



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

**"IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GLICOSILADOS  
EN LÍNEA CELULAR DE CÁNCER PULMONAR"**

### **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**

**P R E S E N T A**

**Q.F.B. DAVID GARCÍA HERRERA**

**DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. PATRICIA SOFÍA GOROCICA ROSETE**

**MÉXICO, D.F.**

**FEBRERO, 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GLICOSILADOS EN LÍNEA CELULAR DE CÁNCER PULMONAR**

**QFB. DAVID GARCIA HERRERA**

**Directora de Tesis:**

**DRA. PATRICIA SOFIA GOROCICA ROSETE**

*“Una vida sin errores, sin tropiezos,  
sin fracasos, es sin duda una vida a medias,  
porque significa que no se intentó nunca nada...”*

## **DEDICATORIA**

A **DIOS** por haberme concedido la maravilla de la vida y permitirme disfrutarla.

Con todo mi **AMOR** a mi esposa **TERE**  
por su comprensión, amor y mi gran apoyo.

A mis hijas: **ERANDI TERESA** y **LAURA YOLOTZIN**  
que han sido motores de mi vida.  
Gracias a DIOS

A mis padres: **MARÍA REMEDIOS HERRERA MORALES**  
**JUAN GARCÍA LÓPEZ (†)**  
Por su ejemplo tenaz y de amor.

A mis **HERMANOS**, por la dicha de tenerlos.

Como testimonio de gratitud a todas las personas  
Que a lo largo de mi vida he conocido y que han sido presencia de  
Humanidad y Solidaridad.

*“La gratitud viste el alma de quien recibe  
el bien y engrandece a quien lo otorga...”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias “de corazón” Dra. Patricia Gorocica quién dirigió esta tesis, por su valioso tiempo, colaboración, amistad y tolerancia.

Le agradezco mucho Dr. Ricardo Lascurain “Chino” que siempre me apoyo y me brindo su amistad.

A todos los compañeros del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) conocidos y recientes. En especial al Dr. Edgar Zenteno, Dr. Yonathan Garfias y la Dra. Blanca Espinosa.

Agradezco al Dr. Demetrio Bernal y la Lic. Rosario Fernández, del INER, por su valioso apoyo en la desarrollo de la estadística de esta tesis.

Agradezco al Dr. José Sullivan López, Dr. Humberto Ramírez y la Dra. María Eugenia Manjarez, por su valioso apoyo con la donación de las líneas celulares para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también a los compañeros del Laboratorio Clínico del INER.

Gracias al Dr. Rafael Castro y al Dr. Miguel Ángel López del Hospital de Psiquiatría “Dr. Samuel Ramírez Moreno” que me han brindado apoyo en tiempo y animo para la conclusión del presente trabajo.

Gracias a todos los compañeros de trabajo del INER y del Psiquiátrico que he conocido que de una forma u otra he recibido su amistad.

## INDICE

RESUMEN	I
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	10
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPOTESIS	14
V. OBJETIVO GENERAL	14
VI. MATERIALES Y METODOS	15
VII. RESULTADOS	20
VIII. DISCUSIÓN	26
IX. CONCLUSIÓN	30
X. BIBLIOGRAFÍA	31
XI. ANEXO A	37
XII. ANEXO B	39

## RESUMEN

La glicosilación de las proteínas es característica para cada linaje celular, pero dependen también de los estímulos a los que están sujetas las células, por lo que no se puede establecer un patrón de glicosilación general para todas las células. Algunas células neoplásicas presentan de manera temprana alteraciones en el patrón de glicosilación típico para el estirpe celular. Estas alteraciones pueden ser identificadas con lectinas, lo que potencialmente las convierte en una herramienta útil para el diagnóstico de esta patología. Para darle validez a este recurso diagnóstico es necesario tener bien definidos los patrones de glicosilación característicos de cada tipo celular, identificar cualquier variación que presenten las células. Las alteraciones en la glicosilación generalmente son sutiles por lo que es necesario utilizar una técnica muy sensible que permita identificarlas, por lo que este trabajo tiene el objetivo de evaluar la utilidad de la técnica de Cell-ELISA adaptada para el uso con lectinas e identificar estructuras sacarídicas expresadas en líneas celulares tumorales.

La técnica de ELISA se modificó para realizarla en 7 líneas celulares tumorales adheridas a una placa de poliestireno, en las cuales se probaron diferentes métodos de fijación para seleccionar el que mejor resultado proporcionara. Posteriormente las células se marcaron con lectinas acopladas a biotina y se evaluaron. Se encontró que la técnica de Cell-ELISA empleando lectinas es muy sensible, por esta razón se realizaron los ensayos por quintuplicado para disminuir la desviación estándar. Con este trabajo concluimos que la sensibilidad de la técnica es tan alta que las variaciones metodológicas pueden ser eliminadas por métodos automatizados para utilizarla como un recurso diagnóstico eficiente. Se requiere tener un patrón de referencia bien establecido para identificar variaciones en la expresión de moléculas glicosiladas cuando las células están sufriendo modificaciones durante un proceso patológico como la transformación neoplásica.

## I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de cáncer (CA) es una de las principales causas de muerte de los habitantes de ciudades industrializadas (Sermet, 2003). En México, el CA de pulmón junto con el CA de mama y de próstata, ocupa los primeros lugares entre todas las neoplasias del individuo adulto (Rivera, 2002; Alva 2003; Tovar, 2002). En el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, un estudio realizado en 1990 mostró que había una relación directa entre el tabaquismo con el CA de pulmón (Alva, 2003).

Diversos estudios han demostrado que las causas del CA son multifactoriales; intervienen factores endógenos como genéticos e inmunitarios, así como factores exógenos como la dosis y tipo de agentes carcinogénicos (Rivera, 2002; Alva, 2003).

Se han descrito cuatro tipos principales de CA de pulmón basados en la histología. El carcinoma epidermoide o de células escamosas que en México representa el 30% de todos los casos de CA de pulmón, el adenocarcinoma representado en un 30%, el carcinoma de células pequeñas en 25% y el carcinoma de células grandes el 15% (William, 2004).

Solamente el 15% de los casos de CA de pulmón son diagnosticados en estadios iniciales, debido a que cursan asintomáticos y su hallazgo es fortuito. Cuando los síntomas aparecen ya se encuentra en una etapa avanzada y la posibilidad de un tratamiento eficiente se reduce siendo el pronóstico desfavorable para el paciente (Beasley, 2004).

El diagnóstico se realiza conforme al cuadro clínico con apoyo de estudios de gabinete como la radiografía de tórax, pero el valor diagnóstico de estos métodos no es totalmente confiable. Con frecuencia se recurre a métodos más sensibles pero más costosos como la tomografía automatizada computarizada (TAC), el ultrasonido, la resonancia magnética nuclear (NMR) o la tomografía de emisión de positrones (PET). Estos métodos apoyan con imágenes definidas y precisas de las características del tumor y su diseminación, pero definitivamente no dan un diagnóstico exacto. Para confirmar el diagnóstico se utilizan métodos invasivos



como las biopsias, los cuales pueden ocasionar complicaciones en el paciente (Ellis, 2001). Sin embargo lo deseable es que se pueda tener un método diagnóstico eficiente, económico y con la mínima invasión al paciente, pero que también nos permita hacer un diagnóstico temprano y oportuno de esta patología, trascendiendo en el pronóstico de los pacientes, la calidad de vida del mismo y abatir los costos institucionales.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS CARBOHIDRATOS EN CANCER**

### **Papel de los carbohidratos en los procesos neoplásicos**

Existen numerosos reportes acerca de los cambios moleculares que se presentan en las células en las primeras etapas de transformación neoplásica y que pueden ser de utilidad como marcadores tumorales en poblaciones de alto riesgo. La mayoría de los marcadores tumorales hasta ahora identificados, se utilizan principalmente en el seguimiento del paciente y en la evaluación del tratamiento. Entre los principales cambios moleculares están los presentados en moléculas glicosiladas como las proteínas tipo mucinas, los proteoglicanos, las glicoproteínas y los glicolípidos de la superficie celular (Singhal, 1990).

La asociación de estructuras sacarídicas con procesos neoplásicos ha sido ampliamente documentada y algunas de estas estructuras podrían ser utilizadas como marcadores moleculares tempranos para la identificación oportuna de CA (Peracaula, 2008).

Los carbohidratos tienen diversas funciones biológicas, las cuales están asociadas a la comunicación celular, al reconocimiento, protección, señalización intracelular, además de ser utilizados como aporte energético y estructural. Los carbohidratos confieren estabilidad estructural a las moléculas y pueden conformar estructuras con propiedades antigénicas (Dwer, 1996; Housell, 1996). Los carbohidratos pueden encontrarse como monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, además pueden formar parte de estructuras complejas al unirse a proteínas durante los procesos cotraduccionales y postraduccionales o bien a lípidos (Varki, 2009).

En el caso de las proteínas pueden haber 3 tipos de glicosilación, la N, la O y la C glicosilación (figura A). La N-glicosilación es un proceso cotraduccional que se realiza en el lumen del retículo endoplasmico con la unión de un hidroxilo (OH-) de la N-Acetil-Glucosamina (GlcNac) con el grupo amino (NH<sub>2</sub>-) de un residuo de Asparagina (Asn) de una proteína en el sitio donde tenga una secuencia Asp-X-Ser/Thr, donde X es cualquier otro residuo de aminoácido (Suzuki, 1995). En cambio la O-glicosilación es un proceso postraduccional que se lleva a cabo en el aparato de Golgi, en el cual un OH- de la de N-Acetil-Galactosamina (GalNac) con el OH- de residuos de Serina (Ser) o de Treonina (Thr) dentro de una secuencia señal formada por Prolina (Pro)-X-Ser/Thr. Existe un tercer tipo de glicosilación pobremente estudiada, la cual se denomina C-glicosilación, ésta se realiza tanto en el retículo endoplásmico como en el citosol y consiste en la unión de moléculas de aldohexosas como glucosa (Glc) o manosa (Man) al carbono 2 del Triptofano (Trp) en la secuencia señal Trp-X-X-Trp (Varki, 2009; Housell, 1996). La figura A hace una descripción de los tipos de enlaces de oligosacáridos a proteínas.

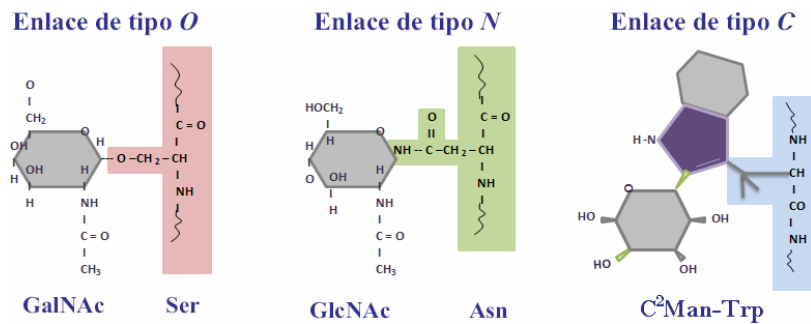


Figura A. **Tipos de enlace de oligosacáridos a proteínas.** Enlace tipo O donde la N-Acetil-Galactosamina (GalNac) es unida a residuos de Serina o Treonina. Enlace tipo N, en el cual la N-Acetil-Glucosamina (GlcNac) es unida a un residuo de Asparagina. Enlace tipo C donde la Manosa es unida al Carbono 2 de un residuo de Triptofano (C<sup>2</sup>Man-Trp). (Freire, 2002)

La unión de los carbohidratos al residuo de aminoácido de una proteína es catalizada por las enzimas glicosiltransferasas, las cuales se pueden clasificar en

familias de acuerdo a las similitudes en sus secuencias que reflejan su carácter enzimático. Las cadenas de oligosacáridos se ramifican a través de la acción coordinada de las glicosiltransferasas específicas. La expresión y activación de las glicosiltransferasas es extremadamente sensible acorde al estímulo que recibe la célula: Como consecuencia, la unión específica de carbohidratos a una proteína depende del tipo celular y del estado fisiológico celular (Chandrasekaran, 2006).

En la O-glicosilación, la adición del primer GalNAc a un residuo de Thr o Ser da origen a la estructura denominada antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Th)(Hounsell, 1996). Esta es la estructura base a partir de la cual se forman las diversas estructuras O-glicosiladas. Cada estructura O-glicosídica se caracteriza por el tipo de enzimas glicosiltransferasas específicas que participa en su biosíntesis y esto da lugar a 8 diferentes núcleos sacarídicos o estructuras centrales denominadas "core". A partir de los cores o núcleos, las cadenas sacarídicas se elongan o ramifican dando como resultado estructuras más complejas (Van den Steen, 1998; Varki, 2009). Por ejemplo, el core 1 se constituye por la adición de un residuo de galactosa (Gal) en enlace  $\beta$ 1,3 a la GalNAc del antígeno Tn. La enzima que cataliza la reacción es la  $\beta$ 1,3 galactosiltransferasa y la estructura resultante es la Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr, la cual se denomina antígeno TF o de Thomsen-Friedenreich. La adición de GlcNAc al core 1 mediante la acción de otra glicosiltransferasa forma el core 2. El core 3 se sintetiza por la adición de GlcNAc en unión  $\beta$ 1,3 al antígeno Tn. El core 3 se convierte en core 4 cuando se le adiciona otra molécula GalNAc (Brockhausen, 1999). Estas cuatro estructuras derivadas de los core de los O-glicanos son las que se sintetizan principalmente en células eucariotas (Figura B). Cabe mencionar que la mayoría de los O-glicanos expresados en la superficie de los leucocitos tienen core 2 (Brockhausen, 1999).

Cuando al antígeno Tn se le une ácido siálico por medio de una sialiltransferasa se forma la molécula sialil-Tn (NeuAc $\alpha$ 2,6GalNAc-O-Ser/Thr). El ácido siálico está presente normalmente como residuo terminal de oligosacáridos en la superficie de células de animales vertebrados. Particularmente, se ha observado que en células neoplásicas de animales mamíferos suele haber una modificación del ácido siálico

terminal. Por ejemplo, se puede encontrar una molécula ester *O*-acetilada en el grupo hidroxil-sialil-Tn ( $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{R}$ ) y se le considera como un posible marcador para el diagnóstico en neoplasias como en el caso de CA de pulmón (Brockhausen I, 1999). Las modificaciones en los carbohidratos afectan significativamente las propiedades fisicoquímicas de la molécula sobre la que se expresa el ácido siálico y pueden entonces modificar o crear nuevos marcadores de reconocimiento o servir como determinantes antigénicos (epítomos) o como glicotopos.

