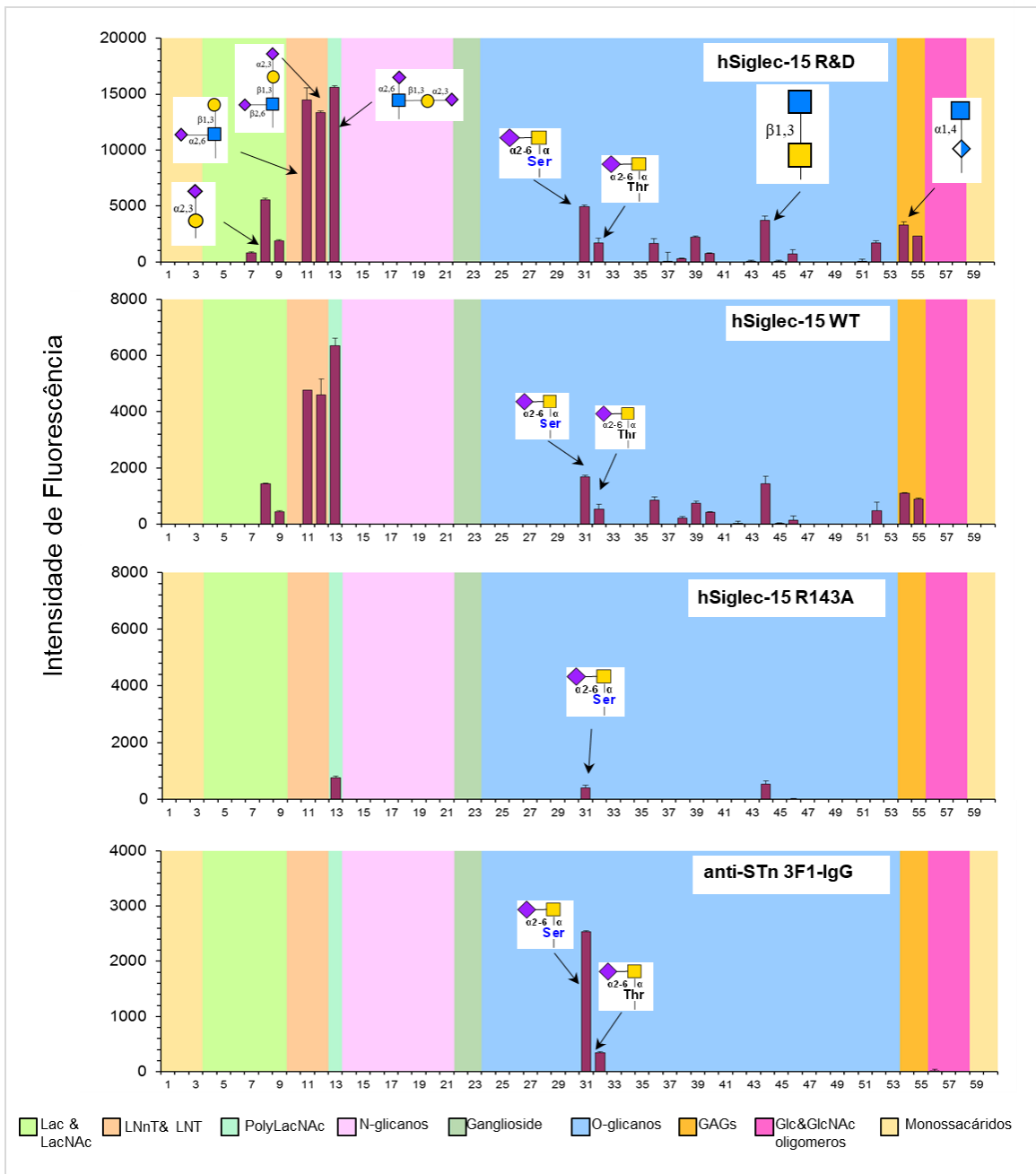


Figura 2.8 - Análise de especificidade de quimeras hSiglec-15-Fc humanas e anti-STn 3F1. Os resultados do ensaio de ligação foram filtrados sendo que os apresentados correspondem apenas a DA-NGLs, glicaminoácidos derivados naturalmente e conjugados a um lípido. As quimeras Siglec-15-Fc foram analisadas com pré-complexo na proporção 1:1 em concentração final de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. O anticorpo anti-STn 3F1-IgG foi analisado com diluição 1:50 (13 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nos gráficos encontra-se representada a intensidade de fluorescência correspondente a cada à ligação de cada alvo à sequência, sendo que esta se encontra impressa a 5 fmol. Os parâmetros de digitalização: 350 PMT e 90% de intensidade de *laser*. As sequências estão agrupadas de acordo com o tipo de glicano: baseadas em dissacáridos, lactose (Lac); baseadas em tetrassacáridos, lacto-N-tetraose (LNT) e lacto-N-neo-tetraose (LNnT); poli-N-acetillactosamina (PolyLacNAc); N-glicanos; ganglioside; O-glicanos; glicosaminoglicanos (GAGs); homo-oligómeros Glc e GlcNAc; monossacáridos. A sequência das sondas encontra-se em Anexo III.

Tabela 1.2 - Lista ordenada de sondas para as quais Siglec-15 apresentou especificidade. Identificação do nome e número da sonda correspondente no gráfico e a respetiva estrutura

Nome da sonda:	Número da sonda:	Representação:
3'SA-Lac-Gly-DA	8	
LSTb-Gly-DA	11	
DSLNT-Gly-DA	12	
DSMFLNH-Gly-DA	13	
STn-Ser-DA	31	
STn-Thr-DA	32	
Core 3-Thr-DA	44	
Hep-4-NAc-PhN-DA	54	

Glucose (Glc)	Ácido N-acetilglucosamínico (GlcNAc)	Ácido glucorónico (GlcA)
Galactose (Gal)	Ácido N-acetilgalactosamínico (GalNAc)	Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)
Fucose (Fuc)	Ser Serina	Thr Treonina

2.4 Conclusões

A utilização de *microarrays* de glicanos permitiu obter resultados importantes para o estudo de caracterização da lectina Siglec-15. O conjunto de sequências utilizado no ensaio provaram ser uma ferramenta eficaz e sensível, na qual estão reunidos epítomos para os quais Siglec-15 apresentou afinidade de ligação. Estas particularidades fizeram com que fosse possível a análise simultânea de hSiglec-15 R&D, hSiglec-15 WT, hSiglec-15 R143A e anti-STn 3F1-IgG bem como a respetiva comparação de resultados.

Dados provenientes dos ensaios demonstraram que, nos *microarrays* de glicanos, é possível verificar a ligação de Siglec-15 ao antígeno STn. Além disso, concluiu-se que Siglec-15 liga a outros oligossacáridos sialilados α 2-3 e α 2-6 com maior avidéz, além dos descritos pela literatura. A comparação entre a hSiglec-15 *wild-type* e o mutante revelou que a mutação afeta o perfil de ligação ás sequências ocorrendo perda quase total de ligação. Os resultados provenientes destes ensaios constituem um ponto de partida para perceber a especificidade e a preferência de Siglec-15 por α 2-3 / α 2-6.

Capítulo 3 – Construção e análise de *microarrays* com extratos proteicos de linhas celulares de cancro

3. Construção e análise de *microarrays* com extratos proteicos de linhas celulares de cancro

3.1 Introdução

Os *microarrays* de proteína de fase reversa (do inglês, *phase protein microarray*, RPPA) é uma técnica alto rendimento (Gyorgy *et al.* 2010), promissora como ferramenta para investigações ao nível de biomarcadores de doença (Sevecka *et al.* 2011). Estas plataformas foram testadas para imobilização de extratos proteicos provenientes de linhas celulares humanas, monocultura e co-cultura com fibroblastos, nomeadamente MCF7 (STn⁺) e BT474 (STn⁻), representativas de cancro de mama luminal. A linha celular MCF7, subtipo luminal A, expressa recetor de estrogénio (do inglês, *estrogen receptor*, ER) e da progesterona (do inglês, *progesterone receptor*, PR) enquanto que linha celular BT474, sub-tipo luminal B, além desses expressa também o recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*, HER 2). A quantidade de recetores expressos está relacionada com a agressividade de cada subtipo, como tal o seu estudo é importante. (Nowsheen *et al.* 2012; Subik *et al.* 2010)

Para que essa descodificação fosse alcançada foi necessária a otimização das condições de obtenção dos extratos proteicos, a imobilização dos mesmos e condições do ensaio de ligação com vista a averiguar interações entre os glicanos expressos nas proteínas imobilizadas e lectinas/anticorpos adicionados no ensaio.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Obtenção de extratos de proteína de linhas celulares

O processo de obtenção de extratos de proteína provenientes das diferentes linhas celulares é constituído pelos seguintes passos: 1) crescimento celular; 2) agregação celular; 3) encapsulação celular; 4) extração de proteína e 5) quantificações de proteína (Figura 3.1).

Para o **crescimento celular**, as culturas celulares mantêm-se aderidas em *T-flasks* com os respetivos meios de cultura: para MCF7 o meio Dulbecco MEM (DMEM) (41965-039, Gibco) e para BT474 o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (11835-063, Gibco). O crescimento celular é assegurado em condições controladas de pressão e temperatura até se obterem aproximadamente 0.2×10^6 células/mL, células suficientes para o inóculo. Após esse período, o meio foi retirado por aspiração e estas foram lavadas com uma solução de tampão fosfato salino (PBS) (14040-091, Gibco) seguindo-se a adição de Tripsina (25200-072, Gibco) (ambos pré-aquecidos 3 minutos a 37°C visto esta ser a temperatura ótima de ação da última, quebrando as ligações entre culturas celulares e superfície de contacto). Ao *T-flask*, procedeu-se à adição de meio de cultura, para que o Soro Fetal Bovino (FBS) (10500-064, Gibco) presente neste iniciasse a inibição da reação enzimática de danificação da membrana celular causada pela ação da Tripsina.

De seguida transferiu-se tudo para *falcon* e recolheu-se uma amostra homogénea na qual se realizou a contagem celular recorrendo ao método do hematocitómetro, através do qual se calculou o volume de amostra a retirar do *falcon* e a introduzir no *spinner*, sistema onde se introduziram as linhas celulares e permaneceram em cultura. O *falcon* sofreu centrifugação, retirou-se o meio e adicionou-se novo meio de cultura para se pudessem filtrar todas as células, garantindo desse modo que não havia agregados no momento da inoculação. Após inoculação do *spinner*, este foi introduzido na estufa, a 37°C e em agitação, durante 25.00h de modo a ocorrer **agregação celular**.

Seguiu-se a fase de **encapsulação celular** utilizando um sistema presente no ITQB (Malpique *et al.* 2010). Foi adicionado alginato 1.1% (UP MVG NovaMatrix, Pronova Biomedical) aos agregados celulares que foram introduzidos na seringa injetora do equipamento e caíram dentro de uma placa de *petri* que continha BaCl₂, em agitação, o que permitiu que o alginato reticulasse e a encapsulação da linha celular ocorresse. As esferas em conjunto com meio de crescimento foram transferidas para *erlenmeyers* posteriormente introduzidos na estufa a 37°C, durante 7 dias.

Após esse período, seguiram-se protocolos estabelecidos no laboratório com vista à **extração de proteína**, nos quais se adicionou a solução de tampão de lise celular constituída por: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, HCl; 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1x inibidores de proteases e H₂O Milli-Q, responsável por romper a membrana celular. Seguiram-se passos de centrifugação e sonicação de forma a extrair as proteínas e obter-se o sobrenadante com as proteínas solúveis. De seguida procedeu-se à precipitação da proteína em 80% etanol a -20°C durante a noite, aproximadamente.

Seguidamente, evaporou-se o etanol e ressuspendeu-se o sedimento nas soluções tampão desejadas: 1) tampão SDS - 62.5 mM Tris-HCl, 5% (w/v) detergente aniónico dodecil sulfato de sódio (SDS) em H₂O Milli-Q ou 2) tampão Rapigest – 0.3 % (186001861, Waters Portugal) em 50mM NH₄CO₃ (09830, Sigma-Aldrich). SDS e Rapigest, são compostos orgânicos com propriedades surfactantes. Por fim, realizou-se a **quantificação total de proteína** utilizando o método colorimétrico do ácido bicinonínico com recurso a *kit* de ensaio microBCA. Determinaram-se deste modo as concentrações relativas a cada um dos extratos celulares obtidos. Estes foram armazenados a -80°C para posterior análise nos *microarrays*.

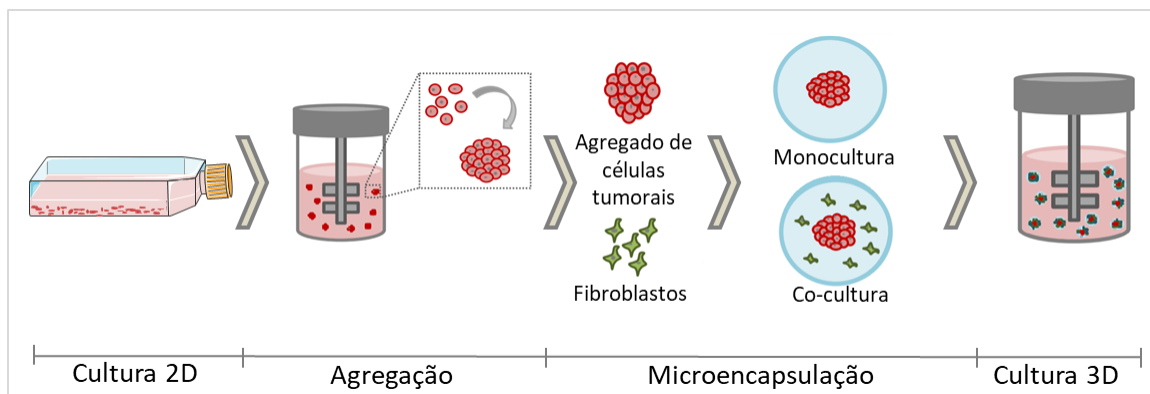


Figura 3.1 - Esquema resumo do processo de obtenção de extratos proteicos. Etapas percorridas antes da extração e quantificações de proteína em mono e co-cultura

3.2.2 Ensaio de ligação em *microarrays*

3.2.2.1 Preparação das amostras para a imobilização na matriz sólida

Numa fase inicial de preparação das amostras, descongelaram-se os extratos celulares, MCF7 e BT474 armazenados a -80°C e centrifugaram-se ($14,000 \times g$, 4°C durante 3 minutos). De seguida, realizaram-se 3 diluições (1:2, 1:5 e 1:10) no respetivo tampão de acordo com as concentrações dos respetivos extratos. Os extratos celulares utilizados foram MCF7 e BT474 monocultura/co-cultura, em tampão SDS ou tampão rapigest. Note-se que as concentrações e o detergente/tampão utilizado para as diluições estavam dependentes do objetivo do ensaio em causa. Para a preparação de rapigest (Waters Portugal), diluiu-se uma solução *stock* de NH_4CO_3 a 100mM para 50mM. Para obter 0.3% Rapigest, o composto foi ressuscitado $333,33\mu\text{L}$ de solução NH_4CO_3 a 50mM.

Em relação aos controlos, foram preparadas mucinas e proteínas. Preparou-se um *stock* de mucina de estômago de porco (PSM) (*porcine stomach mucin*, M2378, lote SLB;5238V, Sigma) a 1 mg/mL em H_2O Milli-Q, a partir do qual se obtiveram as concentrações 0.1mg/mL e 0.5 mg/mL, no respetivo tampão. Do *stock* de mucina submaxilar de bovino (BSM) (*bovin submaxillary mucin*, Merk Millipore) já existente, a 2 mg/mL em H_2O Milli-Q, obtiveram-se as mesmas concentrações desejadas, 0.1mg/mL e 0.5mg/mL. Relativamente às glicoproteínas controlo: fator de crescimento do tumor (*tumour growth*, GW112, B1005, Vector) e ceroplasmina humana (hCP) (*human ceruloplasmin*) partiu-se de soluções *stock* a 5mg/ml para preparar as concentrações de 0.5 mg/mL e 1 mg/mL, nos respetivos tampões, solução salina de Tris (TBS) (30 mM Tris, pH 8.0 e 100mM NaCl) e solução salina de actínio de sódio (NABS) (100mM NaAc, pH 8.8 e 100mM NaCl).

No teste de concentração de extratos por evaporação na *SpeedVac* (UNIVAPO 150ECH), após o período de centrifugação ($14 \times g$, 4°C , 3 minutos) (Figura 3.2), prepararam-se 6 microtubos

com 40µL, ambos diluídos em H₂O Milli-Q, com a seguinte constituição: tubo BT474 monocultura 0.15% rapigest, BT474 monocultura 0.3% Rapigest, BT474 co-cultura 0.15% rapigest, BT474 co-cultura 0.3% rapigest, MCF7 monocultura 0.1% rapigest e MCF7 co-cultura 0.1% rapigest. A concentração de amostra para o dobro da concentração inicial, foi realizada por evaporação na durante 1h *SpeedVac*.

