



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

***“IDENTIFICACIÓN DE MODIFICACIONES DE LA O-  
GLICOSILACIÓN DE TIPO MUCÍNICO EN LÍNEAS  
CELULARES DE CÁNCER CERVICAL”***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ITZEL DANIELA RODRÍGUEZ FARFÁN**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora Ana Esther Aguilar Cárdenas

**VOCAL:** Profesora Patricia Elvira Berron Ruiz

**SECRETARIO:** Profesor Carlos Josué Solórzano Mata

**1<sup>er</sup>. SUPLENTE:** Profesor Euclides Ávila Chávez

**2<sup>o</sup>. SUPLENTE:** Profesora Rosa Elena Sarmiento Silva

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE  
INMUNOLOGÍA (6) DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Carlos Josué Solórzano Mata**

---

**FIRMA**

**SUSTENTANTE:**

**Itzel Daniela Rodríguez Farfán**

---

**FIRMA**

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer a todas las personas que participaron directa o indirectamente en el desarrollo de la presente Tesis, leyendo, opinando, teniéndome paciencia, dándome ánimo.*

*Agradezco a la Dra. Concepción Agundis Mata por permitirme trabajar en su laboratorio, a mi asesor por darme esta oportunidad y a la Dra. Guadalupe Maldonado Mercado por su apoyo y amistad.*

*Agradezco a todos mis compañeros del Laboratorio 6 del departamento de bioquímica en la Facultad de Medicina por su apoyo.*

*Gracias también a todos los amigos que forjé al cursar la carrera y que me permitieron compartir con ellos momentos maravillosos: Lupita Lira, Lupita Viguera, Lili, Ale, Ara Gus, Jorge, Mau, Fer, Pepe y por supuesto a todos mis compañeros de la carrera.*

*A mis padres y a mi hermana que me acompañaron y apoyaron de forma incondicional para terminar mis estudios de licenciatura y a esa persona tan especial que me impulso y acompañó en este camino, Humberto.*

*¡Gracias a todos!*

## ÍNDICE

I. Introducción	
Epidemiología del cáncer cervicouterino	6
Etiología y carcinogénesis cervical	6
Clasificación del cáncer cervicouterino	8
Herramientas moleculares empleadas para detectar el cáncer cervicouterino	11
II. Antecedentes	
Glicosilación	13
Estructura y biosíntesis de O-glicanos	14
Cambios en la O-glicosilación y cáncer	16
Modificaciones de la O-glicosilación en cáncer cervicouterino	17
Lectinas en el análisis de glicoconjugados	18
III. Planteamiento del problema	20
IV. Objetivo	21
V. Hipótesis	21
VI. Materiales y Métodos	
Líneas celulares	22
Tejidos	22
Lectinas	23
Purificación de la lectina de <i>Amarantus Leucocarpus</i>	23
Mantenimiento de las líneas celulares	24
Inmunocitoquímica	25
Fijado e inclusión de las muestras en parafina	26
Técnica básica de hematoxilina y eosina	26
Inmunohistoquímica	27
VII. Resultados	
Líneas celulares	28
Análisis histoquímico de tejidos	
Tejido sano	32

Tejido canceroso	34
VIII. Discusión	37
IX. Conclusión	41
X. Perspectivas	42
XI. Anexo I. Abreviaturas	43
XII. Anexo II. Glosario	44
XII. Bibliografía	46

## I. INTRODUCCIÓN

### **Epidemiología del cáncer cervicouterino**

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres de todo el mundo y la principal causa de muerte asociada a cáncer en los países en desarrollo. En el 2005 fueron diagnosticados 500,000 casos nuevos de CaCu a nivel mundial (22). El CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas entre la población femenina de México. En el 2006 se registraron 4114 muertes por esta causa (54, 79). Los factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad son: inicio de la vida sexual a una edad temprana, el número de compañeros sexuales, el número de partos, la infección por el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, antecedentes de enfermedades venéreas y tabaquismo (41). La mortalidad por CaCu en México se redujo 25% en 1998 y 18% a partir del 2001 debido a un incremento en los fondos invertidos en los estudios de Papanicolaou y al decremento en la tasa de natalidad (42, 74). La detección temprana de lesiones precursoras de CaCu por tamizaje, y su tratamiento, son las medidas más importantes para el control del CaCu (18).