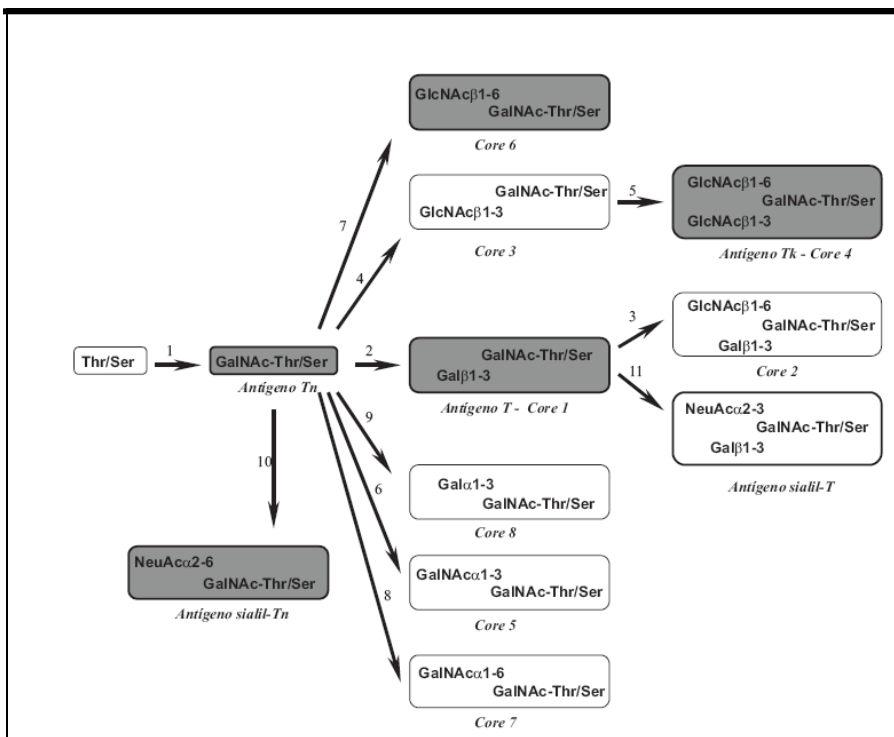


Figura B. **Biosíntesis de “cores” en O-glicanos.** La reacción inicial de la O-glicosilación es la adición de GalNAc a residuos de Serina o Treonina de una proteína. Estas estructuras pueden ser modificadas por galactosilación, sialilación, fucosilación o sulfatación (Freire T, 2002).

Otras estructuras celulares como las mucinas, comparten enlaces tanto O- como N-glicosiladas (figura C). Entre las alteraciones moleculares más importantes de las células cancerosas, se encuentra la expresión modificada de antígenos O-glicosilados (Brockhausen, 1999; Peracaula, 2008). Esta identificación ha

constituido la base de diferentes procedimientos de diagnóstico oncológico y está siendo evaluada en protocolos de inmunoterapia activa específica de cáncer (Danishefsky, 2000).

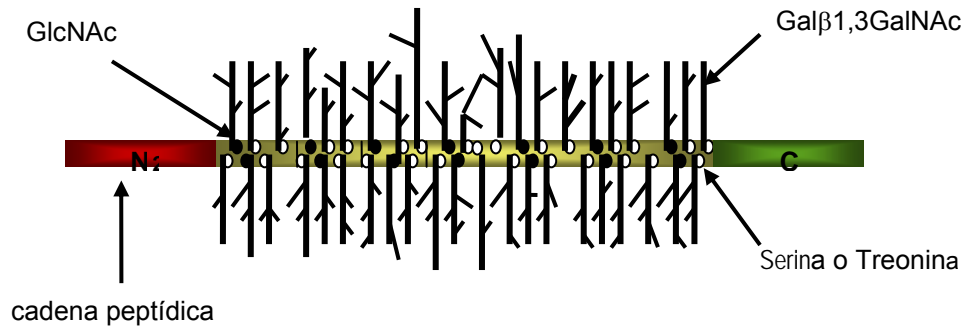


Figura C. **Estructura básica de una proteína tipo mucina** (Rose, 2006)

Las modificaciones en las estructuras sacarídicas pueden ser diversas. Por ejemplo, síntesis incompleta, acumulación de precursores, neosíntesis, así como cambios en la organización de carbohidratos de membrana (Singhal, 1990) (cuadro 1). Estas alteraciones generan estructuras con nuevas características antigénicas, entre las más conocidas y mejor estudiadas están las variantes del antígeno Lewis (Le) A, B, X, Y o Z, así como algunas mucinas (Osinaga, 2007; Ugorski, 2002; Croce, 2001). El antígeno Lewis es una glicoproteína que contiene el core 1 y su estructura es  $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc-Fucosa } (\alpha 1.3)\text{-}\rightarrow\text{O-Ser/Thr}$ . Los antígenos Lewis se expresan de manera normal en la superficie de leucocitos y en células endoteliales. Estos antígenos participan en la interacción celular durante la reacción inflamatoria en la fase de reclutamiento leucocitario. Cuando estos antígenos se expresan en células diferentes a los leucocitos, con frecuencia se encuentran asociados a procesos patológicos como el CA (Ugorski, 2002; Ishikawa, 1997) y aumentan su expresión en relación al progreso del tumor (Kawaguchi, 2007). Por ello se han utilizado como marcadores moleculares con fines de pronóstico y de seguimiento del tumor. La variante del antígeno Lewis con ácido siálico denominada Sialil-Lewis (Sia-Le) puede presentar dos isotipos estructurales: Sialil-Lewis X ( $\text{Le}^x$ ) cuya estructura es  $5\text{NeuAc } \alpha 2\text{-}\rightarrow 3 \text{Gal}$  y Sialil-

Lewis A (Sia-Le<sup>a</sup>) que corresponde a 5NeuAc $\beta$ 1-3 (Fuc $\alpha$ 1-3) GalNAc-R (Ugorski, 2002).

#### Cuadro 1. Cambios en carbohidratos asociados a cáncer

<p><b>Síntesis incompleta (bloqueo), acumulación de precursores</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Glangliósidos GM<sub>2</sub>, GD<sub>2</sub> y GD<sub>3</sub> en melanoma y neuroblastoma.</li><li>b) Expresión de glicoproteínas conteniendo antígenos Tn y T en varios adenocarcinomas.</li></ul> <p><b>Neosíntesis</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) Lacto-series de carbohidratos poliméricos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, sia-Le<sup>x</sup> y sia-Le<sup>a</sup> en adenocarcinomas.</li><li>b) Globosido Gb3 en linfoma de Burkits.</li><li>c) Sialil-Tn en adenocarcinoma.</li></ul> <p><b>Cambios de organización de carbohidratos de membrana</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a) En la densidad de los carbohidratos.</li><li>b) En la longitud de las cadenas sacarídicas.</li><li>c) En los glicoconjugados adyacentes.</li><li>d) En la composición de ceramidas.</li></ul>
---

(Singhal, 1990)

Los antígenos Le<sup>x</sup> y Sia-Le<sup>x</sup> se expresan en el 80% de CA pulmonar de células no pequeñas y está presente en todas las etapas de diferenciación celular. La expresión de estos antígenos aumenta en las células pobremente diferenciadas inclusive en las de metástasis hacia ganglios linfáticos regionales (Sozzani, 2008). Las células tumorales pueden diseminarse por mecanismos semejantes a los utilizados por los leucocitos durante el proceso inflamatorio. En este proceso participan las variantes Sia-Le<sup>x</sup> y Sia-Le<sup>a</sup>, que utilizan como receptores al CD62E y al CD62P (selectinas E y P, respectivamente) expresados en células endoteliales (Reiji, 2004). La metástasis de las células tumorales a otros tejidos depende de la afinidad de los antígenos tumorales con los receptores específicos de los tejidos invadidos Ugorski, 2002; Kannagi, 2004).

Con respecto a las mucinas, éstas se expresan de manera normal en epitelios y leucocitos y tienen funciones de protección o bien son receptores para algunos agentes infecciosos. Estas moléculas pueden expresarse modificadas con respecto a su glicosilación en procesos inflamatorios o procesos neoplásicos. En la transformación neoplásica, la biosíntesis de mucinas ya sea incompleta o

modificada, expone epítomos que normalmente estaban enmascarados en la molécula. Por lo que ahora esas nuevas estructuras expuestas como el antígeno T o el Tn, interactúan con elementos de la respuesta inmunitaria o bien participan en el mecanismo de metástasis (Springer, 1988, 1989; Srinivasan, 2008).

Con frecuencia el ácido siálico se encuentra en posición terminal en las mucinas (sialomucinas) y tiene un papel crítico en la metástasis (Matsushita, 1990; Kim, 1996). Las mucinas expresadas en cáncer de colon presentan una gran cantidad de epítomos antigénicos glicosilados como el antígeno T, Tn y el sialil Tn (Byrd, 2004).

Se ha reportado en líneas celulares cancerosas, la presencia de glicoproteínas relacionadas con la adhesión celular, la migración y la metástasis. Por ejemplo, una glicoproteína mucinoide de 200 kDa aislada de CA de mama que contiene el oligosacárido 3'Sulfo-Gal $\beta$ 1-3GalNAc-O-Ser/Thr (Chandrasekaran, 2006).

Otro antígeno glicosilado asociado a CA es el antígeno Forssman (GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal1-4Glc-Cer), que fue descrito en 1911 por J. Forssman. El antígeno Forssman es un glicolípido (GalNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ -R) expresado comúnmente en animales, se ha identificado en personas con grupo sanguíneo A y AB, pero en el humano también se asocia a células de CA gástrico y pulmonar (Ono, 1994; Uemura, 1989; Taniguchi, 1981; Wolf, 1986).

Como se ha mencionado, las diferencias en la glicosilación en células neoplásicas pueden ser una herramienta útil para el diagnóstico de cáncer. Aunque no todas pueden ser consideradas como marcador tumoral ideal, sobre todo las que se comparten entre varios tejidos o se expresan bajo determinadas situaciones fisiológicas y no necesariamente en células neoplásicas. Sin embargo, el aumento en la expresión de estas estructuras ya sea en la superficie celular o en forma soluble localizada en fluidos biológicos o asociada a sitios de manera anormal, ayuda a orientar el diagnóstico. No obstante, su verdadero valor diagnóstico radica en asociarlo al cuadro clínico así como a otros criterios de diagnóstico.

Existe una correlación entre la expresión de algunos antígenos tumorales y el grado de evolución del cáncer (Thôm, 2007). Por ejemplo, en pacientes con adenocarcinoma tanto de tubo digestivo como de pulmón, así como en pacientes

con fibrosis pulmonar idiopática, se han identificado concentraciones altas de antígeno Sia-Le<sup>x</sup> (Ugorski, 2002).

La identificación de marcadores glicosilados ha sido empleada en el diagnóstico o pronóstico de diversos cánceres mostrados en el cuadro 2 y en el caso específico de CA pulmonar se muestran en el cuadro 3.

### Cuadro 2. **Marcadores tumorales glicosilados**

Molécula	Asociado a:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alfa-fetoproteína (AFP)</li> <li>• Antígeno carcinoembrionario (CEA)</li> <li>• Antígeno prostático específico (PSA)</li> <li>• Gonadotropina coriónica humana (HCG)</li> <li>• Citoqueratina 19, Cyfra 21-1) y Antígeno específico a carbohidratos (CA 19-9)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer de mama, de pulmón y en algunas leucemias</li> <li>• Cáncer de mama y estómago</li> <li>• Cáncer de próstata</li> <li>• Cáncer de matriz y ovario</li> <li>• Cáncer gástrico y de pulmón</li> </ul>

(Navarro-Romero, 2004)

### Cuadro 3. **Marcadores tumorales asociados a CA pulmonar**

Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)	Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC)
CEA	NSE
TPA,	BN/GRP
SCC-Ag	CK-BB
CYFRA 21-1	NCAM
Ferritina	IL-2R,
CA19-9	IGF-I
CA50	Transferrina
CA242	ANP,
H-K-N-ras mutaciones	mAb (cluster 5)
p53 mutación	

(Niklinski, 1995)



Los altos niveles séricos del Sia-Le<sup>x</sup> correlacionan también con el aumento de CD62E soluble y esta correlación tiene un valor pronóstico aceptable para cáncer de mama, de colón y de pulmón (Takada, 1993).

## II. ANTECEDENTES

### Uso de lectinas para la caracterización de antígenos tumorales

La identificación de marcadores moleculares glicosilados ha sido de gran utilidad para apoyar el diagnóstico diferencial en algunos casos de CA. Sin embargo, hay limitantes metodológicas que impiden una confiabilidad para ser utilizados como el principal recurso diagnóstico en virtud de una concentración sérica baja que no se detecta con las técnicas convencionales y por lo tanto solo son de apoyo a otros recursos de diagnóstico.

En este sentido una alternativa es el uso de lectinas, las cuales son proteínas que comparten en común la propiedad de unirse de forma específica y reversible a carbohidratos ya sean monosacáridos o que formen parte de estructuras más complejas. La especificidad de unión de las lectinas a su ligandos, es comparable con aquélla que presentan los anticuerpos de baja afinidad con sus antígenos.

Por su especificidad las lectinas se clasifican en 5 grupos (Goldstein, 1986)

**Grupo I. Glucosa/Manosa (Glc/Man)**

**Grupo II. N-acetil-D-glucosamina (GlcNac)**

**Grupo III. N-acetil-D-galactosamina / galactosa (GalNAc / Gal)**

**Grupo IV. L-fucosa ( $\alpha$ L-Fuc)**

**Grupo V. Ácido siálico (N-acetil-ácido-neuraminico (Neu5Ac)**

La mayoría de las lectinas contienen al menos 2 sitios de unión, de ahí que su utilidad esté basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en la superficie celular. Las lectinas tienen amplia distribución, desde microorganismos como virus y bacterias, hasta hongos, plantas y animales vertebrados superiores (Goldstein, 1986).

**Cuadro 4. Estructuras sacarídicas de tejido canceroso identificadas mediante el uso de lectinas.**

Neoplasias	Estructura Identificada	Lectinas	Referencia
Cáncer de pulmón	Gal $\beta$ 1-3GalNAc > $\alpha$ y $\beta$ Gal, GlcNAc; $\alpha$ -D-Man; $\alpha$ -D-Glc, L-Fuc; $\alpha$ -D-Gal	<i>Arachis hypogaea</i> (Peanut agglutinin, PNA); <i>Lens culinaris</i> agglutinin (LCA); <i>Triticum vulgare</i> (Wheat germ agglutinin, WGA); <i>Ulex europaeus</i> agglutinin (UEA-I).	Alvarez- Fernandez, 1990; Shio, 2007
Cáncer de pulmón	Estructuras de Lewis <sup>x</sup> Gal $\beta$ 1-3GalNAc	AbMo 4C9 y la lectina <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	Matsumoto, 1992
Cáncer de hígado	$\alpha$ -D-Man (ramificaciones)	LCA	Shiraki K, 1995
Cáncer de mama	Gal $\beta$ 1-3GalNAc > $\alpha$ y $\beta$ Gal	PNA	Mustac E, 1996
Cáncer de pulmón	GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc > $\alpha$ GalNAc; $\alpha$ L-Fuc > Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	<i>Helix pomatia</i> agglutinin (HPA); UEA-I	Thöm I, 2007
Leucemia linfoblástica	Gal, GalNAc, GlcNAc	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> lectin	Pérez-Campos Mayoral L, 2008

Las estructuras glicosiladas específicas en ocasiones se expresan acorde al grado de maduración y diferenciación celular (Peracaula, 2008), por lo que es necesario tener una caracterización de estas moléculas glicosiladas en tejidos normales para poder compararlas con tejidos anormales como en el caso del CA de pulmón.