As amostras para imobilização no *microarray* foram preparadas num volume final de 20 µL em que foi adicionado fluoróforo Cyanine 3 (Mono NHS Ester PA 13101, lote 9469681, *GE Healthcare*) a 0.2 µg/mL (solução *stock* a 5µg/mL). De seguida, realizou-se uma breve agitação e centrifugação para garantir a homogeneização completa da amostra. De seguida as amostras foram transferidas para uma microplaca de 384 poços (*source plate*) numa ordem previamente definida.

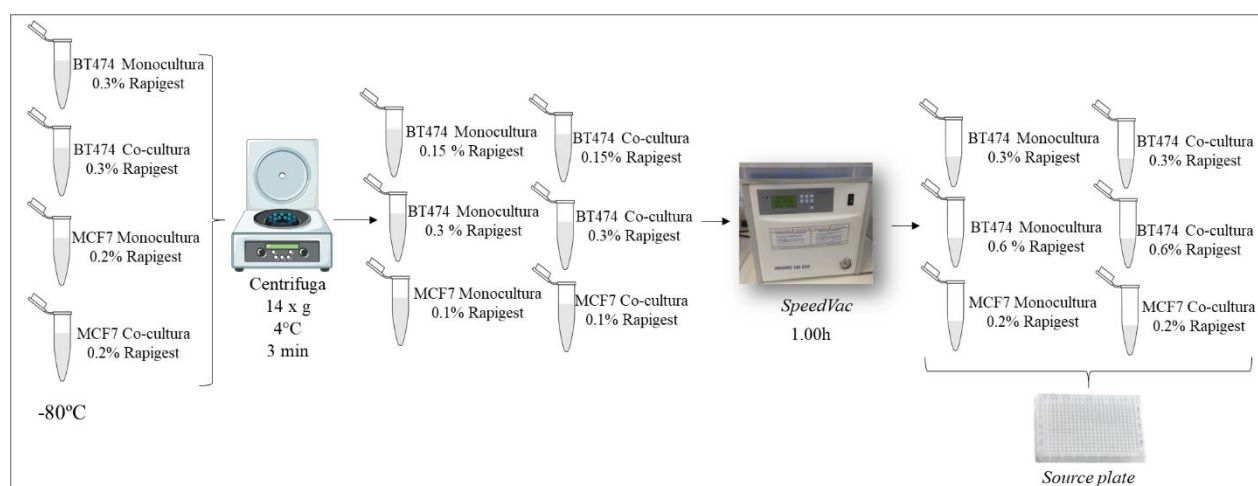


Figura 3.2 - Esquema do ensaio de concentração de extratos proteicos por evaporação. Preparação das amostras para o ensaio de concentração com recurso a *SpeedVac* e respetivas amostras após concentração

3.2.2.2 Impressão das amostras

Para a construção dos *microarrays* as amostras de proteína (extratos celulares e proteínas controlo) foram imobilizados a diferentes concentrações de forma não-covalente em *slides* de vidro (FAST™, Sartorius stedim) com 1 ou 2 blocos de nitrocelulose, utilizando um *arrayer* manual (MicroCaster™ System da Whatman®, Schleider&Schuell) (Figura 3.3). Para esse efeito, foi previamente desenhado um esquema de impressão onde se definiu a ordem de impressão das proteínas no *slide*, por coluna e linha (*microarray set*). Com base nisso, foi utilizada uma *source plate* onde as proteínas foram introduzidas de acordo com uma matriz onde se definiram as várias posições das amostras e a distribuição dos *spots*.

No método de **impressão manual**, os 8 *pins* (2 filas cada uma composta por 4 *pins*), presentes no equipamento, foram mergulhados na *source plate* (Figura 3.3) e um volume compreendido entre 20 a 70 nL, aproximadamente, foi incorporado nas pontas graças ao perfil côncavo destas (este volume varia de acordo com o tampão e a viscosidade). A amostra ficou adsorvida até à sua deposição por contacto no suporte sólido. Aí, foram depositadas e formaram *spots* constituídos por aproximadamente 500-600 µm de diâmetro. A construção das diferentes colunas/linhas do *set* foi realizado com recurso a pequenos *pins* presentes no suporte (Figura 3.3). O deslocamento horizontal e vertical do *arrayer* foi feito num total de 8 e 12 posições intercaladas, respetivamente, permitindo realizar simultaneamente 8 impressões na matriz e a impressão de 2 *slides* em paralelo. A fácil implementação desta metodologia e o baixo custo, constituem vantagens associadas a este equipamento.

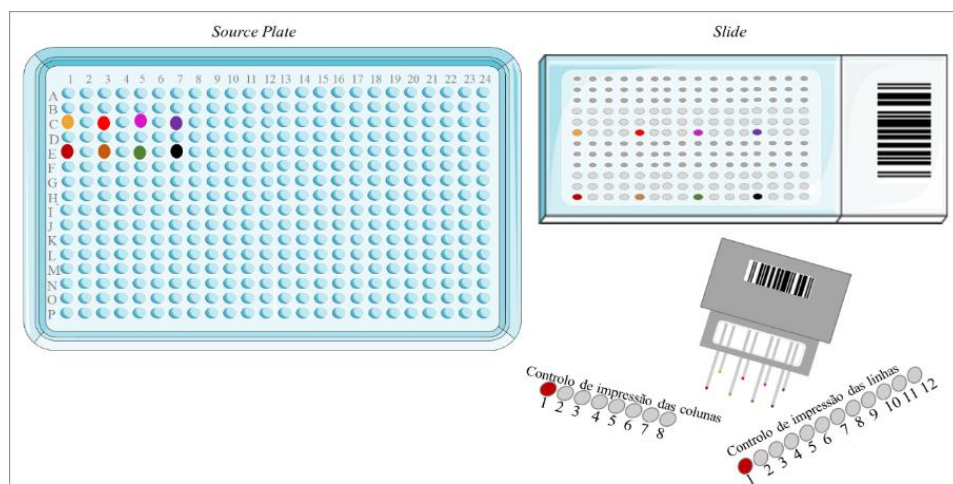


Figura 3.3 - Esquema do modo de impressão de slide com recurso a arrayer manual Planeamento de disposição das amostras na microplaca e os respetivos locais de imobilização no slide. Exemplo de impressão com recurso a *arrayer* manual em *slide* constituído apenas por um bloco de nitrocelulose

Este método de impressão foi utilizado para a construção e análise de *microarrays* com extratos proteicos de linhas celulares MCF7 e BT474 em mono e co-cultura seguindo-se o ensaio de ligação com lectinas e anticorpos de interesse (Figura 3.4).

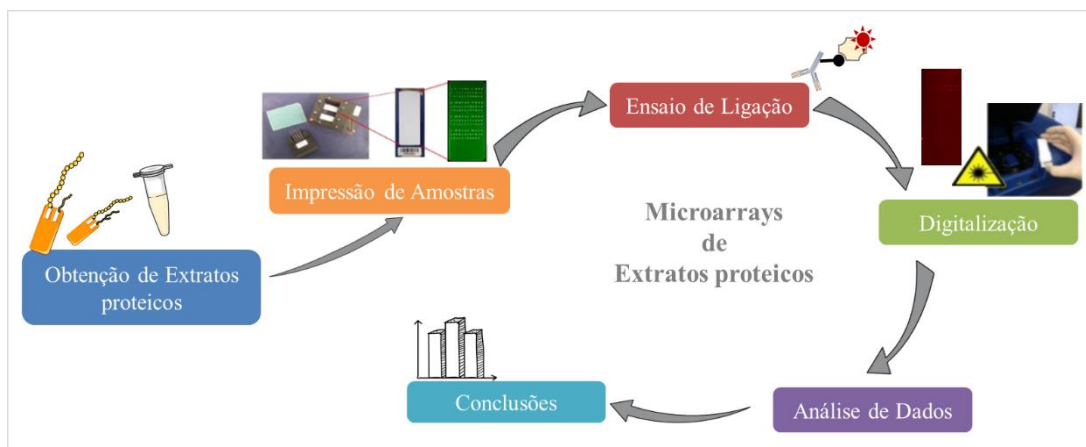


Figura 3.4 - Esquema de ensaio com *microarrays* de extratos proteicos. O método de impressão manual, com recurso a *arrayer* manual foi utilizado para imobilização de extratos proteicos na matriz sólida de nitrocelulose. Para tal, os extratos são obtidos de linhas celulares MCF7 e BT474 em mono e co-cultura, impressas em *slides* e de seguida é realizado o ensaio de ligação. Dados provenientes desse ensaio são analisados e convertidos em gráficos para melhor interpretação, descodificando deste modo interações entre glicanos expressos nas proteínas e anticorpos/lectinas utilizados no ensaio. Adaptado de Palma *et al.* 2014

Para impressão das amostras, começou-se por seguir o protocolo de limpeza dos *pins* do *arrayer* mergulhando-os em 5% lixívia (1x), H₂O Milli-Q (2x) e etanol (2x). Entre cada passo os *pins* foram secos ao ar e após mergulhados em etanol foram ainda sujeitos a fonte de calor para garantir que ficavam totalmente secos, de modo a não afetar a deposição de amostra no *slide*. Posto isto, iniciou-se o processo de impressão, mergulhando os *pins* na microplaca para estes incorporarem a amostra seguido da sua deposição no(s) bloco(s) do *slide* de modo a dispensá-la (Figura 3.5). Cada concentração de extrato celular/controlo foi impressa em triplicado, o que pressupõe que de 3 em 3 impressões, o protocolo de limpeza dos *pins* fosse aplicado. Após impressão de todos os *slides*, estes foram mantidos em ambiente seco controlado (temperatura ambiente) durante 24.00h. Desta forma foi obtido o *microarray set* constituído por proteínas provenientes dos extratos celulares (exemplo em Anexo IV). Relativamente à microplaca, esta foi selada, protegida da luz e armazenada a 4°C.

Depois de realizadas todas as impressões e para se poder armazenar o *arrayer* em segurança, seguiu-se um protocolo de limpeza mais específico. Os *pins* foram sujeitos a ultrassons com solução de lavagem no banho de ultrassons (PSELECT, ultrassons H-D) durante 5-10 minutos, mergulhados em solução de limpeza (2x), H₂O Milli-Q (3x) e isopropanol (2x) sendo que entre cada passo os *pins* foram secos de igual modo como acima referido.



Figura 3.5 - Processo de impressão de *slides* com recurso a *arrayer* manual. *Slide* constituídos por 2 blocos de nitrocelulose

3.2.2.3 Ensaio de Ligação

Baseia-se essencialmente em interações ocorridas entre o que está imobilizado no *slide* e os anticorpos/lectinas utilizados como alvos a testar (Figura 3.6). No caso de anticorpos primários foram testados o anti-SLe^X, anti-Le^X, anti-Le^Y ou anti-STn. Os anticorpos foram colocados em contacto com os glicanos imobilizados no *slide* a concentrações otimizadas e incubados para que ocorresse a ligação alvo-glicano. De seguida foi adicionado o anticorpo secundário, marcado com biotina. Promoveu-se assim, a formação do complexo glicano-anticorpo primário-anticorpo secundário biotilado. O facto de este ser biotilado fez com que o anticorpo fosse reconhecido pela proteína, streptavidina. A forte interação criada entre biotina e streptavidina tornou possível a deteção da interação glicanos imobilizado-anticorpos primários testados, por digitalização do *slide*. A streptavidina estava marcada com fluoróforo Alexa-Fluor-647 ($\lambda_{\text{excitação}}= 635 \text{ nm}$) para que fosse possível realizar a visualização e quantificação de resultados.

Em ensaios onde se testaram lectinas *Vicia Villosa* (VVL/VVA), *Sambucus Nigra* (SNA) e *Aglutinina Ulex Europaeus I* (UEA I), o ensaio sofreu algumas alterações pois as respetivas lectinas já são biotiladas, prescindindo deste modo da utilização de anticorpo secundário mas não de streptavidina. É apenas formado o complexo glicano-lectina biotilada-streptavidina, detetável por digitalização (Figura 3.6).

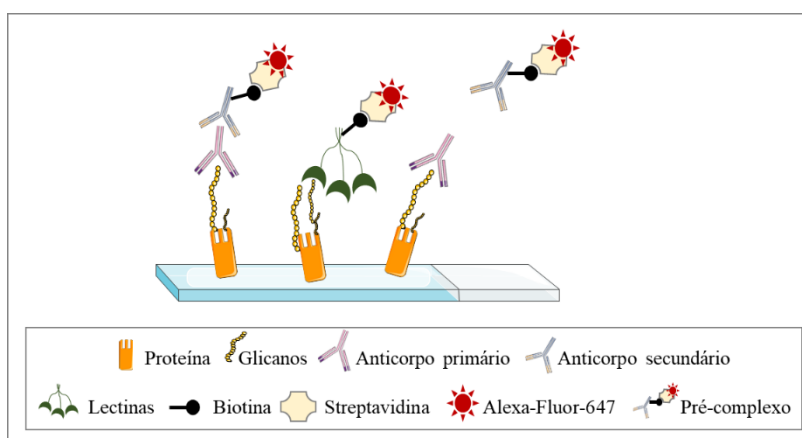


Figura 3.6 - Esquema de ensaio de ligação com anticorpos e lectinas. Representação da ordem pela qual são formados os complexos durante o ensaio de ligação

Com vista a garantir o controlo de qualidade e validação do *microarray*, anticorpos e lectinas com diferentes especificidades de ligação a glicanos (informação relativa à especificidade encontra-se descrita nas Tabelas 2.1 e 2.2) foram analisados em paralelo.

Antes do ensaio realizaram-se 2 digitalizações por bloco de nitrocelulose utilizando equipamento de digitalização GenePix® 4300A (Molecular Devices). A digitalização Cy3 ($\lambda_{\text{excitação}}= 532 \text{ nm}$), tal como no ensaio do capítulo anterior, e Alexa-Fluor-647 ($\lambda_{\text{excitação}} = 635 \text{ nm}$).

Após montagem de todo o esquema para realizar o ensaio (Figura 3.7), o bloco de nitrocelulose de cada *slide* foi humedecido com H₂O Milli-Q (1000 μL), seguindo-se o passo de bloqueio com solução de bloqueio/diluyente (1000 μL) apropriada, durante 60 minutos. Nos ensaios que envolveram lectinas as soluções de bloqueio foram as mesmas utilizada no ensaio de ligação do capítulo 2, tal como a solução de bloqueio dos anticorpos (2% BSA em PBS). Seguiu-se o passo de incubação com Anticorpo primário/Lectina (800 μL), previamente diluído na solução bloqueio. O passo seguinte foi a adição do Anticorpo Secundário (800 μL) e, de seguida, adicionou-se o Sistema de Detecção (1mL). Note-se que os passos de lavagem e tempos de incubação foram os mesmos que o ensaio de ligação apresentado no capítulo 2.

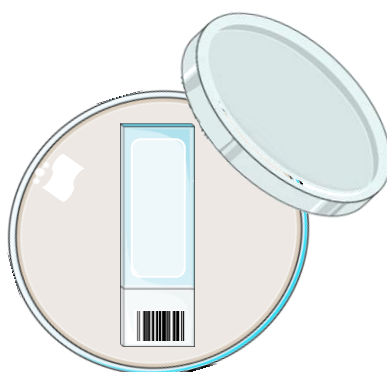


Figura 3.7 - Representação esquemática da forma como se realizou o ensaio. Utilização de caixa de *petri* forrada com *parafilm*, que promoveu a estabilidade dos *slides* no decurso do ensaio e papel humedecido com H₂O Milli-Q que proporcionou ambiente húmido, evitando desse modo a secagem da matriz de nitrocelulose

Para finalizar, realizaram-se as digitalizações Alexa-Fluor-647 ($\lambda_{\text{excitação}}= 635 \text{ nm}$) dos *slides* utilizando diferentes intensidades de *laser*, com recurso ao mesmo equipamento utilizado antes do ensaio de ligação (Figura 3.8). Importa referir que, por um lado, entre cada passo os *slides* foram incubados à temperatura ambiente, protegidos de exposição direta da luz e, por outro, o protocolo acima descrito refere-se a *slides* compostos por 1 bloco de nitrocelulose, no entanto, foram também utilizados *slides* com 2 blocos de nitrocelulose. Nesse caso o procedimento foi idêntico (Anexo V), mas os volumes utilizados foram metade dos acima referidos.