### **Etiología y Carcinogénesis cervical**

Aproximadamente un 85% de los carcinomas cervicales contienen ADN de VPH integrado a su genoma, por lo que es considerado el factor de riesgo más importante del CaCu (79) además, el virus es considerado el agente infeccioso responsable de la transformación del epitelio cervical (49) sin embargo, la infección por VPH a pesar de ser un factor necesario para el desarrollo del tumor no es considerado un factor suficiente (81). El VPH es un virus no envuelto que

pertenece a la familia *papovaviridae*, cuyo genoma está constituido por una molécula de ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pares de bases. Hasta ahora, se han descrito más de 150 genotipos de VPH, cada uno con especificidad al epitelio que infecta y al tipo de lesiones que produce. Aproximadamente 40 de ellos infectan la mucosa genital (36, 57).

Los VPH se clasifican en tipos de alto o bajo riesgo dependiendo de su presencia en lesiones malignas del cuello uterino. Los tipos de alto riesgo como el 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 58, etc. principalmente se asocian con más del 90% de los casos de cáncer de cérvix. De estos tipos, el VPH 16 está presente aproximadamente en el 50% de todos los casos de cánceres de cuello uterino, mientras que VPH 18 está involucrado entre el 10-20% de los casos (57). El genoma del VPH codifica 7 u 8 genes de expresión temprana (E1 a E8), dependiendo del virus y dos genes de expresión tardía o estructurales (L1 y L2). Con el propósito de favorecer la integración del ADN viral, la ruptura del genoma circular en los genes E1 o E2, sobrelleva a su inactivación, lo que impide la replicación vírica, aunque no evita la expresión de otros genes, como E6 y E7 (55).

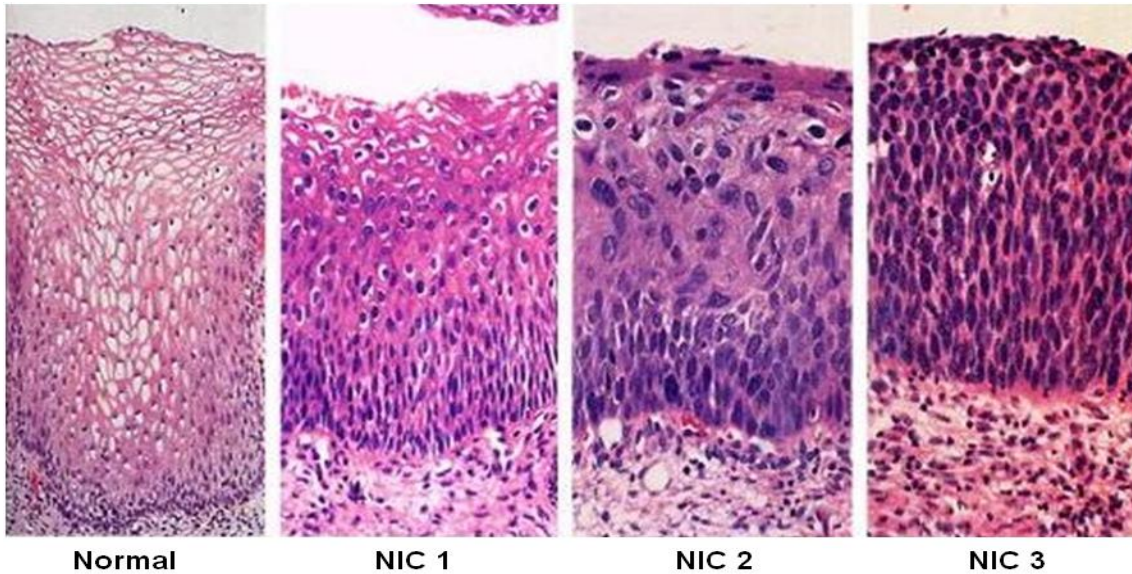
La proteína E7 se une a la forma no fosforilada de la proteína (pRb) codificada por el gen del retinoblastoma y desplaza a los factores de transcripción E2F que normalmente están unidos por pRb. Estos factores de transcripción actúan en la interface G1/S del ciclo celular. La proteína E6 se une y facilita la degradación de la proteína p53. La afinidad de estas proteínas virales por los productos de los genes supresores de tumores varía en función del potencial oncogénico del VPH (36). En ausencia de las proteínas supresoras del crecimiento celular, la célula es más vulnerable a mutaciones, aberraciones cromosómicas, etc. y por tanto daría lugar a una neoplasia (55). Las oncoproteínas E6 y E7 de VPH son factores esenciales para la inmortalización celular, la transformación y la carcinogénesis inducida por el virus (57).