Para algunas neoplasias, se han descrito estructuras sacarídicas por medio de técnicas histoquímicas utilizando diversas lectinas, las cuales son características de estadio y de tipo de neoplasia (cuadro 4). Por lo que han sido útiles en diagnóstico y seguimiento de la neoplasia (Barkhordari, 2004).

La técnica de histoquímica implica una serie de problemas metodológicos como el procesamiento del tejido, los cortes histológicos del mismo, la pérdida de antígenos por el proceso de fijación del tejido y la interpretación histopatológica por microscopía entre otras, por lo que se han propuesto técnicas más eficientes como el ensayo inmunoenzimático denominado ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

## ELISA

La técnica de ELISA se desarrolló en 1971 en Suecia y Holanda, siendo aplicada posteriormente para la revelación y cuantificación de diversos tipos de antígenos, anticuerpos, hormonas, fármacos, etc. La técnica de ELISA y la de Radioinmuno ensayo (RIA), se han utilizado exitosamente en el área médica para el diagnóstico de la mayoría de las infecciones, valoraciones endocrinas y fisiológicas. Ambas técnicas tienen los mismos fines pero la de RIA es mas costosa (Janeway, 2005). La técnica de ELISA se basa en la reacción del anticuerpo con el antígeno que forma un complejo inmunitario y consiste en la detección de cualquiera de estas dos moléculas. Una de las moléculas es inmovilizada sobre una superficie (fase sólida) que generalmente es una placa de poliestireno en donde se lleva a cabo la reacción. Una vez inmovilizado ya sea el antígeno o el anticuerpo, se adiciona una solución (fase fluida o soluble) que contiene la molécula complementaria. Después de lavar exhaustivamente se incuba con un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario o contra el antígeno, el cual está acoplado a una enzima como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o  $\beta$ -glucosidasa. (Guzmán, 2004). Posteriormente, se adiciona el sustrato específico de la enzima utilizada, así como un cromógeno que desarrolla color, el cual es un revelador de la reacción inmunológica. Los cromógenos mas utilizados son orto-fenilendiamina, para-nitrofenilfosfato o para-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranosido. El desarrollo colorimétrico puede ser valorado por espectrofotometría. Hay tres variantes de la técnica de ELISA utilizando moléculas solubles, que a continuación brevemente se describen:

**Método directo:** Es un método sencillo que se basa en la inmovilización del antígeno soluble a la fase sólida, el cual posteriormente es identificado con un anticuerpo conjugado a una enzima y la reacción se revela cuando se adiciona el sustrato de la enzima junto con un cromógeno. La intensidad de color desarrollada por la reacción, es proporcional a la concentración del primer anticuerpo.

**Método indirecto:** Conocido como método tipo “emparedado” (anticuerpo-antígeno-anticuerpo), se basa en la inmovilización de un anticuerpo a la fase

sólida, el cual atrapa a los antígenos en las muestras biológicas analizadas que posteriormente son identificados con un anticuerpo acoplado a la enzima. En estos casos, la cantidad de antígeno es directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado.

**Método competitivo:** Se basa en la competencia que se establece entre un antígeno acoplado a una enzima y el mismo antígeno sin marcar (muestra problema) por una cantidad limitada del anticuerpo homólogo inmovilizado a la fase sólida. En estos casos la cantidad de antígeno es inversamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado (Guzmán, 2004).

La técnica ELISA se ha adaptado para ser utilizada en células o tejidos completos, teniendo la misma sensibilidad y se le ha denominado Cell-ELISA. Este tipo de ELISA es directo, pero en lugar de utilizar moléculas solubles se utilizan células fijadas a la placa y tiene múltiples aplicaciones (Ravindranath, 1996; Erdile, 2001).

En este trabajo se utilizó la técnica de Cell-ELISA con lectinas para identificar estructuras glicosiladas expresadas en la superficie de líneas celulares con la finalidad de que pueda utilizarse en la identificación de células neoplásicas en suspensión o directamente en la biopsia y apoyar el diagnóstico diferencial y la patología de difícil diagnóstico como es el CA pulmonar.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Las moléculas O-glicosiladas se expresan de manera diferente de acuerdo a los estímulos ambientales y al linaje celular, por lo que es difícil establecer un patrón de glicosilación general para todas las células. Es necesario establecer los parámetros de comparación para identificar estructuras sacarídicas características de células en proceso neoplásico en etapas iniciales.

Existen moléculas que pueden ser candidatos para ser utilizadas como recurso diagnóstico, pero teniendo siempre un marco de referencia debido a que se expresan de manera normal en diferentes tejidos y en diferentes estadios de desarrollo celular, tales como los antígenos Lewis, el antígeno Thomsen-Friedenreich, el antígeno Forssman y mucinas con glicosilación modificada.

### **IV. HIPOTESIS**

Las modificaciones en la glicosilación de moléculas de superficie de líneas celulares de cáncer de pulmón pueden ser identificadas por medio de la técnica de Cell-ELISA utilizando lectinas.

### **V. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la utilidad de la técnica Cell-ELISA para identificar estructuras sacarídicas expresadas en células tumorales

#### **Objetivos particulares:**

1. Estandarizar la técnica Cell-ELISA para la caracterización de estructuras glicosiladas de superficie celulares utilizando diferentes lectinas.
2. Validar el método utilizando diversas líneas celulares.

## VI. MATERIALES Y METODOS

### Reactivos:

Orto-fenilendiamina, 3,3'-dianimobencidina, estreptavidina-peroxidasa, ácido clorhídrico, periodato de Sodio, dimetilsulfóxido, suero fetal bovino, Tween-20, glicerol, albúmina sérica bovina (BSA) y tripsina fueron obtenidos de Sigma Co (St. Louis Mo. USA). Peróxido de hidrogeno, sulfato de Sodio, sulfato de Potasio y *p*-formaldehído fueron obtenidos de Merck Inc (West Point, PA, USA). Medio esencial mínimo (MEM) y medio Dulbecco modificado (DMEM) fueron de In Vitro (Madison WI, USA). N-hidroxisucinimido-biotina (NHS-Biotina) se obtuvo de Pierce Chemical Co. (Rockfor, IL, USA).

### Lectinas:

Se utilizaron 9 lectinas que reconocen las estructuras sacarídicas del cuadro 5. Ocho de las lectinas fueron adquiridas de Sigma Chem (St. Louis Mo. USA) y una fue aislada y donada por el Dr. Edgar Zenteno del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### Conjugación de lectinas con NHS-Biotina

Las lectinas fueron acopladas a biotina de acuerdo a la técnica descrita en Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook (Savage, 1992). Cada lectina se disolvió en la solución amortiguadora de carbonatos 50 mM a pH 8.5 y se le adicionó la cantidad necesaria de la solución de biotina (NHS-biotina 1mg/mL en dimetilsulfóxido) calculada de acuerdo a la formula siguiente:

$$(1\text{mg de lectina} \times \text{el peso molecular de la lectina} \times 10 \times \text{el peso molecular de la NHS-Biotina})$$

La mezcla se incubó agitando durante 2 horas a temperatura ambiente y al final se dializó 3 veces contra 3 litros de PBS pH 7.2.

**Cuadro 5. Lectinas utilizadas y sus estructuras específicas de reconocimiento**

LECTINAS	Grupo*	PM X 10 <sup>3</sup>	Código de color en las gráficas 1-7 (resultados)	Estructuras reconocidas
<i>Canavalia ensiformis</i> ( <b>Con A</b> )	I	102	<b>Rojo</b>	$\alpha\text{Man}>\alpha\text{Glc}>\text{GlcNAc}$ $\alpha\text{Man}>\alpha\text{Glc}=\text{GlcNAc}$
<i>Lens culinaris</i> agglutinin ( <b>LCA</b> )	I	49	<b>Rojo</b>	$\alpha\text{Man}>\alpha\text{Glc}>\text{GlcNAc}$
<i>Triticum vulgare</i> agglutinin ( <b>WGA</b> )	II	36	<b>Verde</b>	$\text{GlcNAc}(\beta 1-4\text{GlcNAc})_{1-2}>$ $\beta 1-4\text{GlcNAc}>\alpha 5\text{NeuAc}$
<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin ( <b>PNA</b> )	III	110	<b>Amarillo</b>	$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}>\alpha$ y $\beta\text{Gal}$
<i>Amaranthus leucocarpus</i> lectin ( <b>ALL</b> )	III	66	<b>Amarillo</b>	$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}>$ $\alpha\text{GalNAc}$
<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin ( <b>ABA</b> )	III	59	<b>Amarillo</b>	$\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$
<i>Limulus polyphemus</i> agglutinin ( <b>LPA</b> )	V	400	<b>Azúl</b>	$\alpha 5\text{NeuAc}\alpha 2-6\text{GalNAc}>$ $\alpha 5\text{NeuAc}$
<i>Maackia amurensis</i> agglutinin ( <b>MAA</b> )	V	130	<b>Azúl</b>	$\alpha 5\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin ( <b>SNA</b> )	V	140	<b>Azúl</b>	$\alpha 5\text{NeuAc}\alpha 2-6\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}$

\* El grupo IV reconoce estructuras con Fucosa (**Fuc**), lectinas no disponibles.  
PM = Peso Molecular.

### Comprobación del conjugado (lectina-biotina)

En una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.45  $\mu\text{m}$  se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de cada lectina conjugada a biotina, además de 10  $\mu\text{L}$  de BSA (1mg/ml) como control negativo y 10  $\mu\text{L}$  de BSA-biotina (1mg/mL) como control positivo. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y se incubó con 10 mL de una solución de gelatina al 1% en PBS durante 1h con agitación ligera a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron 4 lavados agitando ligeramente por 5 min con PBS-Tween. Luego la membrana se incubó durante 30 minutos con 10  $\mu\text{L}$  estreptavidina conjugada a peroxidasa a una dilución 1:4000. Después, se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS-Tween y se adicionó solución de revelado (1mg de 3, 3´diaminobenzidina, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3% en 3.3 mL de PBS pH 7.2). La reacción se lleva a cabo de manera inmediata (1 a 2 minutos) por lo que fue monitoreada esperando observar el desarrollo de color (marrón) en el control positivo y comparando con las lectinas que fueron



conjugadas a biotina. El control negativo no debe tener reacción. Después de comprobar la conjugación de lectina con biotina se fraccionó en alícuotas de 50µl y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Líneas celulares**

Se utilizaron 5 líneas celulares y 2 cultivos primarios obtenidos a partir de tumores como se describe en el cuadro 6:

### **Cultivo celular**

Las líneas celulares se cultivaron en condiciones de esterilidad en botellas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> (Corning, Foster, CA, USA) con medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 UL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% en atmósfera húmeda por 24hs para permitir el crecimiento de las células, las cuales se desprendieron mediante la incubación con 1 mL de la solución de tripsina/EDTA (0.25/0.05%) por 5 min. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces adicionando MEM sin suplementar con suero, centrifugando a 1500 rpm/10 min y descartando el sobrenadante cada vez. Por último, se resuspendieron a una concentración de 10<sup>7</sup> células/mL de MEM.

En una placa de poliestireno para ELISA de 96 pozos con fondo plano (NUNC, Rochester, NY, USA), se colocaron 10<sup>4</sup> células por pozo de cada línea celular resuspendidas en 100µL de MEM. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera húmeda durante 24hs, para obtener una monocapa confluyente de células. Cada pozo se lavó suavemente 3 veces adicionando PBS pH 7.2 a 37°C y retirando el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no levantar la monocapa.

**Cuadro 6. Líneas celulares utilizadas**

Línea celular	Origen
<b>Vero</b> (ATCC) CCL 81	Riñón de mono verde
<b>PK</b> (ATCC CCL 33)	Riñón de cerdo
<b>MDBK</b> (ATCC CCL 22)	Riñón bovino
<b>HeLa</b> (ATCC CCL 2)	Carcinoma epitelial de cérvix humano
<b>A-427</b> (ATCC HTB 53)	Carcinoma pulmonar humano

	(Tipo epidermoide)
<b>TS</b>	Testículo de cerdo (Tumor primario)
<b>TB</b>	Testículo bovino (Tumor primario)

### **Fijación de las células:**

Se utilizaron diferentes soluciones fijadoras para evaluar su eficiencia en la técnica

Alcohol etílico al 70% en PBS

Alcohol metílico absoluto

Acetona al 30 % en PBS

Acetona-cloroformo (V/V)

Después de probar las soluciones fijadoras con diferentes tiempos de incubación; 15, 30 y 60 min (para metanol absoluto y acetona-cloroformo) y 2, 4, 6 y 12h (para etanol al 70% y acetona al 30%, ambas en PBS) a 4°C y a temperatura ambiente, se decidió continuar el trabajo fijando con la solución de acetona ya que fue la que más ventajas representaba.

Las células se fijaron con acetona al 30% en PBS pH 7.2 durante 12 horas a 4°C. Cada pozo se lavó con suavidad, de 3 a 4 veces mediante la adición de PBS-Tween 20 al 0.01% (PBS-Tween), retirando el exceso de líquido cada vez. Luego, se bloqueó la peroxidasa endógena de las células con 50µl de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3 % en PBS durante 20 min a 37°C. Nuevamente se lavó la placa de 2 a 3 veces con PBS-Tween.

### **Incubación de las células con soluciones bloqueadoras**

Con la finalidad de cubrir sitios que pudieran ocasionar reacciones inespecíficas, las células se incubaron individualmente 1h con las diferentes soluciones bloqueadoras: 5% de leche descremada en PBS, 0.3% de albúmina sérica bovina en PBS y 1% de gelatina en PBS. Se decidió utilizar la solución bloqueadora más eficiente, por lo que todas las incubaciones se llevaron a cabo con 100µL de una solución al 5% de leche descremada en PBS,

incubando a 37°C por 1h. Después de esta incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS-Tween y una tercera lavada se llevó a cabo únicamente con PBS.

### **Incubación de las células con lectinas**

Se realizó la titulación de cada una de las lectinas partiendo de una concentración de 1 mg/mL. Se adicionó a cada primer pozo 100µL de lectina conjugada a biotina diluida en CaCl<sub>2</sub> al 0.1mM en PBS. Después de hacer diluciones seriadas, las células se incubaron por 1h a temperatura ambiente y se lavaron suavemente 4 veces por 5 minutos con PBS-Tween con CaCl<sub>2</sub> al 0.1mM (PBS-Tween-Calcio). Enseguida se incubaron por segunda vez con 100µL de estreptavidina-peroxidasa a una dilución de 1:4000 en PBS, por 1h a temperatura ambiente. La placa de cultivo se lavó 4 veces por 5 minutos con PBS-Tween-Calcio y a cada pozo se le adicionó 100µL de la solución de revelado (4mg de *orto*-fenilendiamina, 40µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en 12 mL de amortiguador de citratos 50 mM pH 5.6) incubando por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100µL de HCl a concentración 3N a cada pozo. El color desarrollado por la reacción se registró mediante absorbancia de una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan MS) utilizando como blanco, la absorbancia obtenida de células que se procesaron de la misma manera pero que no se incubaron con lectinas. Los datos fueron analizados y graficados con el sistema STATA.