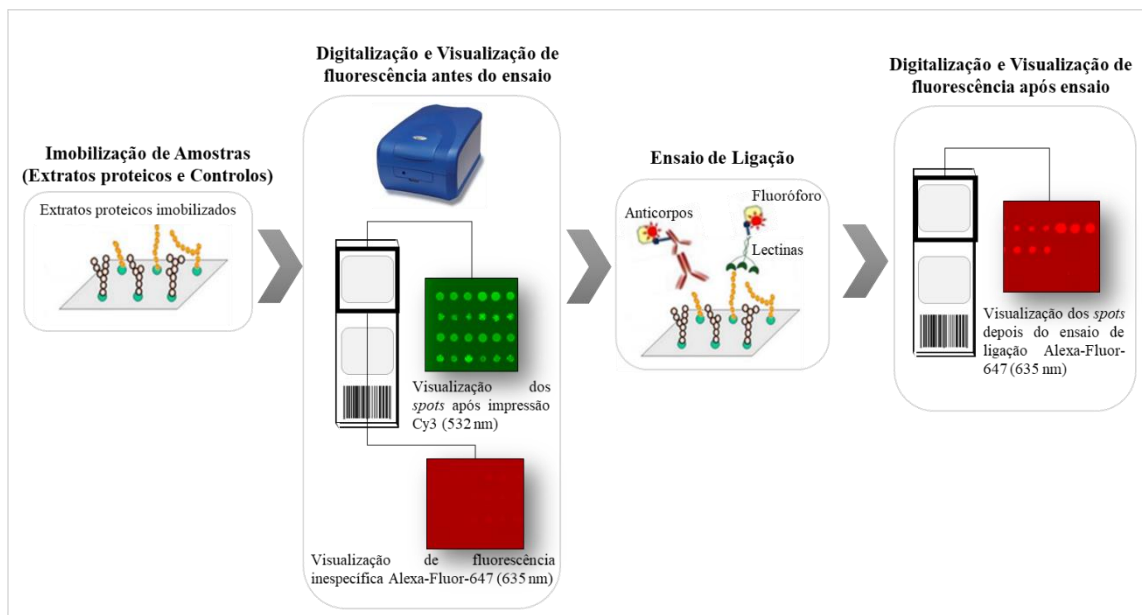


Figura 3.8 - Esquema resumo das etapas do ensaio de ligação. Utilização de lectinas/anticorpos no ensaio de ligação e os extratos proteicos imobilizadas em *slide* de vidro constituído por 2 blocos de nitrocelulose

Tabela 2.1 - Lista de anticorpos e lectinas. Identificação da respetiva especificidade, marca e concentrações (*stock* e testada)

Anticorpos/Lectinas	Especificidade	Marca	Concentração <i>stock</i>	Concentração testada	Referências
Anticorpos Primários					
anti-Le ^Y	Fuc α 2Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc	Mouse Monoclonal α TCS, Monoclonal antibody against BG-8 Lewis Y 317-01 Signet Laboratoires, SIG-3317	-	1:500	(Krug <i>et al.</i> 2007)
anti-Le ^X	Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc	Monoclonal antibody BG-7 (Blood group antigen BG-7 Lewis X) CD15, D12HF02138, Signet Laboratories, SIG-3339	-	1:500	(Byrd & Bresalier, 2004)
anti-SLe ^X	Neu5Ac α 3Gal β 4(Fuc α 3)GlcNAc	Millipore, MAB2096	200 μ g/mL	2 μ g/mL 4 μ g/mL	(Schiffmann <i>et al.</i> 2012)
3F1 anti-STn	Neu5Ac α 2-6GalNac α 1-Ser/Thr (STn)	Lote 010812, SBH Science	640 mg/mL	1:100	(Barrow <i>et al.</i> 2013)
Anticorpos Secundários					
anti-IgM produzido em rato	IgM	Vector	500 μ g/mL	1,67 μ g/mL	-
anti-IgM produzido em rato e conjugado com Alexa-Fluor-647	IgM	abcam	2000 μ g/mL	1,67 μ g/mL	-
anti-IgG produzido em rato	IgG	Sigma-Aldrich	600 μ g/mL	2 μ g/mL	-
anti-IgG produzido em rato e conjugado com Alexa-Fluor-647	IgG	ThermoFisher	2000 μ g/mL	2 μ g/mL	(Wan <i>et al.</i> 2007)

Lectinas					
Agglutinina <i>Ulex Europaeus</i> I (UEA I) biotinizada	α -1-2-Fucose	Vector Labs, B-1065	2 mg/mL	25 μ g/mL	(Staeher <i>et al.</i> 2009)
Lectina <i>Vicia Villosa</i> (VVL/VVA) biotinizada	α -N-acetilgalactosamina (GalNAc)	Vector Labs, B-1235	2 mg/mL	50 μ g/mL	(Wang <i>et al.</i> 2016)
Lectina <i>Sambucus Nigra</i> (SNA/SNL) biotinizada	α -2-6-NeuAc	Vector Labs, B-1305	2 mg/mL	50 μ g/mL	(Kurtenkov & Klaamas, 2015)

Tabela 2.2 - Lista de glicoproteínas utilizadas como controlo para a imobilização. Identificação da respetiva especificidade, marca e concentrações (*stock* e testada)

Glicoproteínas	Tipo de Glicosilação	Marca	Concentração <i>stock</i>	Concentração testada	Referências
Controlos					
Fator de Crescimento do Tumor (<i>Tumour Growth</i> , GW112)	Interage com a proteína GRIM-19	Vector, B1005	5 mg/mL	1:5 1:10	(Nallar & Kalvakolanu, 2017)
Ceruplasmina Humana (<i>Human Ceruloplasmin</i> , hCP)	N-glicosilação do tipo complexo	-	5 mg/mL	1:5 1:10	(Harazono <i>et al.</i> 2006)
Mucina de Estômago de Porco (<i>Porcine Stomach Mucin</i> , PSM)	Fuc α 2Gal β 4GlcNAc Elevada abundância de antígeno tipo 2 (<i>H-type 2 antigen</i>)	M 2378, Lote SLBM5238V Sigma-Aldrich	1 mg/mL	0.1 mg/mL 0.5 mg/mL	(Brailey <i>et al.</i> 1958)
<i>Mucina Submaxilar Bovino</i> (<i>Bovine Submaxillary Mucin</i> , BSM)	Elevada abundância de antígeno STn	Merck Millipore	2 mg/mL	0.1 mg/mL 0.5 mg/mL	(Liao <i>et al.</i> 2016)

3.2.2.4 Quantificação, processamento e análise dos dados de intensidade de fluorescência

Tal como referido na secção 2.2.3 do capítulo 2, o programa *GenePixPro7* da *Molecular Devices* foi utilizado para analisar e quantificar as imagens provenientes dos ensaios a que se refere o capítulo 3.

Nestes ensaios, foram realizadas digitalizações adicionais dos *slides*. Realizou-se a digitalização Cy3 (532 nm) e Alexa-Fluor-647 (635 nm) duas vezes: a primeira, antes do ensaio para determinar fluorescência inespecífica proveniente quer dos extratos, quer dos controlos e a segunda realizou-se após o ensaio para determinar ligações entre o que estava impresso na nitrocelulose e os anticorpos/lectinas utilizados no ensaio. Ambas as digitalizações foram realizadas a diferentes intensidades de *laser*, surgindo assim os ficheiros Cy3 (.tiff), Alexa-Fluor-647 ambos antes do ensaio (.tiff) e Alexa-Fluor-647 depois do ensaio (.tiff) (Figura 3.9). A criação de matriz/grelha sobre as imagens obtidas após as digitalizações, ficheiros .gps, foram obtidas do mesmo modo como referido na secção 2.2.3. Destes ajustes surgiram os ficheiros Cy3 (.gps), Alexa-Fluor-647 antes do ensaio (.gps) e Alexa-Fluor-647 depois do ensaio (.gps). Ambos os ficheiros relativos aos diversos *slides*, foram introduzidos no programa referido e obtiveram-se os arquivos (.gpr), por *slide*, Cy3 (.gpr), Alexa-Fluor-647 antes do ensaio (.gpr) e Alexa-Fluor-647 depois do ensaio (.gpr).

Todos os ficheiros .gps, foram depois abertos no programa Microsoft Office Exel e as intensidades de fluorescência correspondentes a cada *spot* foram transpostas para o programa GraphPad Prism 6. Construíram-se deste modo os gráficos relativos às experiências que se encontram analisados na secção seguinte.

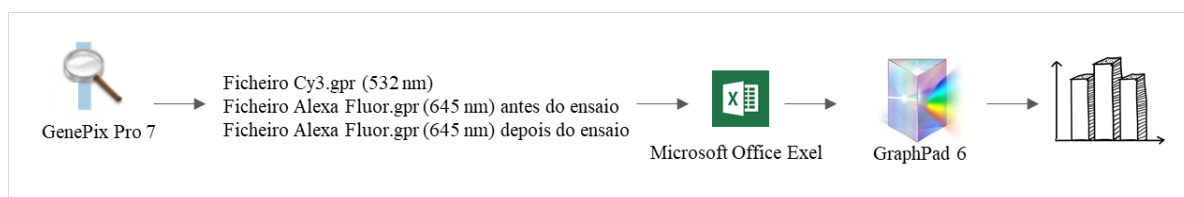


Figura 3.9 - Representação esquemática dos programas e tipos de ficheiros obtidos no decurso do ensaio. Utilização do programa GenePix Pro 7, do qual surgiram os ficheiros .gpr, seguido do uso de Microsoft Office Exel e GraphPad 6

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Ensaio de otimizações iniciais

3.3.1.1 Seleção do tampão e concentração de proteína para imobilização dos extratos celulares

Com vista a selecionar o melhor tampão a utilizar na imobilização dos extratos celulares, foram testados os tampões com os detergentes de solubilização Rapigest e SDS. Para tal, foram imobilizados os extratos celulares MCF7 e BT474 (mono e co-cultura) após solubilização em cada um dos tampões. Na tabela 2.3 encontram-se as concentrações de proteína total obtida para os diferentes extratos.

Tabela 2.3 - Concentrações dos diferentes extratos celulares, MCF7 e BT474, em mono e co-cultura

Extrato	Concentração (mg/mL)	
	Rapigest	SDS
MCF7 Monocultura	0.12	0.28
MCF7 Co-cultura	0.96	3.34
BT474 Monocultura	3.65	4.38
BT474 Co-cultura	4.05	4.65

Neste estudo inicial, foi utilizado o anticorpo anti-STn (diluição 1:100) para o ensaio de ligação de forma a aferir: 1) a sensibilidade do sinal de deteção e 2) qualidade dos *spots*. Observou-se que os *spots* apenas com Rapigest apresentavam uma morfologia melhor, com *spots* de diâmetro inferior.



Figura 3.10 - Comparação da morfologia dos spots. Visualização após ensaio com o anticorpo anti-STn (digitalização no Alexa-Fluor-647 (645 nm), 100% de intensidade de *laser* e 350 PMT).

Por análise da Figura 3.11, apresentada abaixo, é possível observar que a intensidade do sinal de ligação obtido para os extratos em tampão Rapigest é superior (no caso do anti-Le^Y) ou equiparável (no caso do anti-STn) quando são comparadas as mesmas gamas de concentrações de extrato. Deste modo, conclui-se que o tampão adequado é Rapigest.

3.3.1.2 Análise da interação do anti-STn e anti-Le^Y com glicoproteínas controlo

Para analisar glicoproteínas controlo a utilizar em futuros ensaios com o anti-STn e anti-Le^Y, realizou-se um estudo preliminar com glicoproteínas disponíveis e analisadas anteriormente no laboratório (Figura 3.12). Foi testada BSM como controlo positivo para o ensaio anti-STn, e a PSM como possível controlo positivo para o ensaio com o anti-Le^Y. Foram incluídas outras duas glicoproteínas com glicosilação complexa como possíveis controlos, a GW112 e a HCP. No ensaio com o anticorpo anti-STn obteve-se intensidade de fluorescência alta (aproximadamente 50 000) com a BSM, o que comprova que de facto existe ligação entre o anticorpo e a proteína imobilizada devido a STn expresso pela BSM. O anticorpo anti-Le^Y ligou a PSM com uma intensidade de fluorescência de aproximadamente 10 000, o que significa que este anticorpo reconhece epítomos presentes na PSM. Assim, a BSM e a PSM constituem controlos positivos e negativos adequados para validação de ensaios de ligação com estes anticorpos nos *microarrays* de extrato celulares.

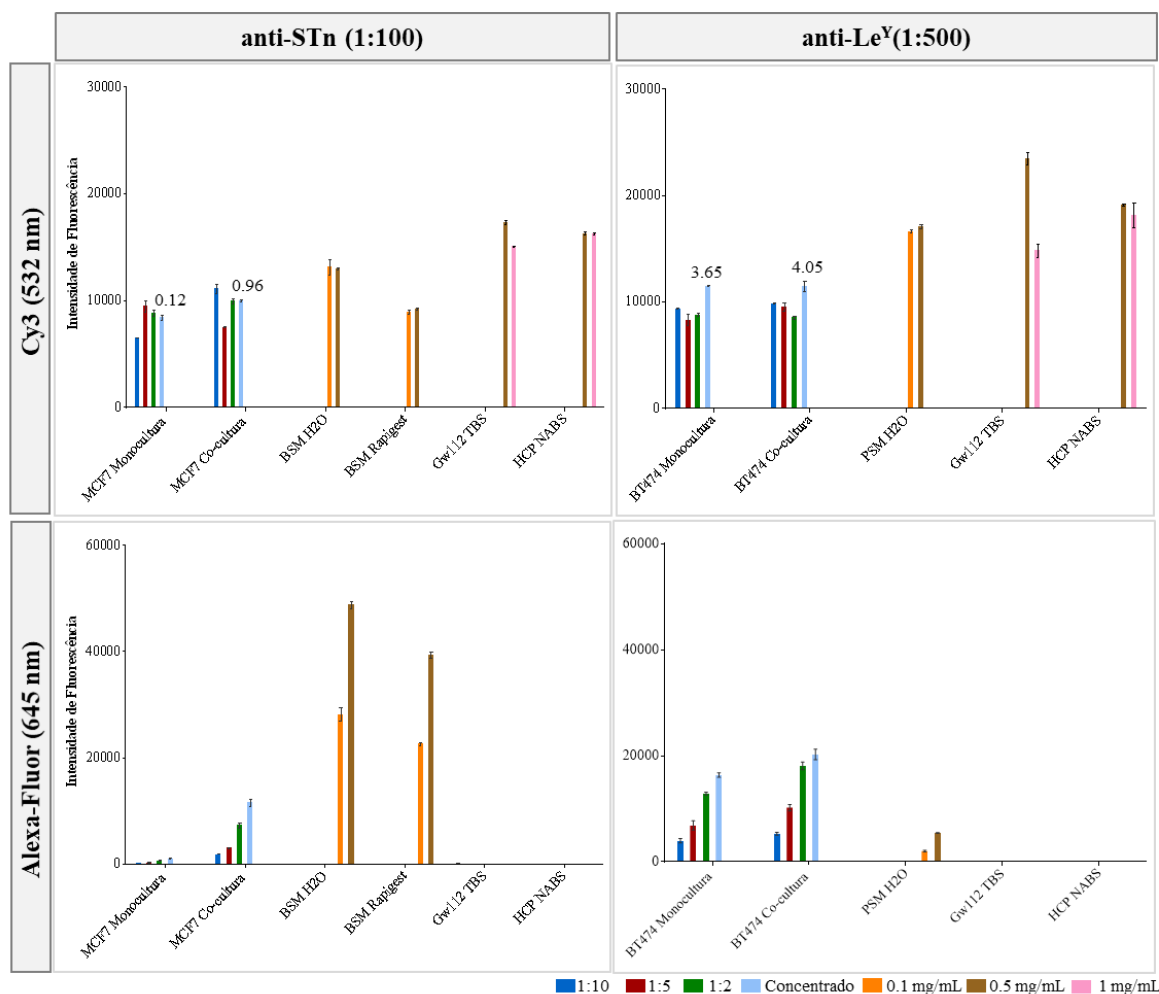


Figura 3.12 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anticorpos anti-STn (1:100) e anti-Le^Y (1:500) (digitalização no Alexa-Fluor-647 (645 nm), 100 % de intensidade de *laser* e Cy3 (532 nm), 10% de intensidade de *laser*, ambos a 350 PMT) com as respetivas proteínas controlo. As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas no topo de cada barra nos gráficos para os extratos e na legenda dos gráficos para controlos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação dos anticorpos anti-STn e anti-Le^Y

Nas secções seguintes pretendeu-se estudar estratégias para a produção e análise dos *microarrays* de extratos celulares, antes de proceder-se aos ensaios mais detalhados com os anticorpos ou lectinas alvo. Estas secções incluem: obter extratos mais concentrados; avaliar sinal específico, testando o sistema de deteção; otimização de método para a produção dos *microarrays*; e avaliação de tipos de *slides* de nitrocelulose para o ensaio de ligação. Para este fim, serão apresentados os resultados com a lectina UEA-1 que reconhece o antígeno α -1-2-Fucose e com a qual foi observada ligação específica para os extratos celulares.

3.3.1.3 Concentração dos extratos celulares por evaporação

O ensaio de concentração por evaporação na *SpeedVac* foi realizado com o intuito de, caso não fosse possível obter os extratos nas concentrações de proteína total desejadas, existir uma forma de contornar essa problemática.

Pela análise de ligação com a UEA-1 (Figura 3.13), observou-se que no geral não existiu uma variação significativa na intensidade de fluorescência obtida com a concentração dos extratos por evaporação, e que os perfis de ligação são idênticos. Estes resultados permitiram concluir da estabilidade das glicoproteínas reconhecidas pela UEA-1 neste processo. Esta observação é bem visível no caso do extrato MCF7 em co-cultura, que apresenta sinal de aproximadamente 30 000 e que após concentração em *SpeedVac* apenas decresce para valores próximos de 20 000. Este sinal é considerado sinal específico, pois não foi obtido sinal significativo com o sistema de deteção.