## **Clasificación del cáncer cervicouterino**

La progresión del cáncer cervicouterino se encuentra bien caracterizado dentro de su desarrollo desde el punto de vista histológico. La clasificación del Sistema Bethesda, organiza las lesiones asociadas a VPH en: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LSIH) y cáncer invasivo. En esta clasificación se incluyen las lesiones anteriormente agrupadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 1, 2 y 3 que se describen en la tabla 1 y figura 1 (69). En la clasificación de Sistema Bethesda la LSIL corresponde al condiloma plano y NIC 1, mientras que LISH corresponde al diagnóstico histológico de NIC 2 y NIC 3 (7).

El carcinoma invasor se clasifica como adenocarcinoma y epidermoide (o escamoso). El carcinoma epidermoide corresponde al 93% de los carcinomas de cuello uterino, mientras que el adenocarcinoma constituye el 6% de los tumores de cuello uterino (5). La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) ha definido un sistema de estadiaje del carcinoma de cérvix, mostrado en la Tabla 2, que se relaciona directamente con la supervivencia y el control de la enfermedad a nivel pélvico. La estadificación se realiza en base a los hallazgos clínicos y a los estudios radiológicos, y no se modifica por hallazgos posteriores. (80).



**Figura 1. Imágenes microscópicas de tejido cervical normal, NIC 1, NIC 2 y NIC 3.**  
**Modificada de [www.cancerquest.com](http://www.cancerquest.com).**

<b>NIC 1</b>	Existe buena maduración, con mínimas anomalías nucleares y pocas figuras mitóticas. Las células indiferenciadas se encuentran en las capas epiteliales más profundas (tercio inferior). Se observan figuras mitóticas, pero no muchas.
<b>NIC 2</b>	Se caracteriza por cambios celulares displásicos restringidos sobre todo a la mitad o los dos tercios inferiores del epitelio, con anomalías nucleares más marcadas que en la NIC 1. Pueden verse figuras mitóticas en toda la mitad inferior del epitelio.
<b>NIC 3</b>	La diferenciación y la estratificación pueden faltar por completo o existir solo en el cuarto superficial del epitelio, con abundantes figuras mitóticas. Las anomalías nucleares aparecen en todo el espesor del epitelio. Muchas figuras mitóticas tienen formas anormales.