## VII. RESULTADOS

Se utilizó la técnica de Cell-ELISA sustituyendo los anticuerpos con lectinas para el reconocimiento de estructuras sacarídicas. Durante el procesamiento de las células en las placas de ELISA, uno de los pasos críticos fue la fijación de las células para evitar que las moléculas de superficie se alteraran, para esto se utilizaron diferentes soluciones fijadoras, mencionadas en la sección de Material y Métodos.

Los criterios para seleccionar la solución fijadora fueron que durante el proceso no se desprendieran las células de la placa y que estas células al final no presentaran reacción inespecífica (reacción de fondo). La solución fijadora de acetona al 30% en PBS (V/V) resultó más adecuada para estos fines, ya que disminuyó considerablemente el desprendimiento celular y la reacción de fondo en la lectura de los controles negativos (células que no se incubaron con lectinas).

Todas las lectinas utilizadas en este trabajo estaban conjugadas a biotina. Así mismo la estreptavidina utilizada estaba acoplada a la enzima peroxidasa, por lo que se utilizó una solución de revelado con  $H_2O_2$  como sustrato de la enzima y la reacción se detectó mediante el cromógeno soluble *o*-fenilendiamina. El color desarrollado por la reacción fue evaluado en un lector de ELISA (Labsystem Multiscan) a una longitud de onda de 492 nm. La intensidad del color medido en unidades de absorbancia fue proporcional a la cantidad de lectina unida a las estructuras sacarídicas de las células. En virtud de que las lectinas se unen a su ligando con una constante de afinidad ( $K$ ) de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  y que algunas de ellas son Calcio dependientes se adicionó  $CaCl_2$  al 0.1mM a la solución de lavado (PBS-Tween).

Por otra parte, se hicieron las siguientes diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 y 1:6400) con todas las lectinas a partir de una concentración de 1 mg/ml, para identificar la dilución de trabajo más conveniente, encontrándose como dilución óptima 1:1600.

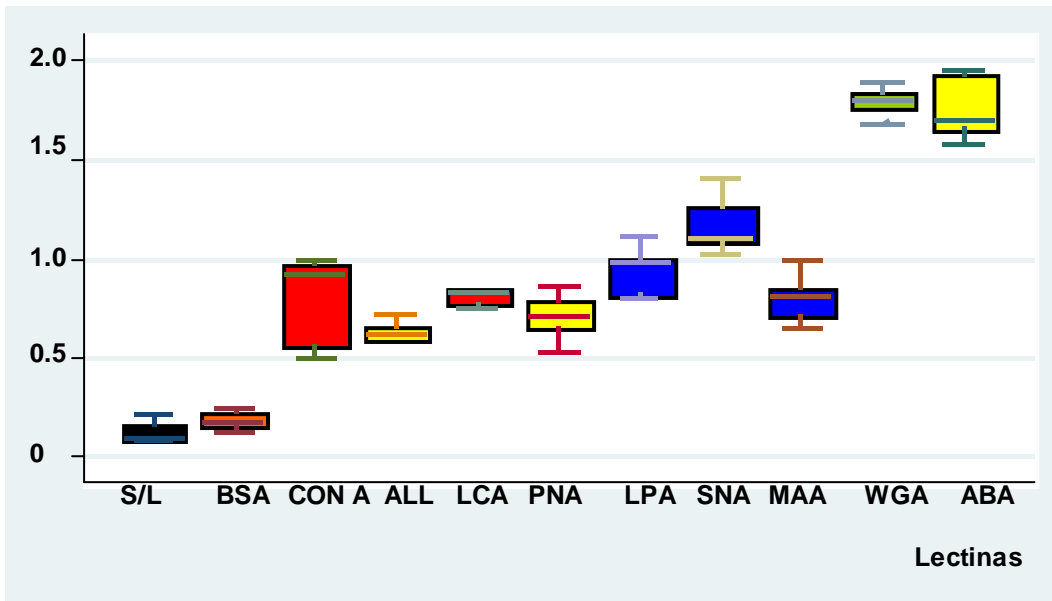
De los 7 tipos de células utilizados en este trabajo 5 fueron líneas celulares y 2 cultivos primarios de testículo de bovino y de cerdo, cuyos resultados se presentan en las gráficas 1-7.

Para la validez del estudio, las repeticiones intraensayos fueron de 5 veces en la misma placa y las repeticiones interensayos fueron de 10 veces en diferentes placas, teniendo en total 50 lecturas para cada ensayo. La nomenclatura utilizada en las gráficas 1 a 7 se describe en el cuadro 6 en la sección de los métodos, así como la estructura reconocida; para mayor facilidad se ordenaron las lectinas por grupos. Los datos fueron analizados con el programa estadístico STATA versión 9.0 utilizando las siguientes pruebas paramétricas: Análisis de varianza (ANOVA). Prueba de Bartlett: y Prueba de Bonferroni. Los resultados en las gráficas, representan la media y la desviación estándar.

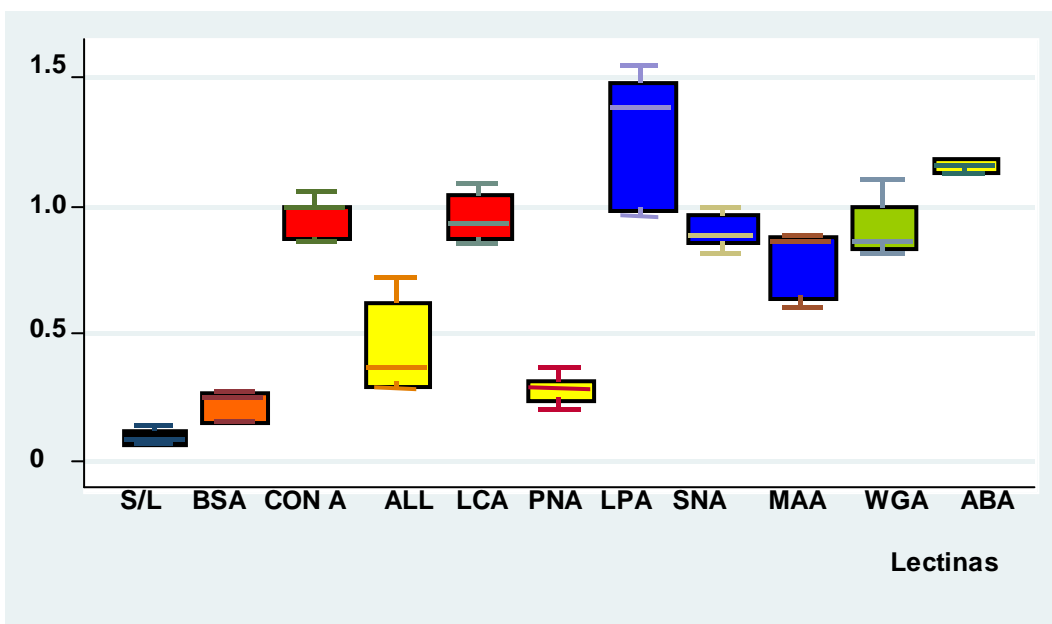
En la grafica 1 presenta resultados con la línea celular A-427 que corresponde a carcinoma de pulmón de tipo epidermoide, se encontró que hay una mayor expresión de estructuras glicosiladas reconocidas por WGA siguiéndole las estructuras reconocidas por ABA, SNA, LPA, Con A, MAA al igual que LCA, finalmente las estructuras reconocidas con PNA y ALL. Los controles negativos fueron BSA y en otro solamente la solución de revelado.

En la gráfica 2 se presentan los resultados para la línea celular HeLa que corresponde a tejido carcinoma epitelial de cervix humano, se encontró que hay una mayor expresión de estructuras sacarídicas reconocidas por la lectina LPA, siguiendo de las reconocidas por ABA, Con A, LCA, SNA, MAA; WGA, ALL y finalmente las reconocidas por PNA. Cabe resaltar que las estructuras reconocidas por SNA, MAA y WGA se expresan casi en la misma proporción, que para el caso de SNA y MAA corresponde a ácido siálico pero con la diferencia que el primero lo reconoce con un enlace  $\alpha$ -2,6 y el segundo con un enlace  $\alpha$ -2,3 y para WGA corresponde a GlcNAc.

**Gráfica 1. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular A-427 (carcinoma de pulmón tipo epidermoide).**

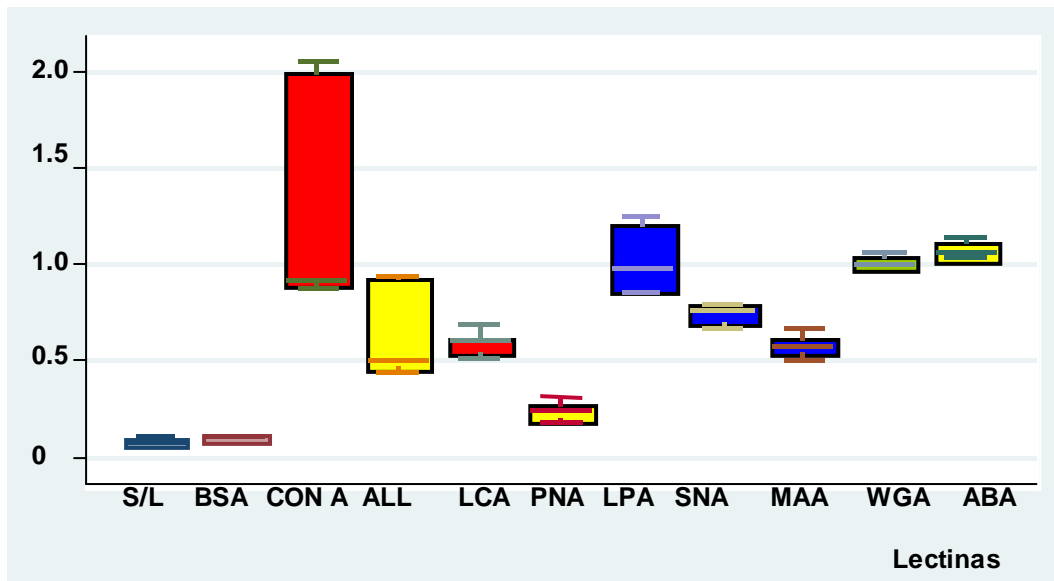


Grafica 2. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular Hela (carcinoma epitelial de cervix humano).

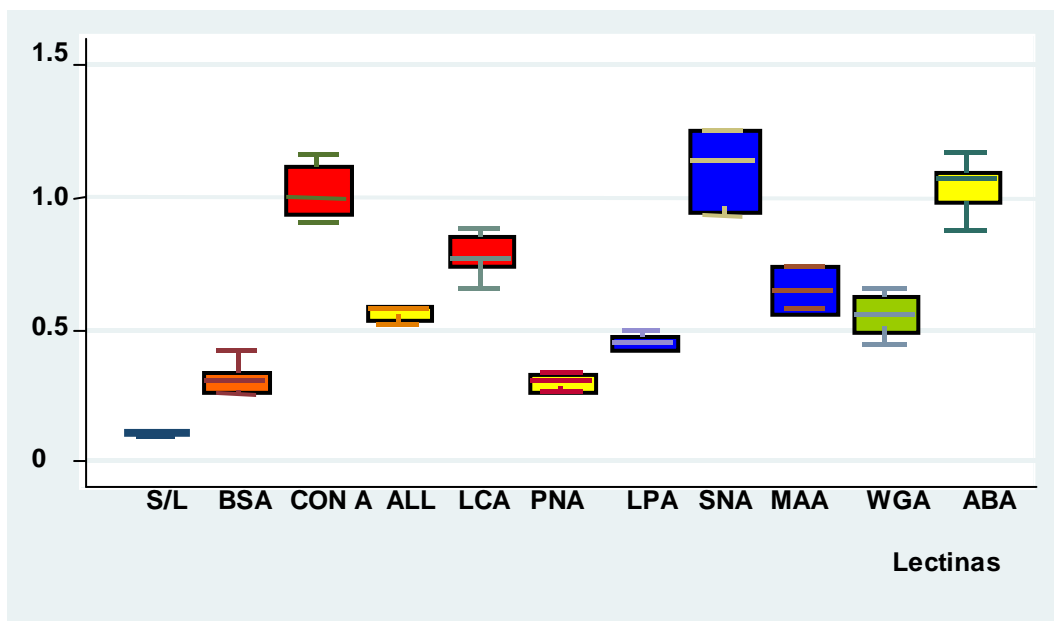


En la gráfica 3 se representa la línea celular Vero que corresponde a tejido de riñón de mono verde en la que se encontró que hay una mayor expresión de estructuras sacarídicas reconocidas por WGA y ABA, seguido de las reconocidas por LPA en igual expresión que las estructuras reconocidas por WGA, luego siguen las reconocidas por ConA, SNA, LCA, MAA, ALL y finalmente PNA. En el caso de Con A y ALL se presenta una gran dispersión de datos.

Gráfica 3. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular Vero (células epiteliales de riñón de mono verde).



Gráfica 4. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular PK (células epiteliales de riñón de cerdo).

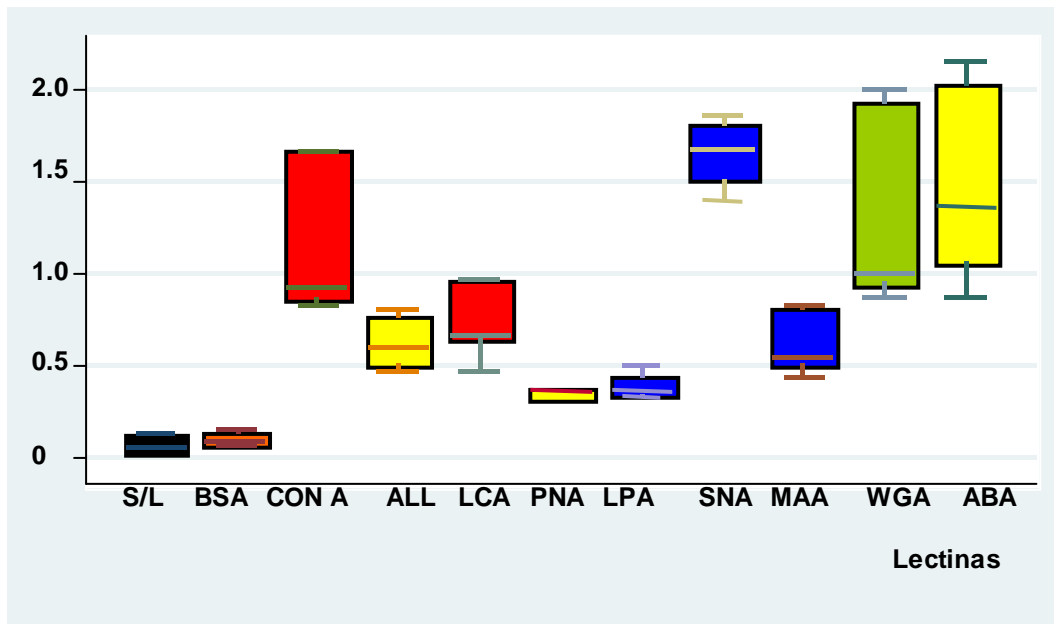


En la gráfica 4 representa a la línea celular PK que corresponde a tejido de riñón de cerdo, se encontró que hay una mayor expresión de estructuras sacarídicas reconocidas por SNA, seguido de ABA, Con A, LCA, MAA, WGA al igual que ALL y finalmente LPA y PNA.