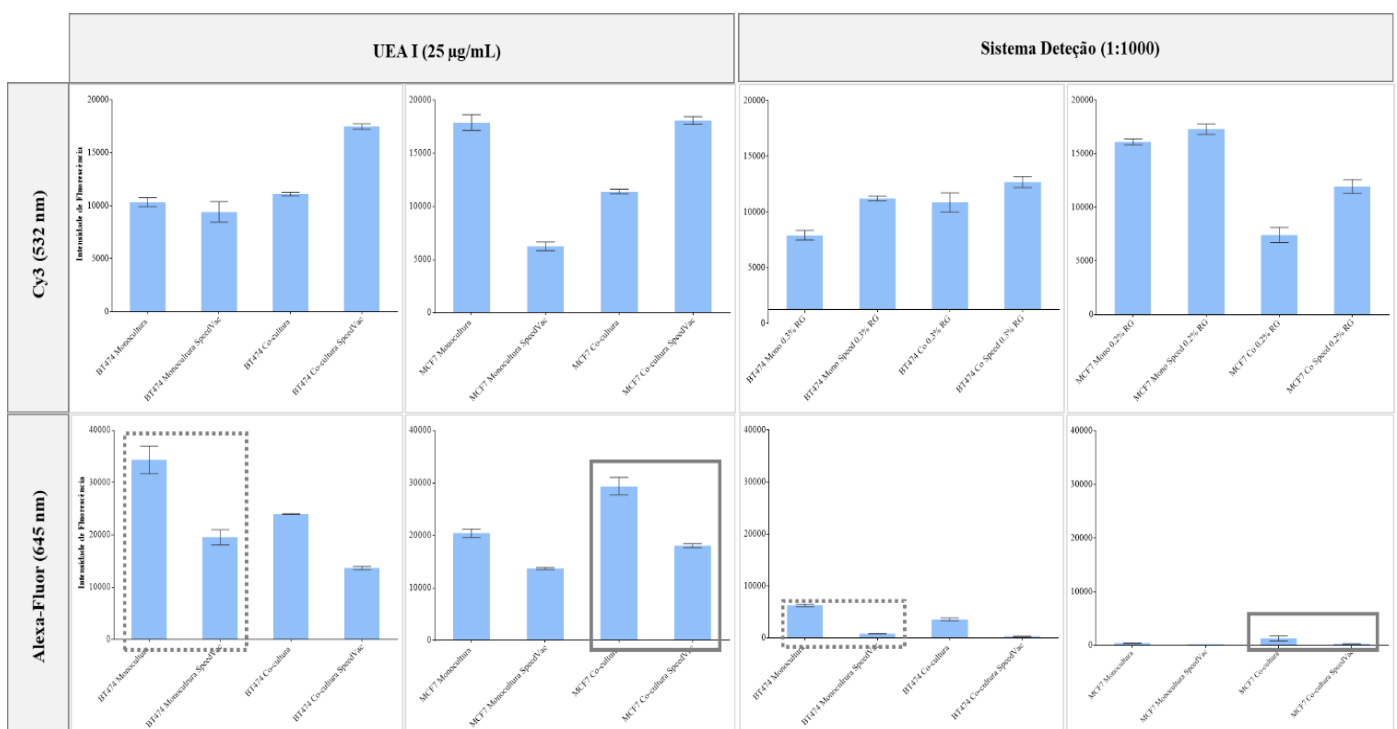


Figura 3.13 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com a lectina UEA I (25µg/mL) e sistema de deteção (1:1000) (digitalização no Alexa-Fluor-647 (645 nm), 5 % de intensidade de *laser* e Cy3 (532 nm), 10% de intensidade de *laser*, ambos a 350 PMT). Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação da lectina e do sistema de deteção

3.3.1.4 Otimização do método para a produção dos *microarrays* de extratos celulares

Com vista a determinar o melhor método para a produção dos *microarrays*, foi testada a estabilidade dos extratos de proteína ao longo do tempo (Figura 3.14). Assim, no decurso de 5 semanas consecutivas, foram investigados 2 métodos: impressão simultânea de *slides* no dia da preparação das proteínas (método A) e impressão proveniente de proteínas já preparadas que se encontravam armazenadas em microplaca de 384 poços a 4°C (método B). Na semana 0 foi realizada a impressão, com recuso à microplaca, de 3 *slides* que foram armazenados no exsiccador. Todas as semanas, no dia anterior ao ensaio, a microplaca foi retirada de 4°C, centrifugada (300 G, 4°C durante 3 minutos, centrífuga *ependorf* 5804 R) e feita a impressão de 1 *slide*. No dia seguinte foi realizado o ensaio com o *slide* impresso no dia anterior e o *slide* impresso na semana 0. Estes passos foram repetidos num espaço temporal de 5 semanas, com ensaios realizados na semana 0, 1, 3 e 5, sendo que em cada ensaio, 2 *slides* foram alvo de incubação com as lectinas UEA I (25 µg/mL) e VVL (50 µg/mL). Note-se que, são apenas apresentados resultados a partir da semana 1 pois na semana 0 o ensaio foi inconclusivo devido a um elevado *background* que afetou o sinal específico das lectinas.

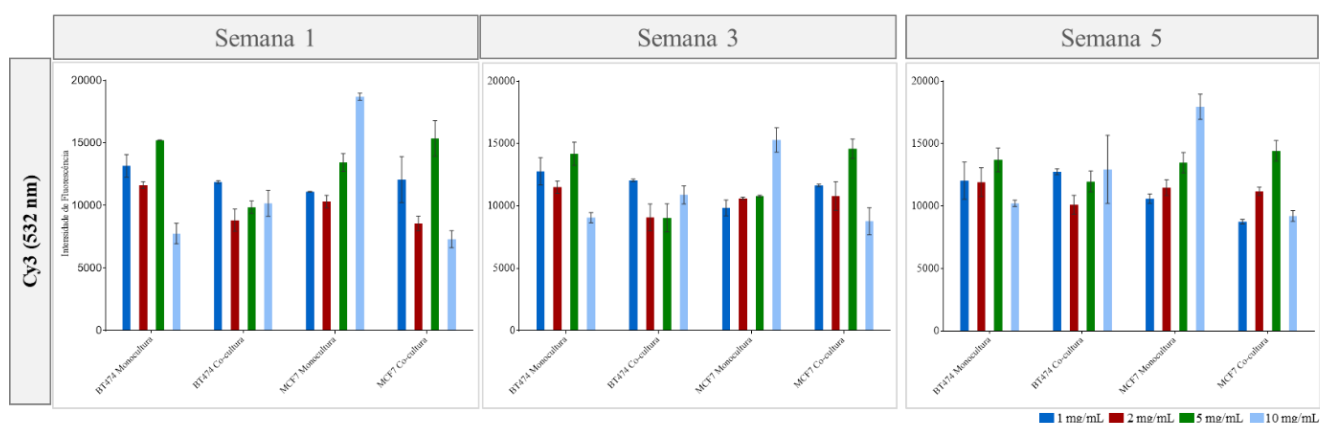


Figura 3.14 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A na semana 1, 3 e 5 após imobilização (digitalização no Cy3 (532 nm), 10% de intensidade de *laser*, a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I

Foi avaliada a possibilidade de variação do sinal fluorescência do fluoróforo, Cy3, adicionado no decurso da preparação das amostras na microplaca. Para tal, no dia seguinte à imobilização dos 3 *slides* foi realizada a digitalização Cy3 (532 nm) de todos os *slides* impressos, de forma a obter uma quantificação de Cy3 inicial (logo após a impressão). Posto isso, ao longo das 5 semanas e sempre que se realizava ensaio, foi feita uma segunda digitalização e correspondente quantificação de modo a comparar variações ao longo do tempo. Observou-se que no método A a intensidade de fluorescência não sofreu alterações significativas mantendo-se entre valores de 13 000 e 14 000 (Figure 3.14).

Para o método B, foi realizada a mesma análise por observação dos gráficos correspondentes à digitalização Cy3 realizada no dia após a impressão das amostras que provinham da placa armazenada a 4°C (Figura 3.15). Foi também realizada a digitalização com Alexa-Fluor-647 (645 nm) em paralelo para determinar sinais inespecíficos tendo-se concluído que não se verificaram alterações.

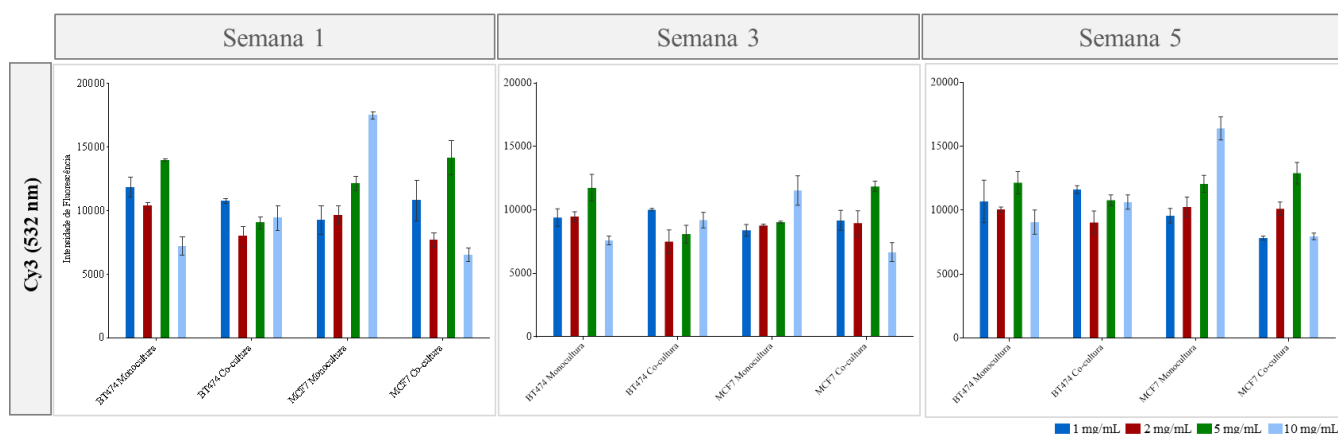


Figura 3.15 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método B na semana 1, 3 e 5 após imobilização (digitalização no Cy3 (532 nm), 10% de intensidade de laser, a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I

Os resultados da análise com a lectina UEA-1 permitem concluir que ocorreu ligação específica com os extratos MCF7 monocultura e co-cultura (Figura 3.16). A intensidade de ligação é dependente da concentração de extrato de proteína inicial. É de notar que a intensidade do sinal de fluorescência é superior nos extratos obtidos da co-cultura, quando comparados com a monocultura, 30 000 e 20 000 para a concentração de extrato mais elevada, respetivamente. Foi observada ligação com a UEA-1 para os extratos de BT474, na ordem de 35 000 para monocultura e 25 000 para co-cultura. No entanto, estes resultados são inconclusivos devido ao sinal de fluorescência basal obtido para estes extratos com o sistema de deteção.

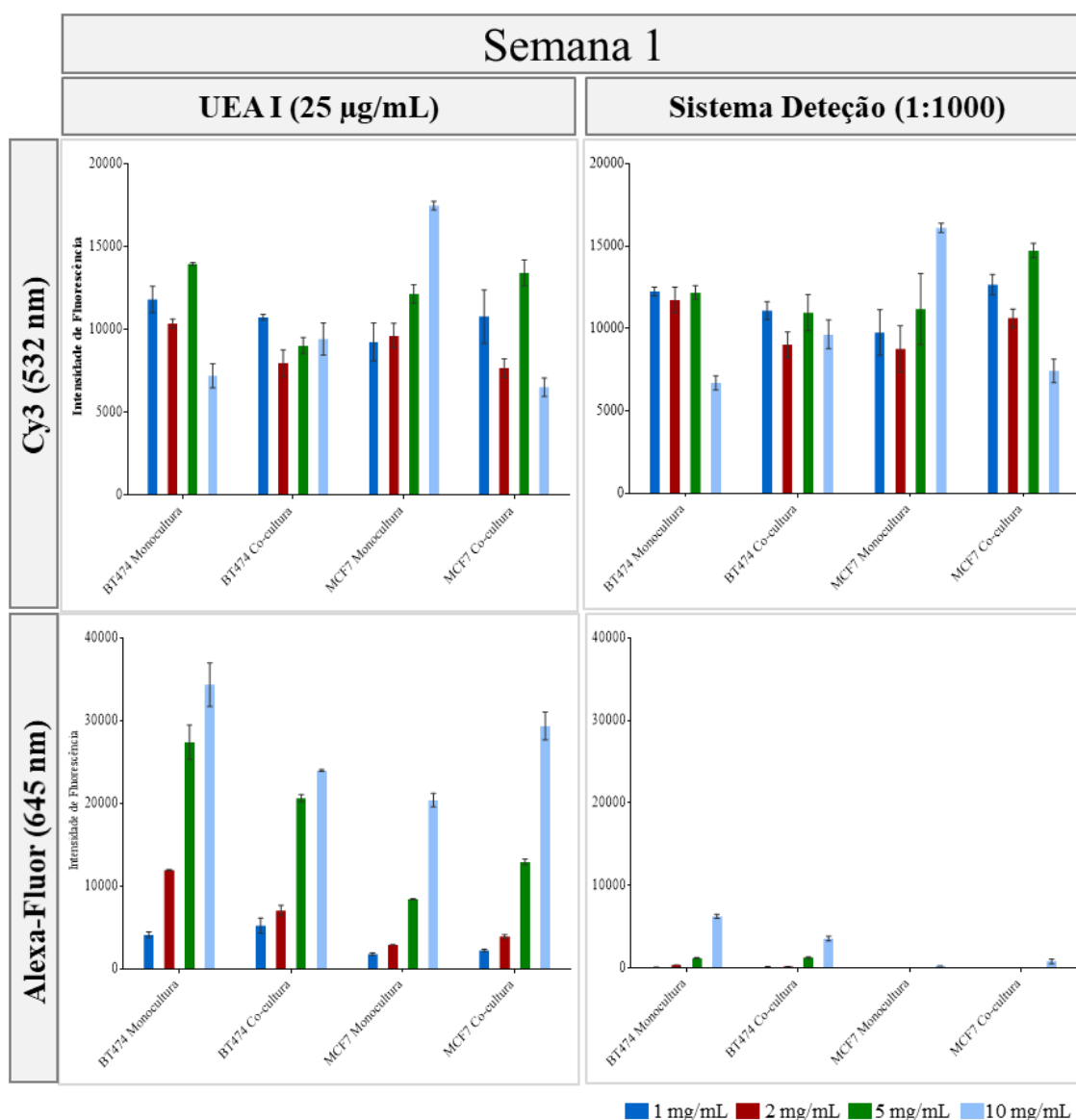


Figura 3.16 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A na semana 1 (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 5% de intensidade de *laser* ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I e sistema de detecção

Desta forma o método A foi testado ao longo do ensaio, através da ligação da UEA-1 aos extratos MCF7 mono e co-cultura (Figura 3.17), para averiguar se ocorriam alterações dos valores de intensidade de fluorescência, significativo de uma alteração da ligação. São apresentados na Figura 3.17 os resultados relativos à semana 1 e semana 5. Pela análise dos gráficos Alexa-Fluor-647 após ligação foi possível observar que os valores de intensidade de fluorescência para MCF7 monocultura (20 000) e MCF7 co-cultura (30 000) mantiveram-se idênticos na primeira e quinta semanas. Assim, é possível concluir que o método A pode ser aplicado aos extratos celulares, e que os microarray produzidos são estáveis durante um período de pelo menos de 5 semanas.