En la gráfica 5, la línea MDBK que corresponde a tejido de riñón bovino, se encontró que hay una mayor expresión de estructuras reconocidas por la

lectina SNA, seguido de ABA, WGA, Con A, LCA, ALL, MAA y finalmente PNA al igual que LPA. En los casos de WGA, ABA y Con A se presenta una gran dispersión de datos.

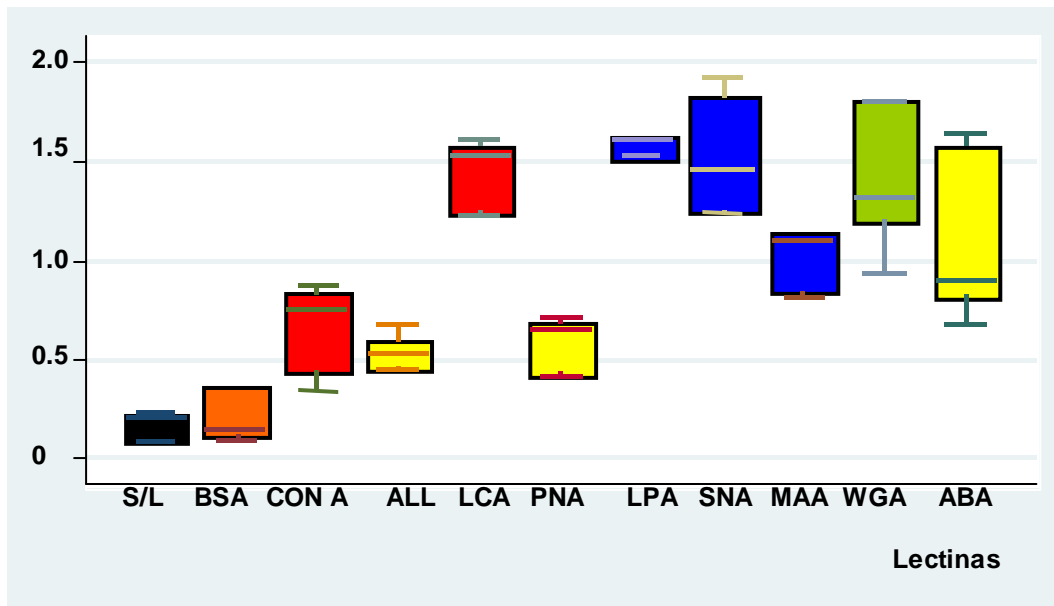
**Gráfica 5. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular MDBK (célula epitelial de riñón bovino).**



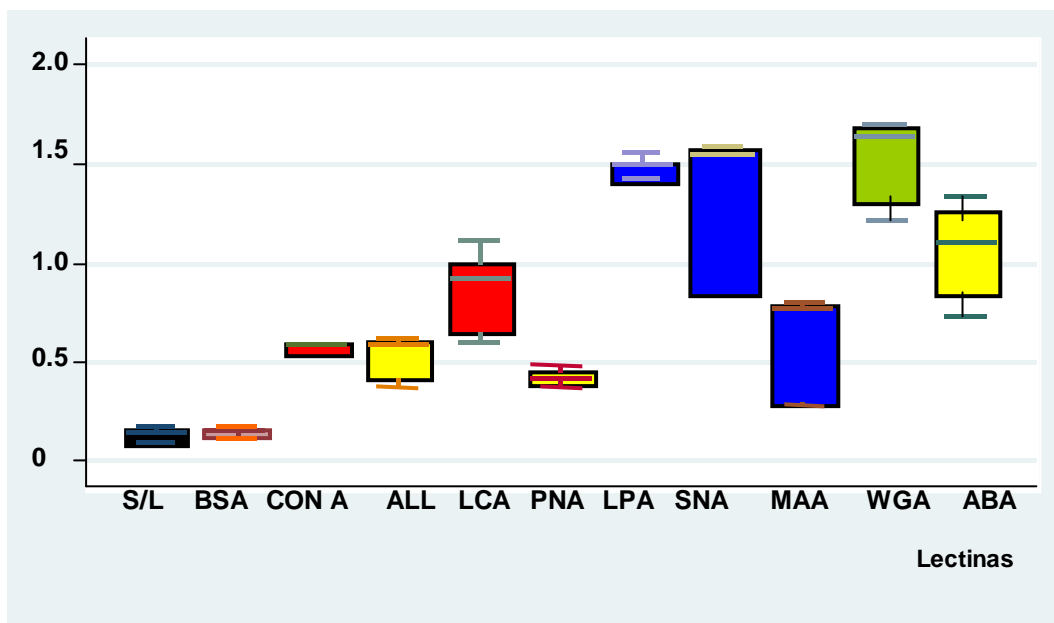
En la gráfica 6 representa la línea celular TS que corresponde a un tejido epitelial de testículo de cerdo en la cual se encontró que hay una mayor expresión de estructuras sacarídicas reconocidas por LCA a la par que las reconocidas con LPA, seguidas de SNA, WGA, MAA, ABA, Con A, PNA y finalmente ALL

**Gráfica 6. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular TS (célula epitelial de testículo de cerdo).**





Gráfica 7. Reconocimiento de estructuras glicosiladas por lectinas en la línea celular TB (célula epitelial de testículo bovino).



Por último, la gráfica 7 representa a la línea celular TB que corresponde a tejido de testículo bovino se encontró que hay una mayor expresión de estructuras sacarídicas reconocidas con WGA seguido de SNA, LPA, ABA, LCA, MAA, ALL al igual que Con A y finalmente PNA. Las estructuras reconocidas por las lectinas SNA y MAA presentan una gran dispersión en los datos

## VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo utilizamos la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay por sus siglas en inglés) utilizando células como fase sólida (Cell-ELISA). La técnica de Cell-ELISA es utilizada para el diagnóstico de patologías crónico degenerativas como el cáncer y se basa en la reacción del anticuerpo con el antígeno. En nuestro caso se sustituyó el uso de anticuerpos monoclonales por el de lectinas con el objetivo de identificar estructuras sacarídicas de la superficie celular. La ventaja de usar lectinas con respecto a otros reactivos es su bajo costo, especificidad y sensibilidad.

Una de las ventajas de la técnica de Cell-ELISA es que nos permite hacer la determinación cuantitativa a diferencia de técnicas como la histoquímica que es solamente cualitativa. La histoquímica y la inmunohistoquímica también se han utilizado para identificar oligosacáridos en cortes de tejidos preservados con algún fijador o en tejidos congelados. Sin embargo, presenta una desventaja ya que estos procesos de fijación pueden alterar la integridad de las estructuras, por lo que la identificación de moléculas de superficie podría dar resultados poco confiables.

Otra ventaja es que Cell-ELISA es un método muy simple que no requiere del patólogo experto para la interpretación de los resultados. Es una alternativa para un diagnóstico adecuado y permite también cuantificar la densidad de expresión de los glicoconjugados en las células (Erdile, 2001). El inconveniente del Cell-ELISA es que la especificidad es menor que el ELISA tradicional con respecto a la identificación de antígenos solubles, aunque tiene mejor sensibilidad (Feit, 1983).

Por otra parte, es importante hacer una selección de las soluciones fijadoras ya que éstas pueden alterar las moléculas y estructuras celulares. En nuestro caso, la selección se realizó atendiendo a las siguientes características:

- Que penetre rápidamente a la célula para prevenir importantes cambios
- Que coagule el contenido de la célula en sustancias insolubles, para evitar que se pierdan durante su procesamiento.
- Que proteja la integridad de las células contra la distorsión ocasionada durante la deshidratación y la tinción

- Que permita que los componentes de la célula sean claramente visibles por medio de las tinciones y evitar la refracción de la luz

Por esta razón se utilizaron etanol al 70% en PBS, acetona al 30% en PBS, acetona-cloroformo (V/V) y metanol absoluto.

La acetona  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  se utiliza principalmente para estudiar moléculas de células en suspensión o en cortes finos de tejido. La acetona penetra lentamente en las células, pero ocasiona la coagulación de las proteínas (Vincek, 2003). Para algunos autores la acetona es considerada como el estándar de oro porque preserva los péptidos (Van der Loos, 2007). En cambio el etanol se utiliza principalmente para preservar estructuras de citoesqueleto, pero frecuentemente solubiliza y remueve antígenos unidos a membrana, además preserva pobremente a las proteínas, pero es excelente para preservar los ácidos nucleicos (Su, 2004). La reactividad de antígenos o moléculas de membrana se restablece mejor por medio de la exposición a disolventes de lípidos como el cloroformo por esa razón se utilizó en la fijación de las células. De acuerdo a la bibliografía consultada hay reportes que para algunas glicoproteínas que están parcialmente embebidas en la doble capa de lípidos de la membrana celular se requiere una exposición prolongada al cloroformo. Cuando nosotros incorporamos ese criterio notamos que la estructura celular se alteraba completamente por lo que las células se desprendían de la placa, por lo cual se descartó esa fijación.

Se excluyó el uso de aldehídos (para-formaldehído y formaldehído) debido a que ocultan múltiples epítomos, al formar enlaces con moléculas de superficie (Grown, 2004).

Las soluciones para neutralizar la peroxidasa endógena de las células y las utilizadas para evitar reacciones inespecíficas fueron pasos críticos que influyeron en la adecuada evaluación de los resultados, ya que habíamos observado en los controles negativos, valores de absorbancias muy altos cuando se utilizaba albúmina sérica bovina como bloqueador.

Con respecto a la metodología propuesta en esta tesis, ésta puede ser útil en suspensiones celulares obtenidas a partir de fluidos biológicos como la sangre y no presenta la desventaja de otras técnicas como la biopsia que es un

método invasivo, siendo una limitante para el diagnóstico. Asimismo, la inmovilización de las células en una placa de poliestireno tiene ventajas para su manejo, ya que así se evita la pérdida de ellas en los múltiples lavados. La técnica de Cell-ELISA puede utilizarse en diversas situaciones, sobretodo para identificar antígenos o marcadores que puedan apoyar el diagnóstico de alguna patología. Una de las situaciones más críticas de la técnica, es la adecuada adherencia de las células a la superficie de la placa. Otro aspecto crítico es la formación de la monocapa celular, ya que variaciones en el número de células puede ocasionar resultados diversos. Para obtener una la monocapa homogénea, las células se incuban durante por 24hs para la confluencia. En nuestro caso, se confirmó observándolas en el microscopio y se descartaron las placas que no cumplían con este criterio.

La técnica de Cell-ELISA empleando lectinas es muy sensible, por esta razón se realizaron los ensayos por quintuplicado para disminuir la desviación estándar. Lo anterior sugiere que la sensibilidad de la técnica es tan alta que las variaciones metodológicas pueden ser eliminadas por métodos automatizados.

Con respecto a la reactividad de las lectinas, en cada una de las gráficas se observa que no hay un patrón de expresión de estructuras glicosiladas en común, lo cual sugiere que cada línea celular expresa un patrón particular de estructuras glicosiladas. Algunos autores han explicado estas diferencias, por ejemplo Varki (2009) menciona que el grado y tipo de glicosilación está regulado por un número considerable de glicosiltransferasas que actúan secuencialmente tanto en el retículo endoplásmico como en el aparato de Golgi en respuesta a los estímulos y señales a los que son expuestas las células. Las glicosiltransferasas actúan adicionando un residuo de azúcar a cada precursor, esto da lugar a las modificaciones cotraduccionales y postraduccionales de una glicoproteína o proteoglicano característico. Por lo tanto, el repertorio de glicosiltransferasas presentes en un determinado tipo celular determina las características particulares de los oligosacáridos que poseen las proteínas de membrana y de la matriz extracelular. En este sentido, los cambios sacarídicos en las glicoproteínas se deben a varios factores; a) la regulación genética de las glicosiltransferasas específicas de cada célula o tejido; b) la disponibilidad de los residuos sacarídicos; y c) la competencia entre aceptores intermediarios

durante la elongación de las cadenas sacarídicas. Por lo tanto, la glicosilación final de las moléculas es el resultado del amplio repertorio y actividad de estas enzimas en la célula.

La gran diversidad de posibilidades nos obliga a tener un patrón de glicosilación bien identificado para cada tipo o línea celular, que nos sirva de referencia para fines de diagnóstico en patologías como en el caso del cáncer.

El uso de lectinas con respecto a los anticuerpos representa una ventaja en estos casos, porque las lectinas permiten identificar cambios estructurales en moléculas glicosiladas expresadas en la superficie de las células, tales como cambios conformacionales, sobreexpresión de las mismas, así como cambios en la complejidad de la molécula ya sea por modificación en las ramificaciones o en la longitud de la misma, inclusive el cambio de tipo de enlace que presenta entre los residuos de carbohidratos que son reconocidos específicamente por cada lectina. Con esta información podemos valorar las posibles alteraciones que presenten las células y asociarlas con la patología.

## **IX. CONCLUSIÓN**

Esta metodología es muy sensible para identificar cambios moleculares en las estructuras glicosiladas de la superficie celular, pero se requiere disminuir las variables metodológicas haciendo el método lo más automatizado posible.

Debido a las características glicosídicas propias de cada estirpe celular, se requiere tener un patrón de referencia bien establecido para identificar variaciones en la expresión de moléculas glicosiladas cuando las células están sufriendo modificaciones durante un proceso patológico como la transformación neoplásica.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alva López LF. Epidemiología del cáncer pulmonar en México; Hallazgo por imagen. *Rev Inst Nal Enf Res Mex.* 2003; 16 (4): 197-204.
- Alvarez-Fernandez E, Carretero-Albiñana L. Lectin histochemistry of normal bronchopulmonary tissues and common forms of bronchogenic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1990; 114(5): 475-481.
- Barkhordari A, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. Lectin histochemistry of normal human lung. *J Mol Histol.* 2004, 35(2):147-56
- Beasley M, Brambilla E, Travis W. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars in Roentgenology*, 40 (2): 90 - 97
- Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1473: 67-95.
- Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004,23(1-2):77-99
- Camby I, Salmon I, De Decker R, Pasteels JL, Brotchi J, Danguy A, Kiss R. Lectin histochemistry of astrocytic tumors and in vitro characterization of lectin-induced modifications on the proliferation of the SW1088, U373 and U87 human astrocytic cell lines. 1: *J Neurooncol.* 1997, 34(2):111-22
- Chandrasekaran EV, Xue J, Neelamegham S, Matta KL. The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr Res.* 2006 ,12;341(8):983-94.
- Croce MV, Rabassa ME, Price MR, Segal-Eiras A. MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2001;7(4):284-91.
- Danishesky S, Allen J. From the laboratory to the clinic: A retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2000; 39:837-863.
- Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugar. *Chem Rev.* 1996; 96: 683-720.

- Ellis SM, Husbang JE, Armstrong P, Hansell DM. Computed tomography screening for lung cancer: back to basics. *Clin Radiol* .2001;56:691-99.
- Erdile LF, Smith D, Berd D. Whole cell Elisa for detection of tumor antigen expression in tumor samples. *J Immunol Methods*. 2001, 258(1-2):47-53.
- Feit C, Bartal AH, Tauber G, Dymbort G, Hirshaut Y. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of monoclonal antibodies recognizing surface antigens expressed on viable cells. *J Immunol Methods*. 1983,58(3):301-8.
- Freire T, Robello C, Casaravilla C, Álvarez D, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. Antígenos mucinicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de fisiología*.2002,:89-107.
- Goldstein IJ and Poretz RD. Isolation physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *the lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Edited by Liemer FE, Sharon N, Goldstein IJ.1986, p 35. Orlando Florida, Academic Press.
- Grown AM. Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval and formalin fixation. *Am J.Clin Pathol*. 2004,121:172-1741
- Guzmán-Vázquez E. Las pruebas de ELISA. *Gac Méd Méx*. 2004;140(3):48-49.
- Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV.O-linked protein glycosylation structure and function. Mini-Review. *Glycoconj J*. 1996;13:19-26.
- Janeway Ch, Travers P, Walport M, Shlomchik M.-. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 6<sup>th</sup> Edición, 2005. New York and London. Garland Science.
- Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2004; 95(5): 377-84.
- Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J*. 1996;13(5): 693-707
- Matsumoto H, Muramatsu H, Muramatsu T, Shimazu H. Carbohydrate profiles shown by a lectin and a monoclonal antibody correlate with metastatic



- potential and prognosis of human lung carcinomas. *Cancer*. 1992; 69(8): 2084-90
- Matsushita Y, Cleary KR, Ota DM, Hoff SD, Irimura T. Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases. *Lab Invest*. 1990; 63(6): 780-91.
- Mustac E, Melato M, Sasso F, Valkovic T, Bottin C, Jonjic N. The lectin-binding sites for peanut agglutinin in invasive breast ductal carcinomas and their role as a prognostic factor. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996; 122(11):693-7.
- Navarro-Romero M, Guindeo Casasús MC, Domínguez Cabrera C. Marcadores Tumorales. *Biocáncer*. 2004;1:1-9.
- Niklinski J, Furman M. Clinical tumour markers in lung cancer *Eur J Cancer Prev*. 1995 Apr;4(2):129-38..
- Ono K, Hattori H, Uemura K, Nakayama J, Ota H, Katsuyama T. Expression of Forssman antigen in human large intestine. *J Histochem Cytochem*. 1994;42(5):659-65.
- Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life*. 2007, 59(4-5):269-73
- Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd PM, de Llorens R. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers*. 2008;25(4-5):207-18
- Pérez-Campos-Mayoral L, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Zenteno E, Hernández-Cruz P, Martínez-Cruz R, Martínez-Cruz M, Pina-Canseco S, Pérez-Campos E. Potential use of the *Macrobrachium rosenbergii* lectin for diagnosis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Tohoku J Exp Med*. 2008, 214(1):11-6.
- Ravindranath MH, Bauer PM, Cornillez-Ty C, García J, Morton DL. Quantitation of the density of cell surface carbohydrate antigens on cancer cells with a sensitive cell-suspension ELISA. *J Immunol Methods*. 1996, 197(1-2):51-67.
- Ravindranath MH, Bauer PM, Cornillez-Ty C, Garcia J, Morton DL. Quantitation of the density of cell surface carbohydrate antigens on cancer cells with a sensitive cell-suspension ELISA. *J Immunol Methods*. 1996, 197(1-2):51-67 ).

- Rivera R, Salazar M. Cáncer Pulmonar: Distribución de metástasis de acuerdo al tipo histológico. Estudio de Autopsias. Rev Inst Nal Enf Res. 2002; 25(2):84-89.
- Rose MC, Voynown JA. Respiratory tract mucin genes and mucinglycoproteins in health and disease. Physiol Rev. 2006; 86:245-278.
- Samet MJ, Alberg JA. Epidemiology of Lung Cancer. Chest. 2003; 23:21-49.
- Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. Eds. 1992. Avidin-biotin Chemistry: A Handbook. Ed. Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA., pp 41-48.
- Shio Y, Suzuki H, Kawaguchi T, Ohsugi J, Higuchi M, Fujii K, Kanno R, Ohishi A, Gotoh M. Carbohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible prognostic factor in patient with node-positive lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 2007; 57(2): 187-92.
- Shiraki K, Takase K, Tameda Y, Hamada M, Kosaka Y, Nakano T. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. Hepatology. 1995, 22(3):802-7.
- Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. BioEssays. 1990; 12(5):223-230.
- Sozzani P, Arisio R, Porpiglia M, Benedetto C. Is Sialyl Lewis x antigen expression a prognostic factor in patients with breast cancer? Int J Surg Pathol. 2008; 16(4): 365-74.
- Springer GF, Chandrasekaran EV, Desai PR, Tegtmeyer H. Blood group Tn-active macromolecules from human carcinomas and erythrocytes: characterization of and specific reactivity with mono- and poly-clonal anti-Tn antibodies induced by various immunogens. Carbohydr Res. 1988 15;178: 271-92.
- Springer GF. Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness.. Mol Immunol. 1989; 26(1):1-5,

- Srinivasan N, Bane SM, Ahire SD, Ingle AD, Kalraiya RD. Poly N-acetyllactosamine substitutions on N- and not O-oligosaccharides or Thomsen-Friedenreich antigen facilitate lung specific metastasis of melanoma cells via galectin-3. *Glycoconj J*. 2008 Oct 24.
- Strauss GM, Skarin AT. Use of tumor markers in lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1994;8: 507-32.
- Su JM, Perlaky L, Li XN, Leung HC, Antalffy B, Armstrong D, Lau CC. Comparison of ethanol versus formalin fixation on preservation of histology and RNA in laser capture microdissected brain tissues. *Brain Pathol*. 2004;14(2):175-82.
- Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconj J*. 1995; 12(3):183-93..
- Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res*. 1993; 53(2):354-61.
- Taniguchi N, Yokosawa N, Narita M, Mitsuyama T, Makita A. Expression of Forssman antigen synthesis and degradation in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1981; 67(3):577-83.
- Thôm I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I., et al. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung cancer*. 2007; 56(3): 391-97.
- Tovar-Guzmán V, Barquera S, López-Antuñano F. Tendencias de mortalidad por cánceres atribuibles al tabaco en México. *Salud pública Méx*. 2002;44:14-20.
- Tsuboi S, Fukuda M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *Bioessays*. 2001; 23(1):46-53.
- Uemura K, Hattori H, Ono K, Ogata H, Taketomi T. Expression of Forssman glycolipid and blood group-related antigens A, Le(x), and Le(y) in human gastric cancer and in fetal tissues. *Jpn J Exp Med*. 1989, 59(6):239-49.
- Ugorski M, Laskowka A. Sialil Lewis (a): a tumor- associated carbohydrate antigen involved adhesión and metastatic potencial of I cancer cells. *Acta Biochem Pol*. 2002; 49(2):303-311.

Van den Steen, Rudd P, Dwek R, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem.* 1998; 33:151-208.

Van der Loos CM. A focus on fixation. *Biotech Histochem.* 2007;82(3):141-54.)

Varki A. Cummings D. Hudson HF. Stanley P. Hart GW. Etzler ME. *Essentials of Glycobiology. Structure and biosynthesis. Second Edition.* Ed. Varki Ajit et al. 2009. USA. ISBN 978-087969770-9.

Vincek V, Nassiri M, Nadji M, Morales AR. A tissue fixative that protects macromolecules (DNA, RNA, and protein) and histomorphology in clinical samples. *Lab Invest.* 2003; 83(10): 1427-35.

Wolf MF, Koerner U, Schumacher K. Specificity of reagents directed to the Thomsen-Friedenreich antigen and their capacity to bind to the surface of human carcinoma cell lines. *Cancer Research.* 1986; 46: 1779-82

## XI. ANEXO A

### Preparación de soluciones

Amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 7.2; 0.15 M de NaCl  
(phosphato buffer solution, PBS)

8.7 g NaCl

2.7 g  $\text{Na}_2\text{H}_4\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0.4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

1.0 L  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Solución de lavado

Twen 20 al 0.01% en PBS

Soluciones para disminuir la reacción inespecífica

- a) 5.0 g de leche descremada en 100 mL de PBS
- b) 0.3% Albúmina sérica bovina en PBS
- c) 1% gelatina en PBS

Amortiguador de citratos pH 5.6

29.0g de citrato de sodio

4.1 mL de ácido acético glacial

1 L de agua destilada

Solución de tripsina/EDTA pH 7.2

0.25 mg tripsina

0.05 mg EDTA

100 mL de PBS

Solución de revelado (Sustrato para la peróxidasa)

4 mg O-fenilendiamina

12 mL de amortiguador de citratos pH 5.6

40  $\mu$ L de  $H_2O_2$  al 3 %

Solución para detener la reacción

100  $\mu$ L de HCl 3N

### **Conjugación de lectinas con NHS-Biotina**

1 mg de lectina (liofilizada) se disolvió en

1 ml de amortiguador de carbonatos pH 9.5

Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.5

7.0 g  $NaCO_3$

2.8 g  $NaHCO_3$

1.L de agua destilada

Solución de NHS-Biotina

1 mg de NHS-Biotina

1 mL de dimetilsulfóxido

## XII. ANEXO B

Como ejemplo se describen los datos y la estadística de la línea celular A-427, el mismo tratamiento estadístico se maneja en las otras líneas celulares empleadas en el presente trabajo. Datos obtenidos de la técnica Cell-ELISA de diez eventos por cinco repeticiones cada uno, en las líneas celulares con lectinas a una longitud de onda de 492 nm. Los datos fueron analizados con el programa estadístico STATA versión 9.0 utilizando las siguientes pruebas paramétricas: Análisis de distribución, varianza (ANOVA). Prueba de Bartlett y Prueba de Bonferroni.

Línea celular <b>A-427</b> (Carcinoma de Pulmón, tipo Epidermoide)											
	S/L	BSA	Con A	ALL	LCA	PNA	LPA	SNA	MAA	WGA	ABA
1er. Evento	0.2	0.3	0.73	0.61	0.46	0.83	1.1	1.2	0.36	1.11	2.24
	0.15	0.26	0.81	0.55	0.6	0.68	1.22	1.23	0.41	1.14	2.28
	0.14	0.28	0.79	0.62	0.61	0.68	1.12	1.36	0.45	1.98	2.26
	0.16	0.28	0.88	0.59	0.63	0.73	1.15	1.14	0.43	1.04	2.26
	0.13	0.25	0.78	0.68	0.59	0.6	1.2	1.19	0.37	1	2.44
2do. Evento	0.27	0.2	0.91	0.48	0.54	0.75	1.3	1.2	0.39	0.78	2.3
	0.16	0.32	0.75	0.62	0.45	0.82	0.95	1.01	0.56	1.18	1.88
	0.18	0.25	1.3	0.51	1.3	0.83	1.32	0.96	0.75	1.98	1.98
	0.13	0.34	0.98	0.7	1.17	0.47	0.98	1.3	0.62	1.68	1.49
	0.11	0.21	1.24	0.52	1.25	0.95	1.42	0.78	0.78	2.3	1.62
3er. Evento	0.2	0.27	0.92	0.71	1.35	0.66	1.1	1.54	0.62	2.1	2.35
	0.14	0.3	0.84	0.62	1.25	0.92	0.82	1.62	0.78	1.77	1.75
	0.09	0.36	1.25	0.55	1.3	1.01	1.36	1.4	0.85	1.8	1.63
	0.08	0.26	1.52	0.66	1.25	0.95	0.76	1.02	0.65	2.25	2.06
	0.07	0.15	0.85	0.64	0.84	0.66	1.22	0.83	0.42	1.3	1.45
4to. Evento	0.2	0.3	0.73	0.61	0.46	0.83	1.1	1.2	0.36	1.11	2.24
	0.15	0.26	0.81	0.55	0.6	0.68	1.22	1.23	0.41	1.14	2.28
	0.14	0.28	0.79	0.62	0.61	0.68	1.12	1.36	0.45	1.98	2.26
	0.16	0.28	0.88	0.59	0.63	0.73	1.15	1.14	0.43	1.04	2.26
	0.13	0.25	0.78	0.68	0.59	0.6	1.2	1.19	0.37	1	2.44
5to. Evento	0.27	0.2	0.91	0.48	0.54	0.75	1.3	1.2	0.39	0.78	2.3
	0.16	0.32	0.75	0.62	0.45	0.82	0.95	1.01	0.56	1.18	1.88
	0.18	0.25	1.3	0.51	1.3	0.83	1.32	0.96	0.75	1.98	1.98
	0.13	0.34	0.98	0.7	1.17	0.47	0.98	1.3	0.62	1.68	1.49
	0.11	0.21	1.24	0.52	1.25	0.95	1.42	0.78	0.78	2.3	1.62
6to. Evento	0.2	0.27	0.92	0.71	1.35	0.66	1.1	1.54	0.62	2.1	2.35
	0.14	0.3	0.84	0.62	1.25	0.92	0.82	1.62	0.78	1.77	1.75