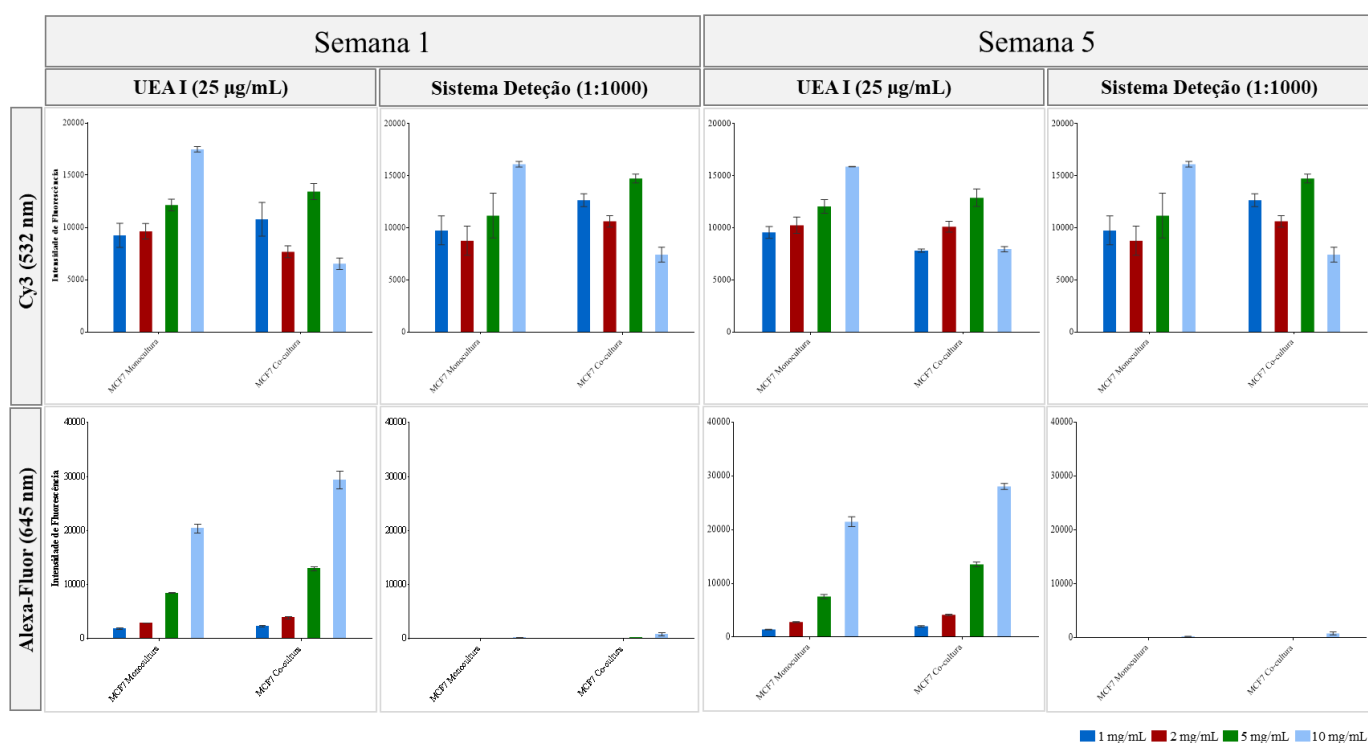


Figura 3.17 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A na semana 1 e 5 (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 5% de intensidade de *laser* ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I e ao sistema de detecção

Com vista a comparar os métodos A e B, são comparados na Figura 3.18 os resultados da análise com lectina UEA I (25 µg/mL). O perfil de ligação com a UEA-1 foi idêntico nos dois métodos. No entanto, de uma forma geral as intensidades de ligação na semana 5 são ligeiramente superiores para o método A. Conclui-se deste modo que, utilizando o método A é possível contornar a problemática da perda de sinal associada à estabilidade das amostras.

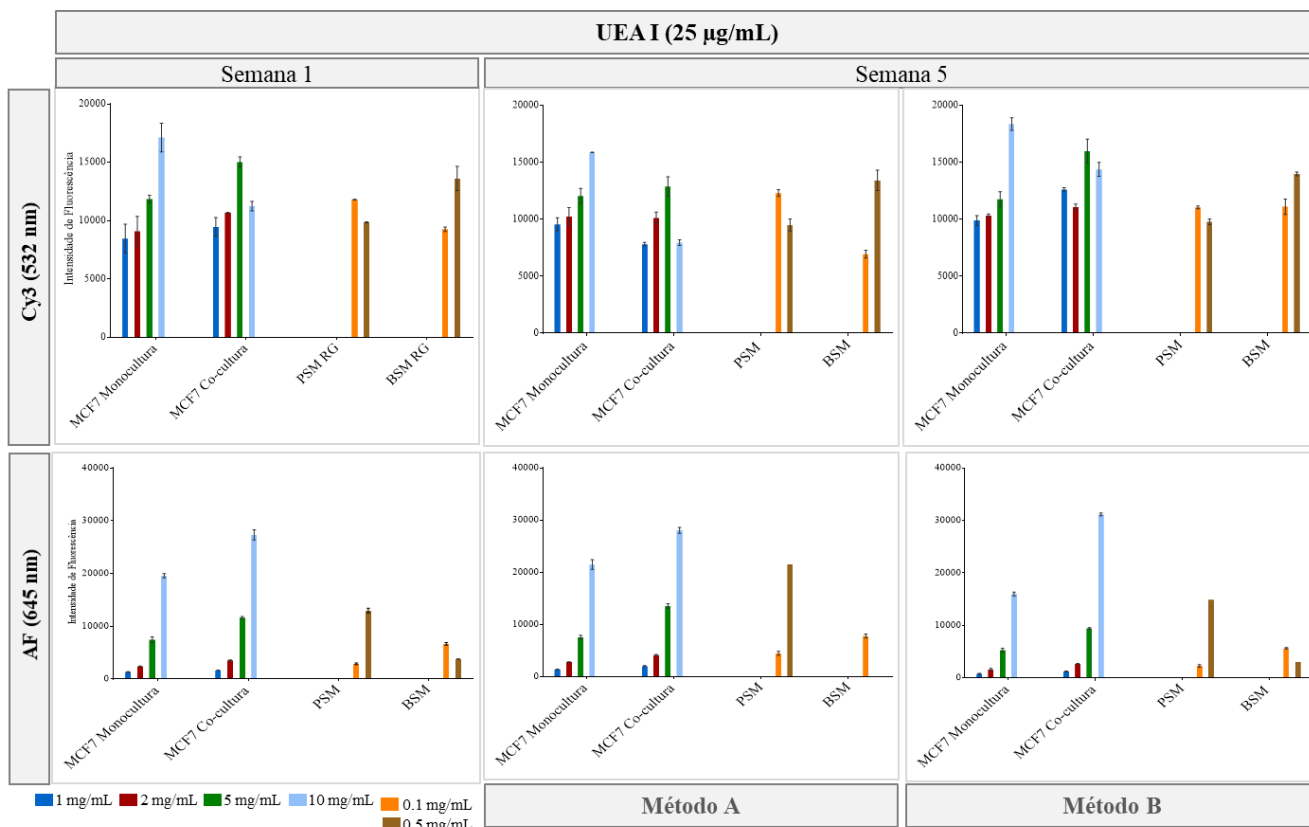


Figura 3.18 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL), método A e método B na semana 1 e 5 (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 5% de intensidade de *laser* ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I

3.3.2 Avaliação de diferentes tipos de *slides* de nitrocelulose para o ensaio de ligação

A utilização de diferentes tipos de *slides* de nitrocelulose pode influenciar o sinal de ligação devido a possíveis diferenças no método de fabricação dos *slides*, por exemplo na composição e deposição do polímero de nitrocelulose. Com vista a utilizarem-se *slides* com dois blocos de nitrocelulose para aumentar o número de ensaios por *slide* e a diminuir o volume de amostra, estes foram comparados com os *slides* de 1 bloco nitrocelulose, utilizados inicialmente (Figura 3.19). Esta avaliação consistiu na repetição do mesmo ensaio em *slides* distintos, 1 constituído por 1 bloco de nitrocelulose e outro *slide* constituído por 2 blocos de nitrocelulose com o objetivo de detetar eventuais alterações dos valores de intensidade de fluorescência devido às diferentes superfícies usadas.

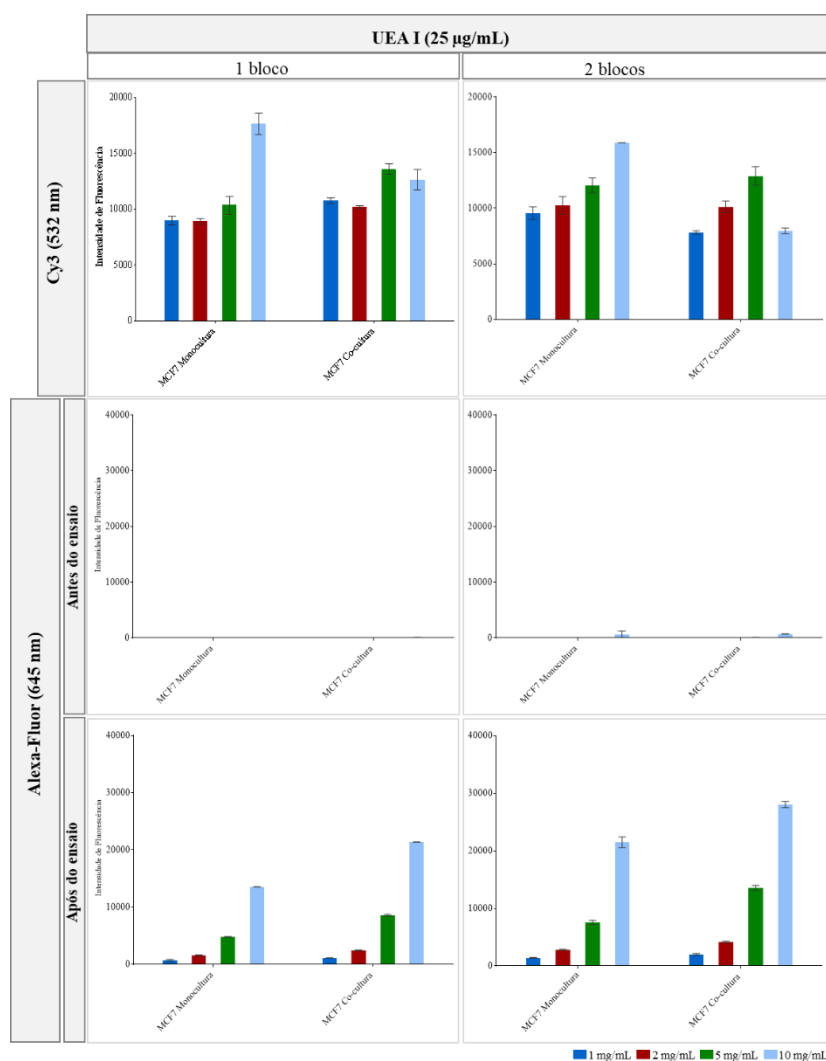


Figura 3.19 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com lectina UEA I (25µg/mL) nos diferentes *slides* (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 5% de intensidade de *laser* ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I

Para análise da ligação foi utilizada a lectina UEA I à concentração de 25 µg/mL. Os resultados com os extratos de MCF7 mono e co-cultura são apresentados na Figura 3.19. Por interpretação dos gráficos pode concluir-se que: em ambos os *slides* as proteínas ficaram imobilizadas, pela visualização no Cy3 (532nm); não existe sinal inespecífico dado pela imobilização dos extratos nas diferentes superfícies, pela visualização no Alexa-Fluor-647 (645nm) antes do ensaio de ligação; e que não existem alterações significativas no perfil de ligação da UEA-1 entre os dois tipo de *slide*, pela visualização no Alexa-Fluor-647 (645nm) depois do ensaio de ligação.

3.3.3 Ensaio de ligação com anticorpos anti-Le^X, anti-Le^Y e anti-STn

Após a otimização dos ensaios nos *microarrays* de extratos celulares, referidos nas secções anteriores, foram realizados ensaios de ligação com os anticorpos, anti-Le^X, anti-Le^Y e anti-STn, utilizando os *microarrays* com extratos de proteína das culturas MCF7 e BT474 imobilizados às concentrações normalizadas de 10, 5, 2 e 1 mg/ml (Figura 3.20 e Figura 3.21). Pela análise dos gráficos Cy3 observa-se que a imobilização na nitrocelulose foi realizada com sucesso.

Para os anticorpos anti-Le^X e anti-Le^Y os resultados do sistema de deteção, anticorpo secundário e streptavidina, são os mesmos para ambos os ensaios e são apresentados em paralelo. Os resultados da análise são inconclusivos devido ao sinal de fluorescência obtido com o sistema de deteção, que é mais evidente para os extratos de BT474. Na análise dos extratos MCF7 com o anticorpo anti-Le^Y parecia não existir interferência do sistema de deteção. No entanto, fez-se nova quantificação com digitalização no Alexa-Fluor-647 utilizando uma intensidade de *laser* mais alta (100% de feixe) (Figura 3.21), o que permitiu concluir que a intensidade de fluorescência de MCF7 mono e co-cultura obtida com o anti-Le^Y poderá ser proveniente do sistema de deteção à semelhança do anti-Le^X.

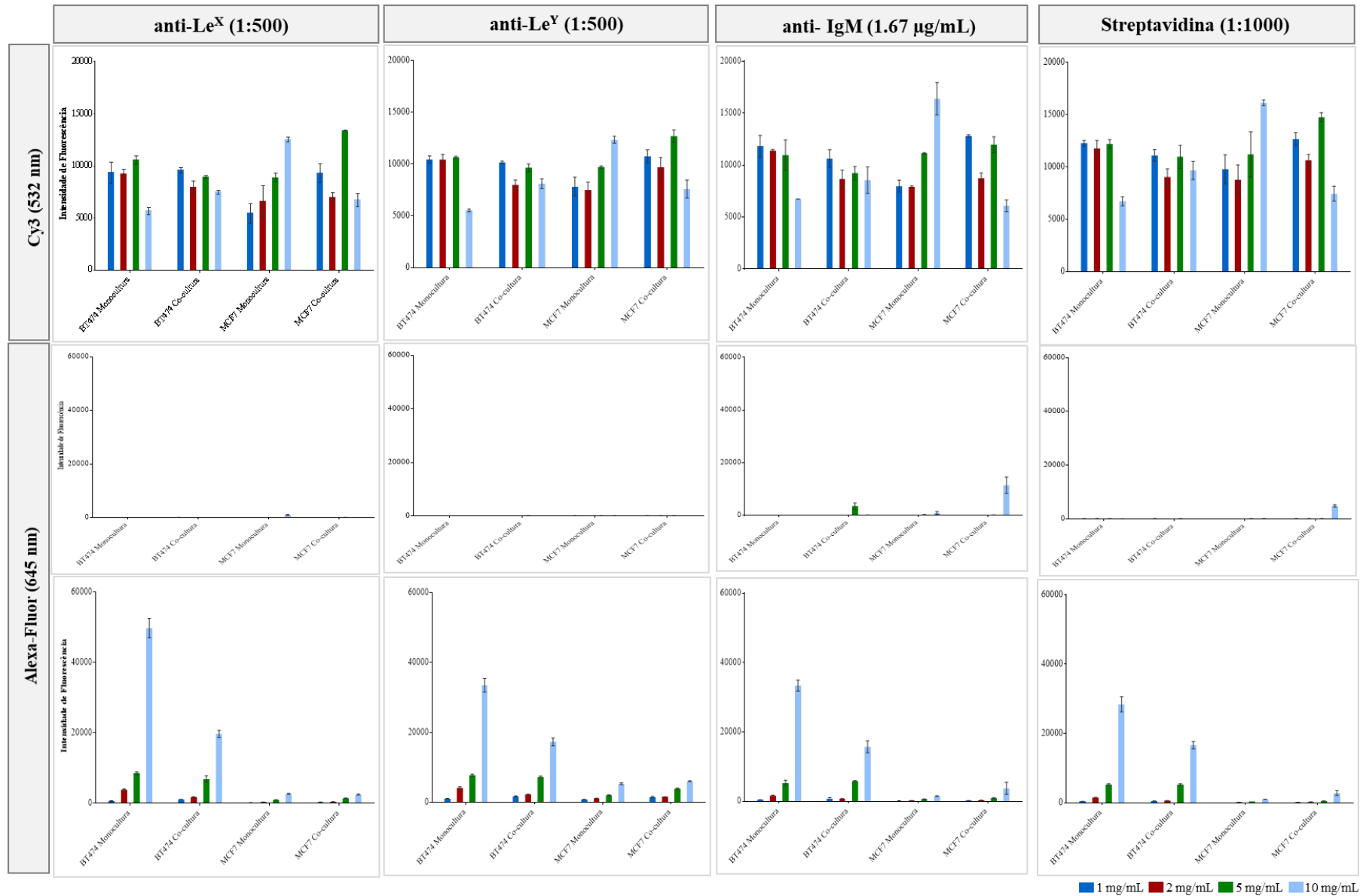


Figura 3.20 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-Le^X (1:500), anti-Le^Y (1:500), anti-IgM (1.67 mg/mL) e streptavidina (1:1000) (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 30% de intensidade de *laser*, ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação à lectina UEA I

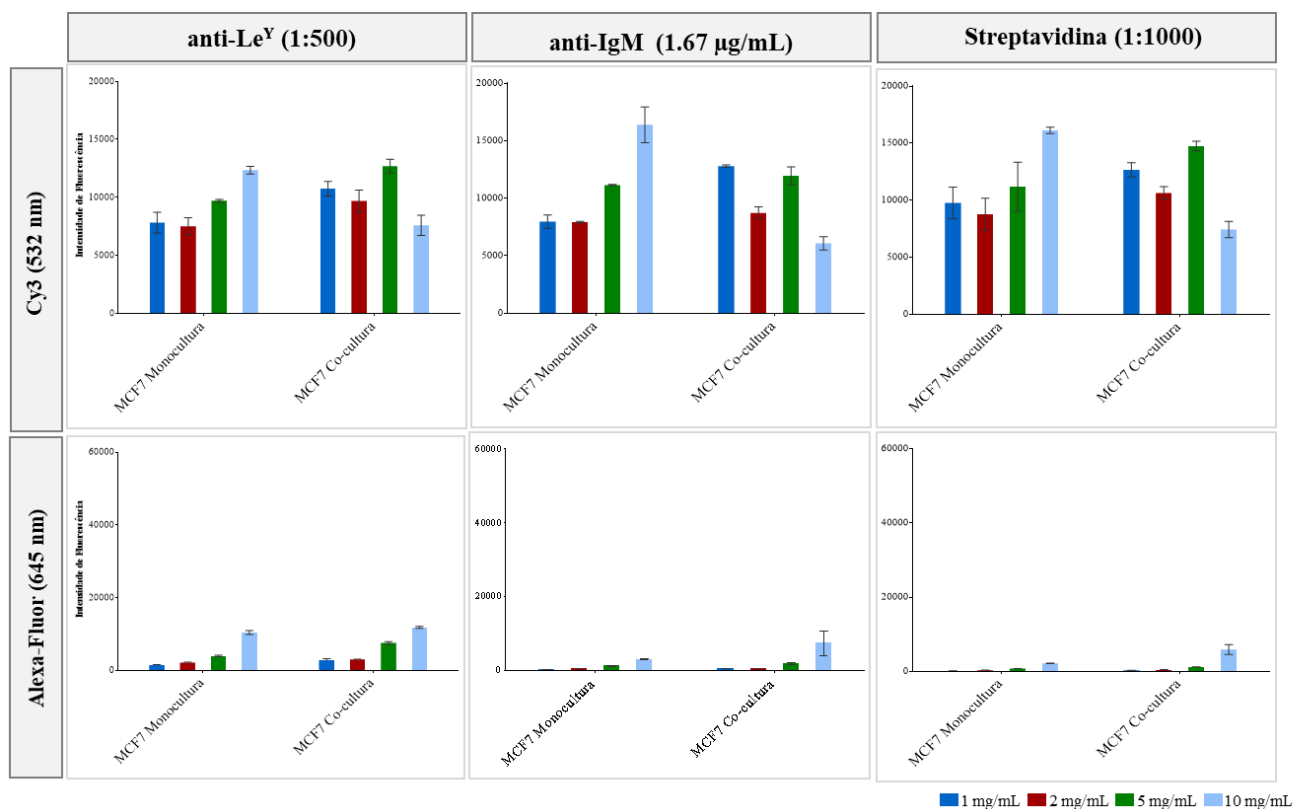


Figura 3.21 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-Le^Y (1:500) e anti-IgM (1.67 µg/mL) digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 100% de intensidade de *laser*, ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação de anti-Le^Y e anti-IgM

A mesma conclusão foi obtida para a ligação do **anti-STn 3F1** com os extratos de BT474, em que o sinal de fluorescência foi observado na análise com o sistema de detecção streptavidina (Figura 3.22). Em contraste, a ligação do anticorpo aos extratos MCF7, parece ser específica, e dependente da concentração de extrato (Figura 3.22). É de notar o decréscimo da intensidade de sinal de ligação do anti-STn aos extratos da co-cultura MCF7 com fibroblastos.