	0.09	0.36	1.25	0.55	1.3	1.01	1.36	1.4	0.85	1.8	1.63
	0.08	0.26	1.52	0.66	1.25	0.95	0.76	1.02	0.65	2.25	2.06
	0.07	0.15	0.85	0.64	0.84	0.66	1.22	0.83	0.42	1.3	1.45
7mo. Evento	0.1	0.2	0.65	0.6	0.76	0.52	0.93	0.73	0.36	1.33	1.49
	0.23	0.14	0.47	0.92	0.68	0.68	1.1	0.83	0.45	1.19	1.56
	0.09	0.12	0.96	0.46	0.94	0.58	1.2	0.89	0.43	1.26	1.38
	0.16	0.09	0.82	0.58	0.78	0.83	1.15	0.85	0.41	1.3	1.45
	0.09	0.36	0.72	0.62	0.88	0.79	1.55	0.81	0.53	1.19	1.36
8vo. Evento	0.12	0.18	0.58	0.5	0.98	0.68	1.4	0.92	0.61	1.23	1.49
	0.17	0.22	1.2	0.5	0.92	0.73	1.16	1.25	0.85	1.84	1.72
	0.13	0.2	0.98	0.65	0.89	0.75	1.12	1.3	0.98	1.68	1.8
	0.11	0.19	1.02	0.54	0.82	0.69	1.3	1.15	0.78	1.8	1.85
	0.1	0.18	0.88	0.48	0.86	0.72	1.16	1.2	0.78	1.82	1.75
9no. Evento	0.09	0.17	0.99	0.38	0.79	0.86	0.99	1.1	1	1.77	1.69
	0.09	0.25	0.92	0.59	1.1	0.71	1.12	1.4	0.85	1.8	1.66
	0.08	0.18	0.96	0.62	0.85	0.79	0.98	1.25	0.81	1.9	1.57
	0.15	0.22	0.5	0.65	0.82	0.66	0.8	1.02	0.65	1.84	1.95
	0.22	0.13	0.57	0.72	0.75	0.52	0.82	1.1	0.72	1.68	1.92
10mo. Evento	0.13	0.15	0.52	0.6	0.8	0.68	0.72	0.98	0.6	1.8	1.84
	0.21	0.24	0.49	0.65	0.82	0.58	0.83	1.01	0.65	1.82	1.9
	0.1	0.16	0.59	0.62	0.86	0.83	0.89	0.96	0.62	1.77	2.1
	0.16	0.1	0.62	0.66	0.96	0.79	0.75	1.05	0.59	1.55	1.99
	0.08	0.14	0.54	0.66	0.76	0.68	0.78	1.02	0.66	1.8	1.98
Promedio total	0.14	0.22	0.844	0.6	0.87	0.73	1.08	1.1	0.62	1.59	1.84
Desv. Estándar total	0.05	0.07	0.253	0.1	0.24	0.13	0.22	0.22	0.18	0.38	0.31

S/L Línea celular A-427 (1)

evento = 1

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.90309	1.144	0.184	0.42720

evento = 2

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.91045	1.057	0.074	0.47032

evento = 3

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.86841	1.553	0.643	0.26003

evento = 4

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.90309	1.144	0.184	0.42720

evento = 5

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.91045	1.057	0.074	0.47032

evento = 6

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
S/L	5	0.91045	1.057	0.074	0.47032



evento = 7	S/L	5	0.86841	1.553	0.643	0.26003
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 8	S/L	5	0.69790	3.566	2.361	0.00910
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 9	S/L	5	0.90309	1.144	0.184	0.42720
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 10	S/L	5	0.83696	1.925	1.008	0.15670
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	S/L	5	0.96746	0.384	-1.075	0.85874
<b>Evento 7 no tiene distribución normal</b>						

**BSA** Línea celular **A-427** (1)

evento = 1	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 2	BSA	5	0.97717	0.269	-1.398	0.91896
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 3	BSA	5	0.88734	1.330	0.402	0.34391
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 4	BSA	5	0.94843	0.609	-0.601	0.72598
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 5	BSA	5	0.97717	0.269	-1.398	0.91896
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 6	BSA	5	0.88734	1.330	0.402	0.34391
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 7	BSA	5	0.94843	0.609	-0.601	0.72598
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 8	BSA	5	0.85734	1.684	0.776	0.21884
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 9	BSA	5	0.76042	2.828	1.786	0.03707
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 10	BSA	5	0.98044	0.231	-1.530	0.93696
	Shapiro-Wilk W test for normal data					

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
BSA	5	0.91411	1.014	0.018	0.49266

Evento 8 no tiene distribución normal

Con A Línea celular A-427 (1)  
evento = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.96258	0.442	-0.938	0.82583

evento = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.93439	0.774	-0.323	0.62662

evento = 3

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.83915	1.899	0.984	0.16258

evento = 4

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.96258	0.442	-0.938	0.82583

evento = 5

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.93439	0.774	-0.323	0.62662

evento = 6

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.83915	1.899	0.984	0.16258

evento = 7

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.99668	0.039	-2.754	0.99706

evento = 8

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.95356	0.548	-0.715	0.76254

evento = 9

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.80738	2.274	1.323	0.09295

evento = 10

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Con A	5	0.96305	0.436	-0.950	0.82901

Todos tienen distribución normal

ALL Línea celular A-427 (1)  
evento = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.97435	0.303	-1.295	0.90239

evento = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.89050	1.293	0.359	0.35962

evento = 3

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.98070	0.228	-1.541	0.93834

evento = 4

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.97435	0.303	-1.295	0.90239

evento = 5

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.89050	1.293	0.359	0.35962

evento = 6

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.98070	0.228	-1.541	0.93834

evento = 7

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.85514	1.710	0.802	0.21132

evento = 8

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.82651	2.048	1.122	0.13095

evento = 9

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.88303	1.381	0.459	0.32325

evento = 10

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ALL	5	0.90168	1.161	0.204	0.41925

Todos tienen distribución normal

**LCA** Línea celular **A-427** (1)

evento = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.75933	2.841	1.796	0.03623

evento = 2

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.79883	2.375	1.410	0.07927

evento = 3

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.76658	2.755	1.727	0.04208

evento = 4

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.75933	2.841	1.796	0.03623

evento = 5

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.79883	2.375	1.410	0.07927

evento = 6

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.76658	2.755	1.727	0.04208
evento = 7					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.96746	0.384	-1.075	0.85874
evento = 8					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.99174	0.098	-2.181	0.98542
evento = 9					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.80049	2.355	1.393	0.08178
evento = 10					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
LCA	5	0.93662	0.748	-0.364	0.64214

Evento 1, 3, 4 y 6 no tiene distribución normal

**PNA** Línea celular A-427 (1)

evento = 1					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.98353	0.194	-1.670	0.95258
evento = 2					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.88930	1.307	0.376	0.35361
evento = 3					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.60429	4.671	3.189	0.00071
evento = 4					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.98353	0.194	-1.670	0.95258
evento = 5					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.88930	1.307	0.376	0.35361
evento = 6					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.60429	4.671	3.189	0.00071
evento = 7					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.93885	0.722	-0.406	0.65780
evento = 8					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
PNA	5	0.95063	0.583	-0.649	0.74170
evento = 9					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z

evento = 10	PNA	5	0.98149	0.218	-1.576	0.94245
			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	PNA	5	0.96338	0.432	-0.959	0.83128

**Evento 3 y 6 no tiene distribución normal**

**LPA** Línea celular **A-427** (1)

evento = 1			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.93645	0.750	-0.361	0.64095
evento = 2			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.84778	1.797	0.887	0.18761
evento = 3			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.92767	0.854	-0.203	0.58055
evento = 4			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.93645	0.750	-0.361	0.64095
evento = 5			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.84778	1.797	0.887	0.18761
evento = 6			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.92767	0.854	-0.203	0.58055
evento = 7			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.91959	0.949	-0.068	0.52729
evento = 8			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.88615	1.344	0.418	0.33811
evento = 9			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.91333	1.023	0.030	0.48787
evento = 10			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	LPA	5	0.96593	0.402	-1.030	0.84853

**Todos tienen distribución normal**

**SNA** Línea celular **A-427** (1)

evento = 1			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	SNA	5	0.88935	1.306	0.375	0.35384
evento = 2			Shapiro-Wilk W test for normal data			
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z

evento = 3	SNA	5	0.97162	0.335	-1.203	0.88555
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 4	SNA	5	0.90499	1.122	0.156	0.43806
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 5	SNA	5	0.88935	1.306	0.375	0.35384
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 6	SNA	5	0.97162	0.335	-1.203	0.88555
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 7	SNA	5	0.90499	1.122	0.156	0.43806
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 8	SNA	5	0.95563	0.524	-0.763	0.77725
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 9	SNA	5	0.88084	1.407	0.487	0.31312
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 10	SNA	5	0.93312	0.789	-0.300	0.61780
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
	SNA	5	0.98097	0.225	-1.552	0.93972

Todos tienen distribución normal

**MAA** Línea celular **A-427** (1)

evento = 1	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 2	MAA	5	0.68069	3.769	2.515	0.00595
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 3	MAA	5	0.94006	0.708	-0.430	0.66639
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 4	MAA	5	0.95920	0.482	-0.850	0.80240
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 5	MAA	5	0.93249	0.797	-0.288	0.61347
	Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
evento = 6	MAA	5	0.94006	0.708	-0.430	0.66639

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
MAA	5	0.95920	0.482	-0.850	0.80240
evento = 7					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
MAA	5	0.96916	0.364	-1.126	0.86982
evento = 8					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
MAA	5	0.99377	0.074	-2.369	0.99109
evento = 9					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
MAA	5	0.97723	0.269	-1.400	0.91931
evento = 10					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
MAA	5	0.92288	0.910	-0.122	0.54868
<b>Evento 1 no tiene distribución normal</b>					

**WGA** Línea celular **A-427** (1)  
evento = 1

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.67987	3.779	2.522	<b>0.00583</b>
evento = 2					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.97293	0.320	-1.246	0.89368
evento = 3					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.94731	0.622	-0.577	0.71800
evento = 4					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.67987	3.779	2.522	<b>0.00583</b>
evento = 5					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.97293	0.320	-1.246	0.89368
evento = 6					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.94731	0.622	-0.577	0.71800
evento = 7					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.66829	3.916	2.625	<b>0.00433</b>
evento = 8					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.73654	3.110	2.010	<b>0.02223</b>
evento = 9					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.98984	0.120	-2.036	0.97911

evento = 10

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
WGA	5	0.71592	3.353	2.199	0.01395

Evento 1, 4, 7, 8 y 10 no tiene distribución normal

ABA Línea celular A-427 (1)

evento = 1	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.73391	3.141	2.034	0.02098
evento = 2	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.97073	0.345	-1.175	0.87995
evento = 3	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.96150	0.455	-0.909	0.81837
evento = 4	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.73391	3.141	2.034	0.02098
evento = 5	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.97073	0.345	-1.175	0.87995
evento = 6	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.96150	0.455	-0.909	0.81837
evento = 7	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.95326	0.552	-0.708	0.76047
evento = 8	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.86745	1.565	0.655	0.25625
evento = 9	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.88236	1.389	0.467	0.32015
evento = 10	Shapiro-Wilk W test for normal data				
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
ABA	5	0.97329	0.315	-1.259	0.89590

Evento 1 y 4 no tiene distribución normal

A-427 (S/L) evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Mean
1	.156
2	.17
3	.116
4	.156
5	.17
6	.116



7	.134
8	.126
9	.126
10	.136
-----	
Total	.1406

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.019522	9	.002169111	0.85	0.5792
Within groups	.102560006	40	.002564		
-----					
Total	.122082006	49	.00249147		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 7.2146 Prob>chi2 = 0.615

Comparison of S/L by EVENTO (Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.014 1.000					
3	-.04 1.000	-.054 1.000				
4	0 1.000	-.014 1.000	.04 1.000			
5	.014 1.000	0 1.000	.054 1.000	.014 1.000		
6	-.04 1.000	-.054 1.000	0 1.000	-.04 1.000	-.054 1.000	
7	-.022 1.000	-.036 1.000	.018 1.000	-.022 1.000	-.036 1.000	.018 1.000
8	-.03 1.000	-.044 1.000	.01 1.000	-.03 1.000	-.044 1.000	.01 1.000
9	-.03 1.000	-.044 1.000	.01 1.000	-.03 1.000	-.044 1.000	.01 1.000
10	-.02 1.000	-.034 1.000	.02 1.000	-.02 1.000	-.034 1.000	.02 1.000

Row Mean- Col Mean	7	8	9
8	-.008 1.000		
9	-.008 1.000	3.0e-09 1.000	
10	.002 1.000	.01 1.000	.01 1.000

kwallis **s/l**, by(evento), if lineas==1  
 Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	160.00
2	5	165.00
3	5	86.50
4	5	160.00

5	5	165.00
6	5	86.50
7	5	116.50
8	5	111.50
9	5	101.50
10	5	122.50

chi-squared = 8.814 with 9 d.f. probability = 0.4546  
 chi-squared with ties = 8.878 with 9 d.f. probability = 0.4486

**A-427 (BSA) evento, means bonferroni, if lineas==1**

EVENTO	Summary of BSA Mean
1	.274
2	.264
3	.26800001
4	.274
5	.264
6	.26800001
7	.182
8	.194
9	.19
10	.158
Total	.2336

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.096632001	9	.010736889	2.89	0.0099
Within groups	.14852001	40	.003713		
Total	.245152011	49	.005003102		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 21.3493 Prob>chi2 = 0.011

Comparison of BSA by EVENTO (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-.01 1.000					
3	-.006 1.000	.004 1.000				
4	0 1.000	.01 1.000	.006 1.000			
5	-.01 1.000	0 1.000	-.004 1.000	-.01 1.000		
6	-.006 1.000	.004 1.000	0 1.000	-.006 1.000	.004 1.000	
7	-.092 0.981	-.082 1.000	-.086 1.000	-.092 0.981	-.082 1.000	-.086 1.000
8	-.08 1.000	-.07 1.000	-.074 1.000	-.08 1.000	-.07 1.000	-.074 1.000
9	-.084 1.000	-.074 1.000	-.078 1.000	-.084 1.000	-.074 1.000	-.078 1.000
10	-.116	-.106	-.11	-.116	-.106	-.11

	0.203	0.400	0.306	0.203	0.400	0.306
Row Mean-						
Col Mean	7	8	9			
8	.012					
	1.000					
9	.008	-.004				
	1.000	1.000				
10	-.024	-.036	-.032			
	1.000	1.000	1.000			

kwallis **BSA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	175.00
2	5	156.00
3	5	164.50
4	5	175.00
5	5	156.00
6	5	164.50
7	5	76.00
8	5	81.00
9	5	77.50
10	5	49.50

chi-squared = 20.963 with 9 d.f. probability = 0.0128  
 chi-squared with ties = 21.042 with 9 d.f. probability = 0.0125

**A-427 (Con A)** evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of CON A Mean
1	.798
2	1.036
3	1.076
4	.798
5	1.036
6	1.076
7	.72399999
8	.93200001
9	.788
10	.552
Total	.8816

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1.41007201	9	.156674668	3.61	0.0023
Within groups	1.73779992	40	.043444998		
Total	3.14787194	49	.064242284		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 22.4042 Prob>chi2 = 0.008

Comparison of CON A by EVENTO  
(Bonferroni)

Row Mean-	1	2	3	4	5	6
Col Mean						

2	.238					
	1.000					
3	.278	.04				
	1.000	1.000				
4	0	-.238	-.278			
	1.000	1.000	1.000			
5	.238	0	-.04	.238		
	1.000	1.000	1.000	1.000		
6	.278	.04	0	.278	.04	
	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
7	-.074	-.312	-.352	-.074	-.312	-.352
	1.000	1.000	0.491	1.000	1.000	0.491
8	.134	-.104	-.144	.134	-.104	-.144
	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	-.01	-.248	-.288	-.01	-.248	-.288
	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	-.246	-.484	-.524	-.246	-.484	-.524
	1.000	0.032	0.013	1.000	0.032	0.013
Row Mean-						
Col Mean		7	8	9		
8	.208					
	1.000					
9	.064	-.144				
	1.000	1.000				
10	-.172	-.38	-.236			
	1.000	0.284	1.000			

kwallis **Con A**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	96.00
2	5	174.00
3	5	177.00
4	5	96.00
5	5	174.00
6	5	177.00
7	5	79.50
8	5	156.00
9	5	117.50
10	5	28.00

chi-squared = 22.895 with 9 d.f. probability = 0.0064  
 chi-squared with ties = 22.923 with 9 d.f. probability = 0.0064