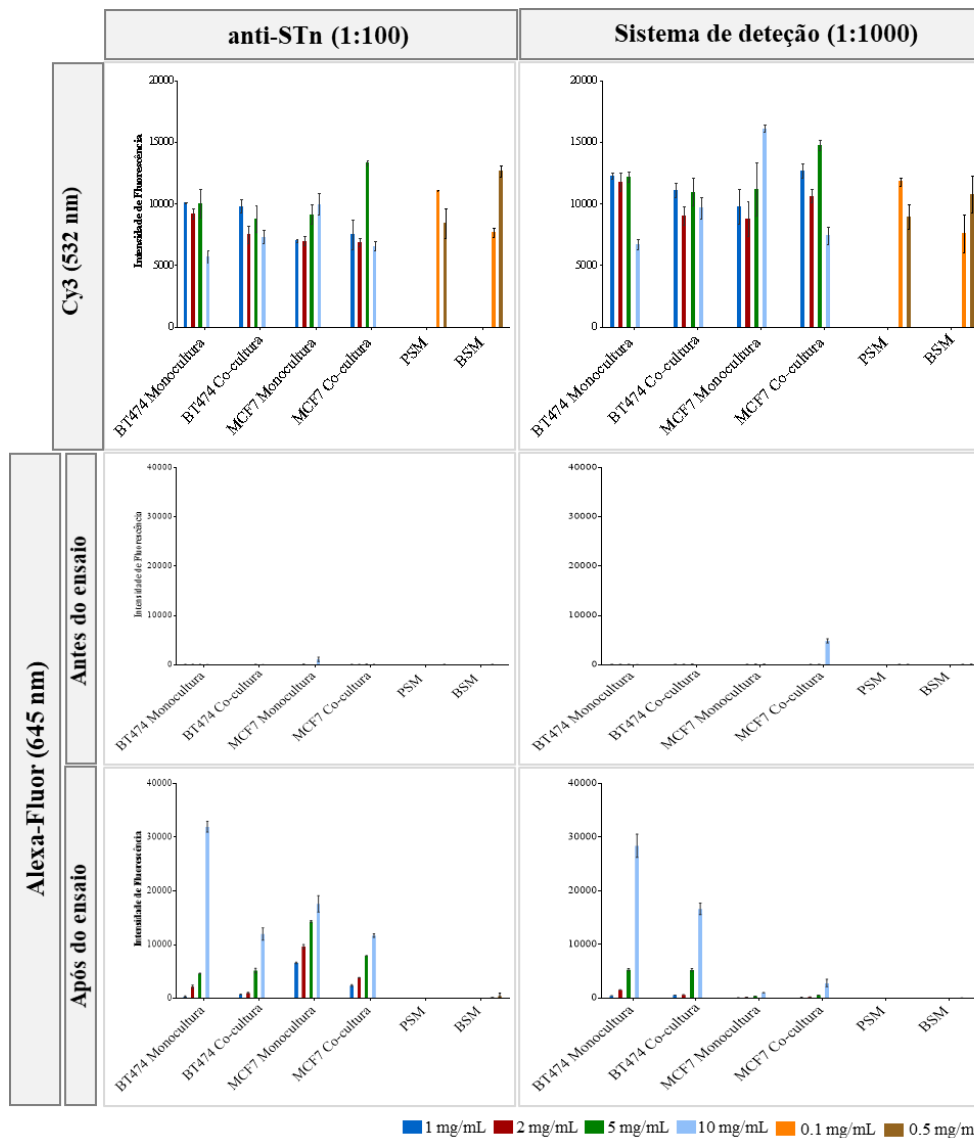


Figura 3.22 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-STn (1:100) e streptavidina (1:1000) (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 100% de intensidade de *laser*, ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas na legenda dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação de anti-STn e sistema de detecção

De forma a aferir que o sinal de ligação do anti-STn aos extratos MCF7 monocultura é específico, o ensaio de ligação foi repetido utilizando-se um anticorpo diferente para detecção: o anti-IgG, produzido em rato e conjugado com o fluoróforo Alexa-Fluor-647 (645nm). Dado que o anticorpo é já conjugado com o fluoróforo e detetável por fluorescência abdicou-se do uso de streptavidina, eliminando deste modo possíveis interferências causadas por esta. Com este sistema, foi também observada a ligação forte do anti-STn ao extrato MCF7 monocultura 3D (intensidade de fluorescência aproximadamente 25 000) (Figura 3.23). Não foi observada ligação ao extrato BT474 monocultura 3D. Estes resultados corroboram os resultados anteriores.

3.3.4 Avaliação do perfil de glicosilação STn em extratos de culturas 2D e 3D

Nesta parte do trabalho, foram utilizados os *microarrays* de extratos celulares para comparar os perfis de ligação obtidos com o anticorpo anti-STn a extratos proteicos provenientes de cultura 2D e 3D das duas linhas celulares: MCF7 e BT474, ambas em monocultura. Os *microarrays* forma preparados com as seguintes concentrações de extrato proteico total: 10 mg/mL para MCF7 3D e BT474 3D, 5 mg/mL para MCF7 2D, 2 mg/mL BT474 2D.

Desta forma pretendia-se averiguar eventuais diferenças na expressão do antígeno STn nos dois modelos celulares. A detecção da ligação com o anti-STn foi observada de forma específica em extratos celulares de linha MCF7 em monocultura 3D (Figura 3.23). Em MCF7 em monocultura 2D foi apenas detetado sinal à concentração de 5 mg/mL. Estes resultados levam a inferir que em 3D, onde as culturas celulares são agregadas haverá maior conservação de glicanos expressos, detetáveis em concentrações mais baixas nos *microarrays*. De acordo com resultados anteriores, não foi observada ligação do anti-STn a os extratos BT474 provenientes de cultura 2D e 3D.

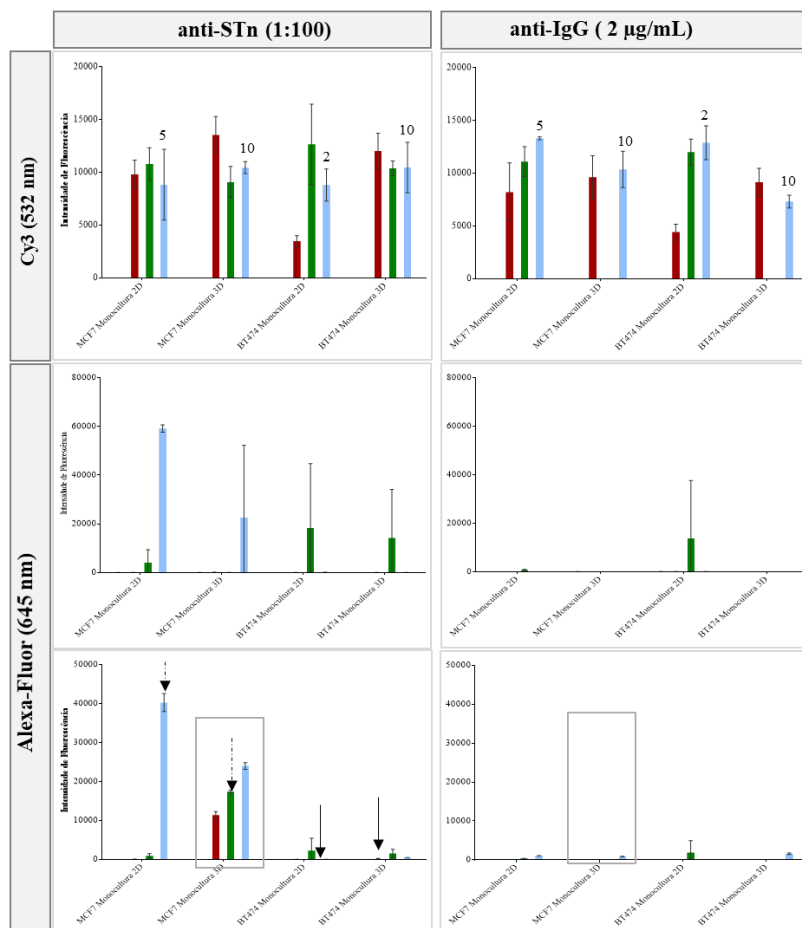


Figura 3.23 - Gráficos provenientes de ensaio de ligação com anti-STn (1:100), anti-IgG conjugado com Alexa-Fluor-647 (2 µg/mL) (2 µg/mL) (digitalização no Cy3 (532 nm) a 10% de intensidade de *laser*, e Alexa-Fluor-647 (645 nm) a 30% de intensidade de *laser*, ambas a 350 PMT). As concentrações iniciais (mg/ml) de proteína total imobilizada em cada *spot* estão indicadas nas barras dos gráficos. Os erros associados à intensidade de fluorescência foram calculados a partir de triplicados após ligação anti-STn e anti-IgG

3.4 Conclusões

Relativamente ao ensaio que visava determinar qual o melhor tampão de solubilização dos extratos celulares, MCF7 e BT474, concluiu-se que seria adequada a utilização de Rapigest em detrimento de SDS, quer pela morfologia dos *spots* impressos na nitrocelulose, quer pelo sinal de intensidade de fluorescência após ensaio de ligação. Relativamente à concentração mínima de proteína total, esta, foi determinada para extratos MCF7 e BT474, tendo-se concluído que é de 2 mg/mL e 4 mg/mL, respetivamente, tendo em consideração ensaios com anticorpo anti-STn (1:100) e a UEA-1 (25 µg/mL).

As glicoproteínas a utilizar como controlo positivos nos ensaios dos *microarrays* de extratos celulares incluem a mucina BSM para ensaios com o anticorpo anti-STn e a mucina PSM para ensaios com o anticorpo anti-Le^Y.

A concentração por evaporação na *SpeedVac* não levou a perda significativa de sinal de ligação com a lectina UEA-1, concluindo-se que é possível concentrar extratos MCF7 e BT474 desta forma para análise nos *microarrays*.

Do ensaio de estabilidade de extratos imobilizados na nitrocelulose através da análise de ligação com a lectina UEA-1, foi possível concluir que o sinal de intensidade de fluorescência é superior quando a imobilização é realizada logo após preparação das amostras e os *slides* são armazenados no exsiccador até à data do ensaio. É possível usar esses mesmos *slides* num período de pelo menos 5 semanas, pois a ligação lectina/extrato mantém-se estáveis. A impressão dos *slides* semanalmente a partir de microplaca armazenada a 4°C, permitiu verificar uma ligeira descida de valores de intensidade de fluorescência. Do ensaio com lectinas foi possível concluir que há sinal específico de ligação para a lectina UEA I (25 µg/mL) em extratos MCF7 mono e co-cultura, imobilizados a 10 mg/mL.

Dos ensaios de ligação com anticorpos, conclui-se que para anti-Le^X (1:500) a ligação a extratos celulares BT474 não é conclusiva devido à ligação não específica e não existe ligação a MCF7. Com o anticorpo anti-Le^Y (1:500) o sinal obtido para ambos os extratos não é conclusivo, dado que o sistema de deteção dá sinal. Em relação ao anticorpo anti-STn (1:100), a ligação aos extratos BT474 é não específica. No entanto, no ensaio com o anticorpo anti-IgG conjugado com Alexa-Fluor-647 constatou-se que a intensidade de fluorescência observada corresponde a sinal de ligação entre o anticorpo anti-STn e o extrato imobilizado, MCF7 em monocultura. A ligação específica observada com o anti-STn aos extratos de proteína da linha celular MCF7 valida os *microarrays* de extratos celulares, pois sabe-se que esta linha celular é STn⁺.

No o estudo de comparação entre extratos proteicos provenientes de monocultura em 2D e 3D concluiu-se que, para extrato MCF7 monocultura 2D, em concentrações mais baixas, se perdem ligações essenciais para que o anticorpo anti-STn se ligue, dadas pela perda de intensidade de fluorescência registada quando se compara 2D com 3D. Para a linha celular BT474 não ocorreu sinal de ligação em ambas as culturas.

Capítulo 4 – Conclusões globais e trabalho futuro

4. Conclusões globais e trabalho futuro

Nesta tese, a tecnologia miniaturizada dos *microarrays* permitiu, por um lado, caracterizar a especificidade de ligação a glicanos por parte de alvos de interesse para estudar interações no microambiente tumoral, como a Siglec-15, e por outro o estudo de interações de anticorpos e lectinas com modelos celulares de cancro para detecção de epítomos glicosilados em proteínas. A informação obtida será um ponto de partida para o melhor conhecimento do envolvimento de glicanos em processos/mecanismos associados a doenças como o cancro.

Os *microarrays* permitem investigar a componente tumoral do modelo, estudando interações entre alvos de interesse e glicanos presentes no microambiente tumoral, identificando dessa forma, diferentes interações. Assim, pretende-se a obtenção de informação molecular que permita mapear o microambiente tumoral e abrir caminho ao desenho de futuras estratégias para a entrega localizada de fármacos.

O uso de lectinas Siglec-15, obtidas de fontes diferentes, em ensaio de *microarrays* permitiu constatar que embora sejam obtidas de formas diversas, a especificidade de ligação se mantém para as sondas selecionadas no *set* utilizado. Após análise dos resultados obtidos com a Siglec-15 mutada, onde o aminoácido Arginina (R) foi substituído por Alanina (A) na posição 143, constatou-se que se perdeu ligação às sondas quase por completo, o que permite concluir que o aminoácido Arginina é essencial para que ocorra este tipo de ligação. Foi também possível comprovar que Siglec-15 se liga com elevada intensidade ao antigénio STn bem como a outros oligossacáridos sialilados em α 2-3 e α 2-6 com maior avidez, além dos descritos pela literatura. Descobriu-se uma nova especificidade de Siglec-15, esta não liga apenas sondas sialiladas mas também sondas não sialiladas como O-glicano, com epítomo *core 3* ligado a Thr e tetrassacáridos derivados de heparina os quais merecem especial atenção.

Os próximos passos são essencialmente a análise de hSiglec-15-WT e hSiglec-15 R143A em *microarrays* de glicano com maior diversidade de sequências, nos quais se imobilizam glicanos sialilados e não sialilados, incluindo polissacáridos complexos com grupos amina, glicosaminoglicanos (GAGs), com vista a para identificar ligandos para os quais Siglec-15 apresenta alta afinidade. Ao nível de técnicas poderá ponderar-se a possibilidade do uso de ressonância magnética nuclear (RMN) e/ou cristalografia de Raio-X para descodificar a estrutura de Siglec-15 e até mesmo estudar estruturalmente de que forma essa ligação/interação se dá: mapear o local de ligação, ver a densidade do glicano, definir a nível molecular os determinantes da ligação, identificar aminoácidos envolvidos na ligação e assim explicar a especificidade da ligação. Outra parte do trabalho futuro aliado a Siglec poderá passar por realizar ensaios com outras Siglec e comparar os resultados obtidos.