**A-427 (ALL)** evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of ALL Mean
1	.61
2	.56599999

3		.636
4		.61
5		.56599999
6		.636
7		.63600001
8		.534
9		.592
10		.63800001
-----		
Total		.6024

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.061032017	9	.006781335	0.86	0.5685
Within groups	.315880006	40	.007897		
-----					
Total	.376912023	49	.007692082		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 18.1222 Prob>chi2 = 0.034

Comparison of ALL by EVENTO (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
-----						
2	-.044 1.000					
3	.026 1.000	.07 1.000				
4	0 1.000	.044 1.000	-.026 1.000			
5	-.044 1.000	0 1.000	-.07 1.000	-.044 1.000		
6	.026 1.000	.07 1.000	0 1.000	.026 1.000	.07 1.000	
7	.026 1.000	.07 1.000	6.0e-09 1.000	.026 1.000	.07 1.000	6.0e-09 1.000
8	-.076 1.000	-.032 1.000	-.102 1.000	-.076 1.000	-.032 1.000	-.102 1.000
9	-.018 1.000	.026 1.000	-.044 1.000	-.018 1.000	.026 1.000	-.044 1.000
10	.028 1.000	.072 1.000	.002 1.000	.028 1.000	.072 1.000	.002 1.000
-----						
Row Mean- Col Mean	7	8	9			
-----						
8	-.102 1.000					
9	-.044 1.000	.058 1.000				
10	.002 1.000	.104 1.000	.046 1.000			

kwallis **ALL**, by(evento), if lines==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

+-----+			
evento	Obs	Rank	Sum

1	5	129.50
2	5	97.50
3	5	166.00
4	5	129.50
5	5	97.50
6	5	166.00
7	5	119.50
8	5	66.00
9	5	135.00
10	5	168.50

chi-squared = 9.747 with 9 d.f. probability = 0.3714  
 chi-squared with ties = 9.823 with 9 d.f. probability = 0.3650

**A-427 (LCA) evento, means bonferroni, if lineas==1**

EVENTO	Summary of LCA Mean
1	.578
2	.94199998
3	1.198
4	.578
5	.94199998
6	1.198
7	.80799999
8	.89400001
9	.86200001
10	.84
Total	.884

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	1.9974399	9	.221937767	4.71	0.0003
Within groups	1.88435992	40	.047108998		
Total	3.88179982	49	.079220405		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 34.4112 Prob>chi2 = 0.000

Comparison of LCA by EVENTO (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.364 0.514					
3	.62 0.002	.256 1.000				
4	0 1.000	-.364 0.514	-.62 0.002			
5	.364 0.514	0 1.000	-.256 1.000	.364 0.514		
6	.62 0.002	.256 1.000	0 1.000	.62 0.002	.256 1.000	
7	.23 1.000	-.134 1.000	-.39 0.317	.23 1.000	-.134 1.000	-.39 0.317
8	.316 1.000	-.048 1.000	-.304 1.000	.316 1.000	-.048 1.000	-.304 1.000

9	.284	-.08	-.336	.284	-.08	-.336
	1.000	1.000	0.849	1.000	1.000	0.849
10	.262	-.102	-.358	.262	-.102	-.358
	1.000	1.000	0.573	1.000	1.000	0.573
Row Mean-						
Col Mean	7	8	9			
8	.086					
	1.000					
9	.054	-.032				
	1.000	1.000				
10	.032	-.054	-.022			
	1.000	1.000	1.000			

Kwallis **LCA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	45.50
2	5	132.50
3	5	204.50
4	5	45.50
5	5	132.50
6	5	204.50
7	5	114.50
8	5	149.50
9	5	122.00
10	5	124.00

chi-squared = 24.519 with 9 d.f. probability = 0.0036  
 chi-squared with ties = 24.591 with 9 d.f. probability = 0.0035

**A-427 (PNA)** evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of PNA Mean
1	.70400001
2	.76399999
3	.84000001
4	.70400001
5	.76399999
6	.84000001
7	.68
8	.71400001
9	.708
10	.712
Total	.743

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.148690007	9	.016521112	0.92	0.5192
Within groups	.71935995	40	.017983999		
Total	.868049957	49	.017715305		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 13.0508 Prob>chi2 = 0.160

Comparison of **PNA** by EVENTO  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.06 1.000					
3	.136 1.000	.076 1.000				
4	0 1.000	-.06 1.000	-.136 1.000			
5	.06 1.000	0 1.000	-.076 1.000	.06 1.000		
6	.136 1.000	.076 1.000	0 1.000	.136 1.000	.076 1.000	
7	-.024 1.000	-.084 1.000	-.16 1.000	-.024 1.000	-.084 1.000	-.16 1.000
8	.01 1.000	-.05 1.000	-.126 1.000	.01 1.000	-.05 1.000	-.126 1.000
9	.004 1.000	-.056 1.000	-.132 1.000	.004 1.000	-.056 1.000	-.132 1.000
10	.008 1.000	-.052 1.000	-.128 1.000	.008 1.000	-.052 1.000	-.128 1.000

Row Mean- Col Mean	7	8	9
8	.034 1.000		
9	.028 1.000	-.006 1.000	
10	.032 1.000	-.002 1.000	.004 1.000

kwallis **PNA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	107.00
2	5	150.00
3	5	161.50
4	5	107.00
5	5	150.00
6	5	161.50
7	5	97.00
8	5	118.50
9	5	111.50
10	5	111.00

chi-squared = 5.369 with 9 d.f. probability = 0.8010  
 chi-squared with ties = 5.413 with 9 d.f. probability = 0.7970

**A-427 (LPA)** evento, means bonferroni, if lineas==1

| Summary of



EVENTO	LPA Mean
1	1.158
2	1.194
3	1.052
4	1.158
5	1.194
6	1.052
7	1.186
8	1.228
9	.94200001
10	.79399999
Total	1.0958

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.856057972	9	.095117552	3.00	0.0079
Within groups	1.26815998	40	.031704		
Total	2.12421795	49	.043351387		

Bartlett's test for equal variances:  $\chi^2(9) = 20.6801$  Prob> $\chi^2 = 0.014$

Comparison of LPA by EVENTO  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.036 1.000					
3	-.106 1.000	-.142 1.000				
4	0 1.000	-.036 1.000	.106 1.000			
5	.036 1.000	0 1.000	.142 1.000	.036 1.000		
6	-.106 1.000	-.142 1.000	0 1.000	-.106 1.000	-.142 1.000	
7	.028 1.000	-.008 1.000	.134 1.000	.028 1.000	-.008 1.000	.134 1.000
8	.07 1.000	.034 1.000	.176 1.000	.07 1.000	.034 1.000	.176 1.000
9	-.216 1.000	-.252 1.000	-.11 1.000	-.216 1.000	-.252 1.000	-.11 1.000
10	-.364 <b>0.111</b>	-.4 <b>0.045</b>	-.258 1.000	-.364 <b>0.111</b>	-.4 <b>0.045</b>	-.258 1.000
Row Mean- Col Mean	7	8	9			
8	.042 1.000					
9	-.244 1.000	-.286 <b>0.679</b>				
10	-.392 <b>0.055</b>	-.434 <b>0.019</b>	-.148 1.000			

kwallis **LPA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	147.00
2	5	162.50
3	5	115.50
4	5	147.00
5	5	162.50
6	5	115.50
7	5	146.00
8	5	176.50
9	5	73.50
10	5	29.00

chi-squared = 17.751 with 9 d.f. probability = 0.0382  
 chi-squared with ties = 17.807 with 9 d.f. probability = 0.0375

**A-427 (SNA) evento, means bonferroni, if lineas==1**

EVENTO	Summary of SNA Mean
1	1.224
2	1.05
3	1.282
4	1.224
5	1.05
6	1.282
7	.822
8	1.164
9	1.174
10	1.004
Total	1.1276

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	.95227202	9	.105808002	2.78	0.0125
Within groups	1.52263999	40	.038066		
Total	2.47491201	49	.050508408		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 28.8827 Prob>chi2 = 0.001

Comparison of SNA by EVENTO (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-.174 1.000					
3	.058 1.000	.232 1.000				
4	0 1.000	.174 1.000	-.058 1.000			
5	-.174 1.000	0 1.000	-.232 1.000	-.174 1.000		
6	.058 1.000	.232 1.000	0 1.000	.058 1.000	.232 1.000	

7	-.402 0.103	-.228 1.000	-.46 0.027	-.402 0.103	-.228 1.000	-.46 0.027
8	-.06 1.000	.114 1.000	-.118 1.000	-.06 1.000	.114 1.000	-.118 1.000
9	-.05 1.000	.124 1.000	-.108 1.000	-.05 1.000	.124 1.000	-.108 1.000
10	-.22 1.000	-.046 1.000	-.278 1.000	-.22 1.000	-.046 1.000	-.278 1.000
Row Mean-						
Col Mean	7	8	9			
8	.342 0.379					
9	.352 0.307	.01 1.000				
10	.182 1.000	-.16 1.000	-.17 1.000			

kwallis **SNA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	164.00
2	5	102.50
3	5	167.50
4	5	164.00
5	5	102.50
6	5	167.50
7	5	28.00
8	5	146.50
9	5	149.00
10	5	83.50

chi-squared = 18.611 with 9 d.f. probability = 0.0287  
 chi-squared with ties = 18.664 with 9 d.f. probability = 0.0282

**A-427 (MAA)** evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of MAA Mean
1	.52400001
2	.61999999
3	.66399999
4	.404
5	.61999999
6	.66399999
7	.436
8	.8
9	.80600001
10	.624
Total	.6162

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.802338001	9	.089148667	4.25	0.0006

Within groups .838840036 40 .020971001

Total 1.64117804 49 .033493429

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 21.2487 Prob>chi2 = 0.012

Comparison of MAA by EVENTO  
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.096 1.000					
3	.14 1.000	.044 1.000				
4	-.12 1.000	-.216 1.000	-.26 0.319			
5	.096 1.000	0 1.000	-.044 1.000	.216 1.000		
6	.14 1.000	.044 1.000	0 1.000	.26 0.319	.044 1.000	
7	-.088 1.000	-.184 1.000	-.228 0.767	.032 1.000	-.184 1.000	-.228 0.767
8	.276 0.201	.18 1.000	.136 1.000	.396 0.004	.18 1.000	.136 1.000
9	.282 0.168	.186 1.000	.142 1.000	.402 0.004	.186 1.000	.142 1.000
10	.1 1.000	.004 1.000	-.04 1.000	.22 0.947	.004 1.000	-.04 1.000
Row Mean- Col Mean	7	8	9			
8	.364 0.013					
9	.37 0.011	.006 1.000				
10	.188 1.000	-.176 1.000	-.182 1.000			

kwallis **MAA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	87.00
2	5	126.00
3	5	152.00
4	5	43.00
5	5	126.00
6	5	152.00
7	5	57.00
8	5	196.50
9	5	203.00
10	5	132.50

chi-squared = 23.945 with 9 d.f. probability = 0.0044

chi-squared with ties = 24.055 with 9 d.f. probability = 0.0042

A-427 (WGA)evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of WGA	
	Mean	
1	1.254	
2	1.584	
3	1.844	
4	1.254	
5	1.584	
6	1.844	
7	1.254	
8	1.674	
9	1.798	
10	1.748	
Total	1.5838	

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	2.71345766	9	.301495295	2.10	0.0525
Within groups	5.74152017	40	.143538004		
Total	8.45497783	49	.172550568		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 28.5194 Prob>chi2 = 0.001

Comparison of WGA by EVENTO (Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	.33 1.000					
3	.59 0.819	.26 1.000				
4	0 1.000	-.33 1.000	-.59 0.819			
5	.33 1.000	0 1.000	-.26 1.000	.33 1.000		
6	.59 0.819	.26 1.000	0 1.000	.59 0.819	.26 1.000	
7	2.4e-08 1.000	-.33 1.000	-.59 0.819	2.4e-08 1.000	-.33 1.000	-.59 0.819
8	.42 1.000	.09 1.000	-.17 1.000	.42 1.000	.09 1.000	-.17 1.000
9	.544 1.000	.214 1.000	-.046 1.000	.544 1.000	.214 1.000	-.046 1.000
10	.494 1.000	.164 1.000	-.096 1.000	.494 1.000	.164 1.000	-.096 1.000
Row Mean- Col Mean	7	8	9			
8	.42 1.000					
9	.544 1.000	.124 1.000				

10	.494	.074	-.05
	1.000	1.000	1.000

Kwallis **WGA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	68.50
2	5	128.50
3	5	171.00
4	5	68.50
5	5	128.50
6	5	171.00
7	5	81.00
8	5	146.00
9	5	162.00
10	5	150.00

chi-squared = 14.070 with 9 d.f. probability = 0.1199  
 chi-squared with ties = 14.125 with 9 d.f. probability = 0.1179

**A-427 (ABA)** evento, means bonferroni, if lineas==1

EVENTO	Summary of ABA	
	Mean	
1	2.296	
2	1.854	
3	1.848	
4	2.296	
5	1.854	
6	1.848	
7	1.448	
8	1.722	
9	1.758	
10	1.962	
Total	1.8886	

Source	Analysis of Variance				
	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	2.90984201	9	.323315779	6.05	0.0000
Within groups	2.13915956	40	.053478989		
Total	5.04900157	49	.103040848		

Bartlett's test for equal variances: chi2(9) = 24.1693 Prob>chi2 = 0.004

Comparison of ABA by EVENTO (Bonferroni)						
Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-.442 0.196					
3	-.448 0.176	-.006 1.000				
4	0 1.000	.442 0.196	.448 0.176			
5	-.442	0	.006	-.442		

	0.196	1.000	1.000	0.196		
6	-.448	-.006	0	-.448	-.006	
	0.176	1.000	1.000	0.176	1.000	
7	-.848	-.406	-.4	-.848	-.406	-.4
	0.000	0.375	0.416	0.000	0.375	0.416
8	-.574	-.132	-.126	-.574	-.132	-.126
	0.015	1.000	1.000	0.015	1.000	1.000
9	-.538	-.096	-.09	-.538	-.096	-.09
	0.031	1.000	1.000	0.031	1.000	1.000
10	-.334	.108	.114	-.334	.108	.114
	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Row Mean-						
Col Mean	7	8	9			
8	.274					
	1.000					
9	.31	.036				
	1.000	1.000				
10	.514	.24	.204			
	0.050	1.000	1.000			

kwallis **ABA**, by(evento), if lineas==1

Test: Equality of populations (Kruskal-Wallis test)

evento	Obs	Rank Sum
1	5	211.50
2	5	122.00
3	5	120.50
4	5	211.50
5	5	122.00
6	5	120.50
7	5	24.50
8	5	91.50
9	5	101.00
10	5	150.00

chi-squared = 25.773 with 9 d.f. probability = 0.0022

chi-squared with ties = 25.824 with 9 d.f. probability = 0.0022