Por intermédio dos ensaios descritos com extratos celulares MCF7 e BT474 foi possível selecionar o tampão ideal para solubilizar os extratos sendo que, em simultâneo com esta análise, determinou-se a concentração mínima de proteína para obtenção de bom sinal de intensidade de fluorescência. Resultados provenientes do ensaio de concentração de extratos por *SpeedVac* comprovaram que é possível recorrer a esta técnica para concentrar extratos celulares sem ocorrer perda de sinal de ligação. A lectina UEA I (25 µg/mL) ligou-se a extratos MCF7 mono e co-cultura sendo testada em paralelo a impressão/imobilização dos extratos celulares em superfícies compostas por diferentes blocos de nitrocelulose, por métodos distintos, por forma a se obterem condições viáveis de armazenamento de *slides* impressos.

Foram também testados anticorpos como anti-Le^X, anti-Le^Y e anti-STn, para o qual o ensaio com anticorpo, anti-IgG conjugado com Alexa-Fluor-647 permitiu concluir que ocorrer ligação entre o anticorpo anti-STn e o extrato MCF7 monocultura imobilizado, validando assim os *microarrays* de extratos celulares. O estudo comparativo entre linhas celulares MCF7 e BT474 ambas em monocultura sugere que quando os extratos são agregados (3D) preservam-se determinadas ligações essenciais para que o anticorpo de interesse, neste caso, anti-STn se ligue.

Conjugando os resultados obtidos quer nos ensaios com extratos celulares quer nos ensaios de especificidade de Siglec-15, o próximo passo será utilizar Siglec-15 como alvo no ensaio de *microarrays* com extratos celulares em co-cultura com macrófagos imobilizados. Por forma a validar o método, técnica de *microarrays* aplicada a extratos celulares, poderá ser utilizada com outros alvos como Siglec-9, selectinas, dectina-1, galectina-3 e recetor de manose tendo em conta que estes exibem diferentes locais de ligação a glicanos. O passo seguinte passará por imobilizar as proteínas que apresentem afinidade para os extratos e interroga-las com extratos celulares, por forma a confirmar as ligações. Os alvos detetados nos *microarrays* poderão ser identificados por espectrometria de massa e validados funcionalmente no modelo celular. Assim, será possível decifrar a rede de interações entre células de cancro de mama-lectina-macrófagos associados a tumores e propor potenciais abordagens terapêuticas inovadoras para o tratamento deste tipo de células bem como identificar assinaturas moleculares que possam vir a ser usadas como biomarcadores destas linhas celulares.

Referências

- Alessandri, K. *et al.*, 2013. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), pp.14843–14848.
- Allavena, P. *et al.*, 2010. Engagement of the Mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clinical and Developmental Immunology*.pp.1-11
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M., 2015. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, 4(2), pp.133–161.
- Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K., & Nakamura, M., 2007. Siglec-15: An immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology*, 17(8), pp.838–846.
- Barrow, H., T *et al.*, 2013. Suppression of Core 1 Gal-Transferase Is Associated with Reduction of TF and Reciprocal Increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 Glycans in Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(3), pp.1–6
- Belisle, J. *et al.*, 2010. Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Molecular Cancer*, 9(1), pp.118.
- Bertozi, C. R., & Rabuka, D., 2009. Structural basis of glycan diversity. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium og Glycobiology Editors., California.
- Bailey, F., *et al.*, 1958. Solution Properties of Porcine Submaxillary Mucin. *Industrial & Engineering Chemistry*, 50(1), pp.8–11.
- Briard, J. G., Jiang, H., Moremen, K. W., MacAuley, M. S., & Wu, P., 2018. Cell-based glycan arrays for probing glycan-glycan binding protein interactions. *Nature Communications*, 9(1), pp.1–11.
- Brockhausen, I., Schachter, H., & Stanley, P., 2009. O-GalNAc Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium og Glycobiology Editors., California.
- Byrd, J. C., & Bresalier, R. S., 2004. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(1–2), pp.77–99.
- Cavnar, M. J. *et al.*, 2013. KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(13), pp.2873–2886.

- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N., 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, 6(3), pp.1670–1690.
- Ekert, J. E., *et al.*, 2014. Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro - Implication for drug development. *PLoS ONE*, 9(3), pp.1–14.
- Estrada, M. F., *et al.*, 2016. Modelling the tumour microenvironment in long-term microencapsulated 3D co-cultures recapitulates phenotypic features of disease progression. *Biomaterials*, 78, pp.50–61.
- Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A. M., & Chai, W., 2002. Oligosaccharide *microarrays* for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nature Biotechnology*, 20(10), pp.1011–1017.
- Geissmann, F., *et al.*, 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), pp.656-661
- Gyorgy, A. B., *et al.*, 2010. Reverse phase protein microarray technology in traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 192(1), pp.96–101.
- Hanash, S., & Schliekelman, M., 2014. Proteomic profiling of the tumor microenvironment: Recent insights and the search for biomarkers. *Genome Medicine*, 6(2), pp.1–12.
- Harazono, A., *et al.*, 2006. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 348(2), pp. 259–268.
- Heimburg-Molinaro, J., *et al.*, 2011. Preparation and analysis of glycan *microarrays*. *Current Protocols in Protein Science*, pp.1-33
- Hirt, C., *et al.*, 2015. Bioreactor-engineered cancer tissue-like structures mimic phenotypes, gene expression profiles and drug resistance patterns observed “in vivo.” *Biomaterials*, 62, pp.138–146.
- Houseman, B. T., Gawalt, E. S., & Mrksich, M., 2003. Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips. *Langmuir*, 19(5), pp.1522–1531.
- Huang, Y., *et al.*, 2017. Isolation of Fibroblast-Activation Protein-Specific Cancer-Associated Fibroblasts. *Hindawi*, 2017, pp.1-8

- Hyun, J. Y., Pai, J., & Shin, I., 2017. The Glycan Microarray Story from Construction to Applications. *Accounts of Chemical Research*, 50(4), pp.1069–1078.
- Ju, T., *et al.*, 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Research*, 68(6), pp.1636–1646.
- Julien, S., *et al.*, 2006. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*, 16(1), pp.54–64.
- Julien, S., *et al.*, 2009. Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *British Journal of Cancer*, 100(11), pp.1746–1754.
- Julien, S., Videira, P. A., & Delannoy, P., 2012. Sialyl-Tn in cancer: (How) did we miss the target? *Biomolecules*, 2(4), pp.435–466.
- Kalluri, R., & Zeisberg, M., 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), pp.92–401.
- Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K., & Izawa, M., 2008. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants-Hakomori's concepts revisited. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(3), pp.525–531.
- Kim, K. J., *et al.*, 2015. Prognostic implication of M2 macrophages are determined by the proportional balance of tumor associated macrophages and tumor infiltrating lymphocytes in microsatellite-unstable gastric carcinoma. *PLoS ONE*, 10(12), pp.1–24.
- Koh, Y. W., *et al.*, 2013. Expression of Lewis X Is Associated With Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 139(6), pp.746–753.
- Krug, L. M., *et al.*, 2007. Targeting Lewis Y (Ley) in small cell lung cancer with a humanized monoclonal antibody, hu3S193: A pilot trial testing two dose levels. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(10), pp.947–952.
- Kudelka, M. R., *et al.*, 2015. Simple sugars to complex disease-mucin-type O-glycans in cancer. *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 126). Elsevier Inc. pp.53-135
- Kurtenkov, O., & Klaamas, K., 2015 . Increased Avidity of the Sambucus nigra Lectin-Reactive Antibodies to the Thomsen-Friedenreich Antigen as a Potential Biomarker for Gastric Cancer. *Disease Markers*, 2015, pp. 25–27
- Liu, Y., *et al.*, 2007. Neoglycolipid Probes Prepared via Oxime Ligation for Microarray Analysis of Oligosaccharide-Protein Interactions. *Chemistry and Biology*, 14(7), pp.847–859.

- Liu, Y., Palma, A. S., & Feizi, T., 2009. Carbohydrate *microarrays*: Key developments in glycobiology. *Biological Chemistry*, 390(7), pp.647–656.
- Liao, X., *et al.*, 2016. Probing into the Interaction of Nicotine and Bovine Submaxillary Mucin: NMR, Fluorescence, and FTIR Approaches. *Journal of Spectroscopy*, 2016, pp. 1–10.
- Loureiro, L. R., *et al.*, 2015. Challenges in antibody development against Tn and sialyl-Tn antigens. *Biomolecules*, 5(3), pp.1783–1809.
- Luo, Y., *et al.*, 2006. JCI - Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer, 116(8), pp.1-8
- MacAuley, M. S., Crocker, P. R., & Paulson, J. C., 2014. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), pp.653–666.
- Madar, S., Goldstein, I., & Rotter, V., 2013. “Cancer associated fibroblasts” - more than meets the eye. *Trends in Molecular Medicine*, 19(8), pp. 447–453.
- Malpique, R., *et al.*, 2010. Alginate Encapsulation as a Novel Strategy for the Cryopreservation of Neurospheres. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(5), pp.965–977.
- Mantovani, A., *et al.*, 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), pp.399–416.
- Mantovani, A., *et al.*, 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), pp.677–686.
- Maureen, T. and Kurt, D. (2011). Concepts of glycobiology. In OXFORD University Press (Ed.), *Introduction to Glycobiology* (Third Edit, pp. 3–16). New York
- Maureen, T. and Kurt, D. (2011a). N-linked glycosylation. In OXFORD University Press (Ed.), *Introduction to Glycobiology* (Third Edit, pp. 17–32). New York
- Maureen, T. and Kurt, D. (2011b). O-linked glycosylation. In OXFORD University Press (Ed.), *Introduction to Glycobiology* (Third Edit, pp. 33–50). New York
- Miles, D., *et al.*, 2011. Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*, 16(8), pp.1092–1100.
- Mulloy, B., *et al.*, (2009) Structural Analysis of Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium og Glycobiology Editors., California.

- Munkley, J. (2016). The role of sialyl-Tn in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), pp.1-9
- Nallar, S. C., & Kalvakolanu, D. V., 2017. GRIM-19: A master regulator of cytokine induced tumor suppression, metastasis and energy metabolism. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 33, pp.1–18.
- Nishida, N., *et al.*, 2006. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), pp.213–219.
- Nowsheen, S., *et al.*, 2012. HER2 overexpression renders human breast cancers sensitive to PARP inhibition independently of any defect in homologous recombination DNA repair. *Cancer Research*, 72(18), pp. 4796–4806.
- Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y. X., & Olopade, O. I., 2013. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International Journal of Oncology*, 43(1), pp.5–12.
- Ohta, M., *et al.*, 2010. Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(4), pp.663–669.
- Palma, A. S., *et al.*, 2014. The neoglycolipid (NGL)-based oligosaccharide microarray system poised to decipher the meta-glycome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 18(1), pp.87–94.
- Palma, A. S., *et al.*, 2015. Unravelling Glucan Recognition Systems by Glycome *Microarrays* Using the Designer Approach and Mass Spectrometry. *MCP Papers in Press. Published On*, (5), pp.3105–3117.
- Park, S., *et al.*, 2004. Carbohydrate Chips for Studying High-Throughput Carbohydrate-Protein Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 126(15), pp.4812–4819.
- Park, S., Lee, M. R., & Shin, I., 2007. Fabrication of carbohydrate chips and their use to probe protein-carbohydrate interactions. *Nature Protocols*, 2(11), pp.2747–2758.
- Park, S., Lee, M. R., & Shin, I., 2008. Carbohydrate *microarrays* as powerful tools in studies of carbohydrate-mediated biological processes. *Chemical Communications*, (37), pp.4389–4399.
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, 15(9), pp.540–555.

- Reis, C. A., *et al.*, 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology*, 63(4), pp.322–329.
- Rillahan, C. D., & Paulson, J. C., 2011. Glycan *Microarrays* for Decoding the Glycome. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), pp.797–823.
- Salem, M. S. Z. (2015). Cancer: Some genetic considerations. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 16(1), pp.1–10.
- Schauer, R., *et al.*, 2000. Achievements and Challenges of Sialic Acid Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconjugate Journal*, 17(1), pp.485-499
- Schiffmann, L., *et al.*, 2012. A novel sialyl LeX expression score as a potential prognostic tool in colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 10(1), pp95.
- Schnaar, R. L., 2015. Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), pp.609–615.
- Schultz, M. J., Swindall, A. F., & Bellis, S. L., 2012. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3–4), pp.501–518.
- Sevecka, M., *et al.*, 2011. Lysate *microarrays* enable high-throughput, quantitative investigations of cellular signaling. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(4), M110.005363.
- Smart, C. E., *et al.*, 2013. In Vitro Analysis of Breast Cancer Cell Line Tumourspheres and Primary Human Breast Epithelia Mammospheres Demonstrates Inter- and Intrasphere Heterogeneity. *PLoS ONE*, 8(6), pp.1-6
- Stahler, M., *et al.*, 2009. Carcinoma of the collecting ducts of Bellini of the kidney: Adjuvant chemotherapy followed by multikinase inhibition with sunitinib. *Clinical Genitourinary Cancer*, 7(1), pp. 58–61.
- Subik, K., *et al.*, 2010. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4(1), pp. 35–41.
- Sperandio, M., 2006. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS Journal*, 273(19), pp.4377–4389.
- Spiro, R. G., 2002. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), pp.1-14

- Stanley, P., & Cummings, R. D., 2009. Structures Common to Different Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium of Glycobiology Editors., California.
- Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D., 2015. Protein Glycosylation in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), pp.473–510.
- Takamiya, R., *et al.*, 2012. The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. *Glycobiology*, 23(2), pp.178–187.
- Tang, X., 2013. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Letters*, 332(1), pp.3–10.
- Taylor, P. R., *et al.*, 2005. The mannose receptor: Linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in Immunology*, 26(2), pp.104–110.
- Tomioka, Y., *et al.*, 2014. A soluble form of Siglec-9 provides an antitumor benefit against mammary tumor cells expressing MUC1 in transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), pp.532–537.
- Varki, A., 2016. Biological Role of Glycans. *Invited Review for Glycobiology*, (858), pp. 1-133
- Varki, A., *et al.*, 2009. Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics*, 9(24), pp.5398–5399.
- Varki, A., & Lowe, J. B., 2009. Biological Roles of Glycans. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium of Glycobiology Editors., California.
- Varki, A., & Schauer, R., 2009. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium of Glycobiology Editors., California.
- Varki, A., & Sharon, N., 2009. *Historical Background and Overview*. In *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Consortium of Glycobiology Editors., California.
- Wang, D., *et al.*, 2002. Carbohydrate *microarrays* for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells, pp.2-8.
- Wang, D., *et al.*, 2015. Carbohydrate *microarrays*. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, pp.1441–1466.
- Weigelt, B., Ghajar, C. M., & Bissell, M. J., 2014. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69–70(2013), pp.42–51.

- Wan, F.-P., *et al.*, 2017. Endomorphin-2 Inhibition of Substance P Signaling within Lamina I of the Spinal Cord Is Impaired in Diabetic Neuropathic Pain Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(January), pp.1–16.
- Wang, K., *et al.*, 2016. Identification of novel o-linked glycosylated toxoplasma proteins by vicia villosa lectin chromatography. *PLoS ONE*, 11(3), pp.1–16.
- Zhang, J. Q., *et al.*, 2000. Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), pp.22121–22126.

Anexos

Anexo I - Condições do ensaio: Estudo de especificidade de Siglec-15

Tabela Suplementar 1 - Esquematização de todas as condições utilizadas no ensaio de especificidade de Siglec-15 utilizando hSiglec-15-Fc WT e mutante (Boehringer Ingelheim), h-Siglec-15-Fc (R&D) e anticorpo anti-STn

	a	b
1	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>hSiglec-15-Fc</u> Referência: R&D 9227-SL (21/10/17), (200 µg/mL) Concentração: 5 µg/mL Pré-complexo: Não Anticorpo: anti-IgG Humano, biotilado (3 ug/mL) Solução de bloqueio/Diluyente: 0.02% Caseína, 1% BSA em PBS Localização: -80°C</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>hSiglec-15-Fc</u> R&D 9227-SL (21/10/17), (200 µg/mL) 5 µg/mL Não anti-IgG Humano, biotilado (3 ug/mL) 0.02% Caseína, 1% BSA em PBS -80°C</p>
2	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>hSiglec-15-Fc WT</u> Referência: (P.Crocker, 12/17) [740 µg/mL] Concentração: 5 µg/mL Pré-complexo: Não Anticorpo: anti-IgG Humano, biotilado (3 ug/mL) Solução de bloqueio/Diluyente: 0.02% Caseína, 1% BSA em PBS Localização: -20°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>hSiglec-15-Fc WT</u> (P.Crocker, 12/17) [740 µg/mL] 5 µg/mL Não anti-IgG Humano, biotilado (3 ug/mL) 0.02% Caseína, 1% BSA em PBS -20°C Lab.415</p>
3	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>anticorpo 3F1 STn</u> Referência: SBH Sciences (P.Crocker 12/17) Concentração: 1:250 Pré-complexo: No Anticorpo: anti-IgG produzido em rato, biotilado, Sigma (1:300) Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: 4°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>anticorpo 3F1 STn</u> SBH Sciences (P.Crocker 12/17) 1:250 No anti-IgG produzido em rato, biotilado, Sigma (1:300) 2% BSA em PBS 4°C Lab.415</p>
4	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>anticorpo 3F1 STn</u> Referência: SBH Sciences (P.Crocker 12/17) Concentração: 1:50 Pré-complexo: No Anticorpo: anti-IgG produzido em rato, biotilado, Sigma (1:300) Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: 4°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>anticorpo 3F1 STn</u> SBH Sciences (P.Crocker 12/17) 1:50 No anti-IgG produzido em rato, biotilado, Sigma (1:300) 2% BSA em PBS 4°C Lab.415</p>
5	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>hSiglec-15-Fc WT</u> Referência: (P.Crocker, 12/17), (740 µg/mL) Concentração: 2 µg/mL Pré-complexo: Sim 1:1 (preparação diferente) Anticorpo: anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: -20°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>hSiglec-15-Fc WT</u> (P.Crocker, 12/17), (740 µg/mL) 2 µg/mL Sim 1:1 (preparação diferente) anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) 2% BSA em PBS -20°C Lab.415</p>
6	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>hSiglec-15-Fc R143A</u> Referência: (P.Crocker, 12/17), (230 µg/mL) Concentração: 2 µg/mL Pré-complexo: Yes 1:1 (preparação diferente) Anticorpo: anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: -20°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set B</i> <u>hSiglec-15-Fc R143A</u> (P.Crocker, 12/17), (230 µg/mL) 2 µg/mL Yes 1:1 (preparação diferente) anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) 2% BSA em PBS -20°C Lab.415</p>
7	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>hSiglec-15-Fc</u>, (200 µg/mL) Referência: R&D 9227-SL (21/10/17) Concentração: 2 µg/mL Pré-complexo: Sim 1:1 (preparação diferente) Anticorpo: anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: -20°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set 3</i> <u>hSiglec-15-Fc</u>, (200 µg/mL) R&D 9227-SL (21/10/17) 2 µg/mL Sim 1:1 (preparação diferente) anti-IgG Humano, biotilado (2 µg/mL) 2% BSA em PBS -20°C Lab.415</p>
8	<p><i>Set:</i> Proteína: <u>Anticorpo anti-IgG Humano biotilado</u> Referência: Vector Lab, (1500 µg/mL) Concentração: 2 µg/mL Pré-complexo: Não Anticorpo: Não aplicável Solução de bloqueio/Diluyente: 2% BSA em PBS Localização: 4°C Lab.415</p>	<p><i>DHPA set 3</i> <u>Anticorpo anti-IgG humano biotilado</u> Vector Lab, (1500 µg/mL) 2 µg/mL Não Não aplicável 2% BSA em PBS 4°C Lab.415</p>

Anexo II - Protocolo: Ensaio de extratos celulares em *microarrays* com 16 blocos de nitrocelulose

1. Validar *slides* por meio da digitalização Cy3 (comprimento de onda de 532nm, 10 μ m de resolução, 5-10% de intensidade de *laser* e 350 PMT de ganho);
2. Centrifugar as amostras 3 minutos a 14 x g;
3. Montar *slides* nos suportes com marcas alinhadas;
4. Preparar as soluções necessárias;
5. Humedecer os blocos de nitrocelulose com 150 μ L de H₂O Milli-Q;
6. Remover, adicionar 150 μ L de Solução de Bloqueio e incubar 60 minutos;
7. Remover e adicionar 150 μ L de Tampão de Lavagem;
8. Remover 1 a 1, adicionar 90 μ L de amostra e incubar 90 minutos;
9. Preparar os respectivos anticorpos;
10. Remover amostra e lavar 4 vezes com 150 μ L de tampão de lavagem;
11. Adicionar 90 μ L de anticorpo secundário e incubar 60 minutos;
12. Preparar a streptavidina e reservar protegida de contacto direto com a luz;
13. Remover anticorpos e lavar 4 vezes com 150 μ L de tampão de lavagem;
14. Adicionar 100 μ L de streptavidina conjugada com Alexa e incubar 45 minutos;
15. Remover e lavar 3 vezes com 150 μ L de tampão de lavagem;
16. Remover e lavar 2 vezes com 150 μ L de H₂O Milli-Q;
17. Retirar os *slides* dos suportes;
18. Secar durante 2 minutos em centrifuga de *slides*;
19. Guardar em local protegido da luz durante 10 minutos;
20. Realizar a digitalização Alexa-Fluor-647 (comprimento de onda de 635nm, 10 μ m de resolução, 5-90% de intensidade de *laser* e 350 PMT de ganho).

Anexo III – Matriz de resultados proveniente do ensaio de especificidade de Siglec-15

Nome da sonda:	Posição no gráfico	Intensidade de ligação relativa:				Sequência da sonda:
		hSiglec-15 R&D-Fc	hSiglec-15 WT-Fc	hSiglec-15 R143A-Fc	anti-STn (3F1)	
Gal-DA	1	-	-	-	-	Galβ-O-C2-NX-DA
Gal-Ph-DA	2	-	-	-	-	Galβ-O-Ph-NH-DA
Glc-DA	3	-	-	-	-	Glcβ-O-C2-NX-DA
Lac-DA	4	-	-	-	-	Galβ-4Glcβ-O-C2-NX-DA
2'FL-Gly-DA	5	-	-	-	-	Fucaa-2Galβ-4Glc-NH-Gly-NH-DA Galα-3Galβ-O-C3-NX-DA
B-tri-DA	6	-	-	-	-	Fucaa-2
3'SA-Lac-DA	7	824,5	-	-	-	NeuAcα-3Galβ-4Glcβ-O-C3-NX-DA
3'SA-Lac-Gly-DA	8	5549,5	1451	-	-	NeuAcα-3Galβ-4Glcβ-NH-Gly-NH-DA
6'SA-Lac-Gly-DA	9	1914,5	450,5	-	-	NeuAcα-6Galβ-4Glcβ-NH-Gly-NH-DA
LNFP 1-Gly-DA	10	-	-	-	-	Fucaa-2Galβ-3GlcNAcβ-3Galβ-4Glc-NH-Gly-NH-DA Galβ-3GlcNAcβ-3Galβ-4Glcβ-NH-Gly-NH-DA
LSTb-Gly-DA	11	14469,5	4765,5	-	-	NeuAcα-6
DSLNT-Gly-DA	12	13341,5	4597	-	-	NeuAcα-3Galβ-3GlcNAcβ-3Galβ-4Glcβ-NH-Gly-NH-DA NeuAcα-6 Galβ-4(Fucaa-3)GlcNAcβ-6 Galβ-4Glcβ-NH-Gly-NH-DA
DSMFLNH-Gly-DA	13	15630	6347	759	-	NeuAcα-3Galβ-3(NeuAcα-6)GlcNAcβ-3
ChitoBiase-Gly-DA	14	-	-	-	-	GlcNAcβ-4GlcNAcβ-NH-Gly-NH-DA GlcNAcβ-NH-Gly-NH-DA
Fuc(3)GlcNAc-Gly-DA	15	-	-	-	-	Fucaa-3
Fuc(6)GlcNAc-Gly-DA	16	-	-	-	-	Fucaa-6GlcNAcβ-NH-Gly-NH-DA Fucaa-6GlcNAcβ-NH-Gly-NH-DA
DFuc(3,6)GlcNAc-Gly-DA	17	-	-	-	-	Fucaa-3
Man5-Gly-DA	18	-	-	-	-	Manα-6Manα-6Manβ-4GlcNAcβ-4GlcNAc-NH-Gly-NH-DA Manα-3 Manα-3
Man6-Gly-DA	19	-	-	-	-	Manα-6(Manα-3)Manα-6Manβ-4GlcNAcβ-4GlcNAc-NH-Gly-NH-DA Manα-2Manα-3
NA2-Gly-DA	20	-	-	-	-	Galβ-4GlcNAcβ-2Manα-6 Manβ-4GlcNAcβ-4GlcNAc-NH-Gly-NH-DA Galβ-4GlcNAcβ-2Manα-3
NA2F-Gly-DA	21	-	-	-	-	Galβ-4GlcNAcβ-2Manα-6 Manβ-4GlcNAcβ-4GlcNAc-NH-Gly-NH-DA Fucaa-6
SM1a-DA	22	-	-	-	-	Galβ-3GalNAcβ-4Galβ-4Glcβ-O-C3-NH-DA SU-3
SM1a(2S)-DA	23	-	-	-	-	SU-2
GalNAcα-ON-DA	24	-	-	-	-	GalNAcα-O-N=DA
GalNAcα-Ser-DA	25	-	-	-	-	GalNAcα-O-Ser-NH-DA
GalNAcα-Thr-DA	26	-	-	-	-	GalNAcα-O-Thr-NH-DA
GalNAcβ-Ser-DA	27	-	-	-	-	GalNAcβ-O-Ser-NH-DA
GalNAcβ-Thr-DA	28	-	-	-	-	GalNAcβ-O-Thr-NH-DA
GlcNAcβ-Ser-DA	29	-	-	-	-	GlcNAcβ-O-Ser-NH-DA
GlcNAcβ-Thr-DA	30	-	-	-	-	GlcNAcβ-O-Thr-NH-DA
STn-Ser-DA	31	4928,5	1686,5	410	2537,5	NeuAcα-6GalNAcα-O-Ser-NH-DA
STn-Thr-DA	32	1698,5	543	-	344	NeuAcα-6GalNAcα-O-Thr-NH-DA
Core 1-Ser-DA	33	-	-	-	-	Galβ-3GalNAcα-O-Ser-NH-DA
Core 1-Thr-DA	34	-	-	-	-	Galβ-3GalNAcα-O-Thr-NH-DA
SA1(2-3)-Core 1-Ser-DA	35	-	-	-	-	NeuAcα-3Galβ-3GalNAcα-O-Ser-NH-DA
SA1(2-3)-Core 1-Thr-DA	36	1672	852	-	-	NeuAcα-3Galβ-3GalNAcα-O-Thr-NH-DA Galβ-3GalNAcα-O-Ser-NH-DA
SA1(2-6)-Core 1-Ser-DA	37	81	-	-	-	NeuAcα-6 Galβ-3GalNAcα-O-Thr-NH-DA
SA1(2-6)-Core 1-Thr-DA	38	279	223,5	-	-	NeuAcα-6
SA2-Core 1-Ser-DA	39	2218	748	-	-	NeuAcα-3Galβ-3GalNAcα-O-Ser-NH-DA NeuAcα-6
SA2-Core 1-Thr-DA	40	778	435,5	-	-	NeuAcα-3Galβ-3GalNAcα-O-Thr-NH-DA NeuAcα-6

Anexo IV – Esquema de impressão de extratos e controlos em *slide* constituído por 2 blocos de nitrocelulose

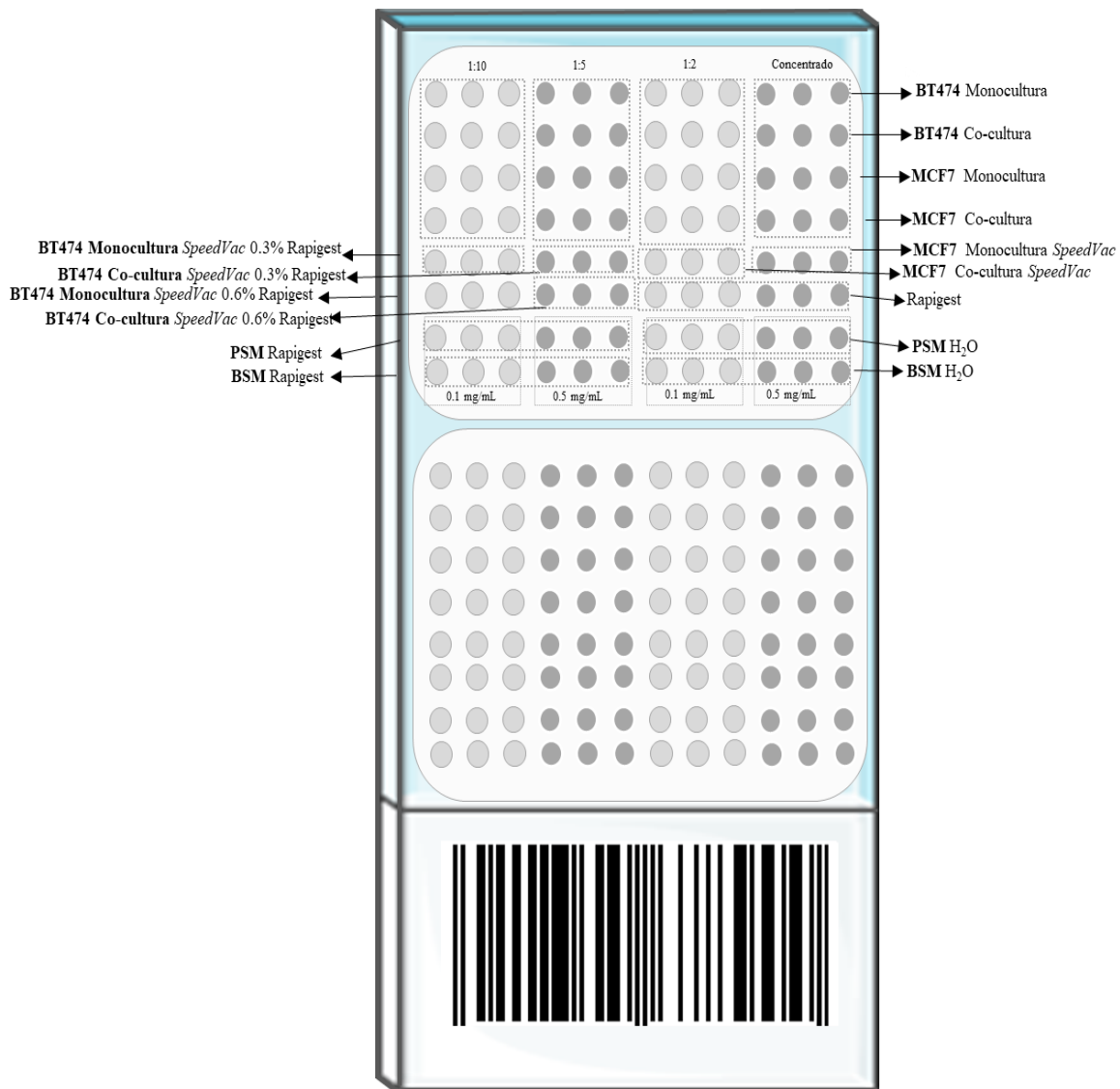


Figura Suplementar 2 - Disposição de amostras após impressão com recurso a *arrayer* manual em *slide* constituído por 2 blocos de nitrocelulose sendo que cada bloco apresenta a mesma ordem de impressão. Cada extrato celular, MCF7 e BT474 mo e co-cultura, imobilizado em triplicado mediante diluição (1:10, 1:5 e 1:2). Controlos imobilizados também em triplicado a concentrações de 0.1 mg/mL e 0.5 mg/mL.

Anexo V - Protocolo: Ensaio de extratos celulares em *microarrays* com 2 blocos de nitrocelulose

1. Validar *slides* Cy3 (comprimento de onda de 532 nm e 10% de intensidade de *laser*) e Alexa-Fluor-647 (comprimento de onda de 635nm e 100% de intensidade de *laser*);
2. Preparar as soluções necessárias (Lavagem e bloqueio/diluente);
3. Preparar caixa de *petri* com forrada com *parafilm* e com um pedaço de papel humedecido em H₂O Milli-Q. Introduzir os *slides* na caixa;
4. Humedecer os blocos de nitrocelulose com 500 µL de H₂O Milli-Q;
5. Remover a H₂O, por inclinação da caixa de *petri* e secar bem com papel cuidadosamente para não danificar a nitrocelulose. Adicionar 500 µL de Solução de Bloqueio e incubar 60 minutos;
6. Centrifugar o *stock* de proteínas/anticorpos 2 minutos a 14 x g e preparar as diluições a testar;
7. Remover a solução de bloqueio, adicionar 400 µL de Amostra (proteína/anticorpo) e incubar 90 minutos;
8. Preparar o(s) anticorpo(s): Centrifugar o *stock* de anticorpo(s) 2 minutos a 14.5 rpm e preparar as diluições;
9. Remover amostra e lavar 4 vezes com 500 µL de Solução de Lavagem;
10. Adicionar 400 µL de Anticorpos e incubar 60 minutos;
11. Preparar a streptavidina conjugada com Alexa e reservar protegida da luz;
12. Remover anticorpos e repetir o passo 9.;
13. Adicionar 500 µL de Streptavidina conjugada com Alexa e incubar 45 minutos;
14. Remover e repetir passo 9.;
15. Mergulhar o(s) *slide(s)* 1 vez em H₂O Milli-Q;
16. Secar durante 4 minutos em centrifuga de *slides*;
17. Guardar em local protegido da luz durante 10 minutos;
18. Realizar a digitalização Alexa-Fluor-647 (comprimento de onda de 635nm, 10 µm de resolução, 5-100% de intensidade de *laser* e 350 PMT de ganho).

Nota: As amostras, anticorpo e streptavidina são ambos preparados na Solução de Bloqueio.