**Tabla 1. Características de las displasias**

Etapa O: Cáncer <i>in situ</i> o intraepitelial
Etapa I: Estrictamente limitado al cérvix (sin extensión al cuerpo)
IA: Cáncer pre-clínico o microscópico
IA1: Invasión del estroma <3 mm de profundidad y con extensión menor a 7 mm
IA2: Invasión del estroma entre 3-5 mm bajo la membrana basal del epitelio superficial o glandular y con una extensión menor a 7 mm.
IB: Lesiones clínicas confinadas al cérvix o preclínicas con dimensión mayor que IA2
IB1: Lesiones clínicas menores de 4 cm
IB2: Lesiones clínicas mayores de 4 cm
Etapa II: Con extensión fuera del cérvix, sin alcanzar la pared pélvica o la porción inferior de la vagina.
IIA: Compromiso del 1/3 superior de la vagina. Sin compromiso de paramétrios
IIB: Compromiso de paramétrios
Etapa III: Compromiso del 1/3 inferior de la vagina o pared pélvica o ureteral sin otra causa.
IIIA: Hasta 1/3 inferior de la vagina
IIIB: Hasta pared pélvica o compromiso ureteral
Etapa IV: Compromiso de órganos adyacentes.
IIVA: Compromiso de órganos adyacentes
IIVB: Compromiso de órganos a distancia

**Tabla 2. Clasificación FIGO de los tumores de cérvix**

## **Herramientas moleculares empleadas para detectar el cáncer cervicouterino**

Actualmente el diagnóstico de CaCu se realiza principalmente por citología exfoliativa del cuello uterino procesada por la técnica de Papanicolaou, complementario a este procedimiento se puede hacer uso de la biopsia y de la colposcopia. La citología cervical constituye uno de los métodos más eficientes para determinar la presencia de células anormales en el cuello uterino, y a pesar de no ser un método infalible, detecta el 95% de cánceres cervicales en estado asintomático. Las lesiones premalignas pueden ser tratadas de manera relativamente fácil y con menores efectos secundarios (18).

La medición de marcadores tumorales en el nivel de los fluidos del cuerpo humano, principalmente en suero puede ser útil para el diagnóstico, monitoreo de la terapia y la detección temprana. El antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC-Ag), Cifra 21-1, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carbohidrato 125 (CA 125) y antígeno polipéptido tisular específico (TPS) tienen un valor clínico en CaCu a pesar de su diversa significancia. Otros marcadores biológicos que podrían medirse en suero, así como en tejido tumoral son citocinas: factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), interleucina 6 (IL-6), IL-8, IL-4, IL-10, leptina, factor de unidad del estroma (SDF-1), aunque la evaluación de su importancia requiere un estudio más. La elevación de marcadores de hipoxia en CaCu, tales como el factor inducible de hipoxia 1 (HIF 1), anhidrasa carbónica 9 (CA 9), GLUT-1 se combina con un pobre pronóstico en la evolución clínica (52).

Dada la relación causal entre la infección persistente de papilomavirus humanos de alto riesgo y el desarrollo de NIC de alto grado y cáncer cervical, las pruebas para detectar VPH de alto riesgo se realizan además de la citología, para la detección de lesiones cervicales clínicamente relevantes. Todas las pruebas para detectar al VPH se basan en la presencia de ácido nucleico viral. Los métodos de detección de VPH incluyen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación reversa, PCR en tiempo real y captura de híbridos. La combinación de

las pruebas citológicas y moleculares alcanzan una sensibilidad de 97% en la detección de las lesiones premalignas y cáncer cervical (8).

Durante la transformación neoplásica ocurren cambios en la expresión de diferentes moléculas que podrían utilizarse como marcadores tumorales, entre estos cambios se han identificado modificaciones en los patrones de glicosilación en glicolípidos, glicoesfingolípidos y glicoproteínas (10). Estos cambios se han sugerido que se pueden emplear en el diagnóstico, para la detección en suero de marcadores basados en moléculas glicosiladas asociados a cáncer, sin embargo, en ocasiones no existen marcadores séricos disponibles, por lo que los tejidos deben analizarse directamente, primero una biopsia y en seguida un análisis histológico con lectinas o anticuerpos monoclonales (16). En el 2007, Santaella-Verdejo y cols, usaron la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) para diferenciar el grado de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

## II. ANTECEDENTES

### Glicosilación

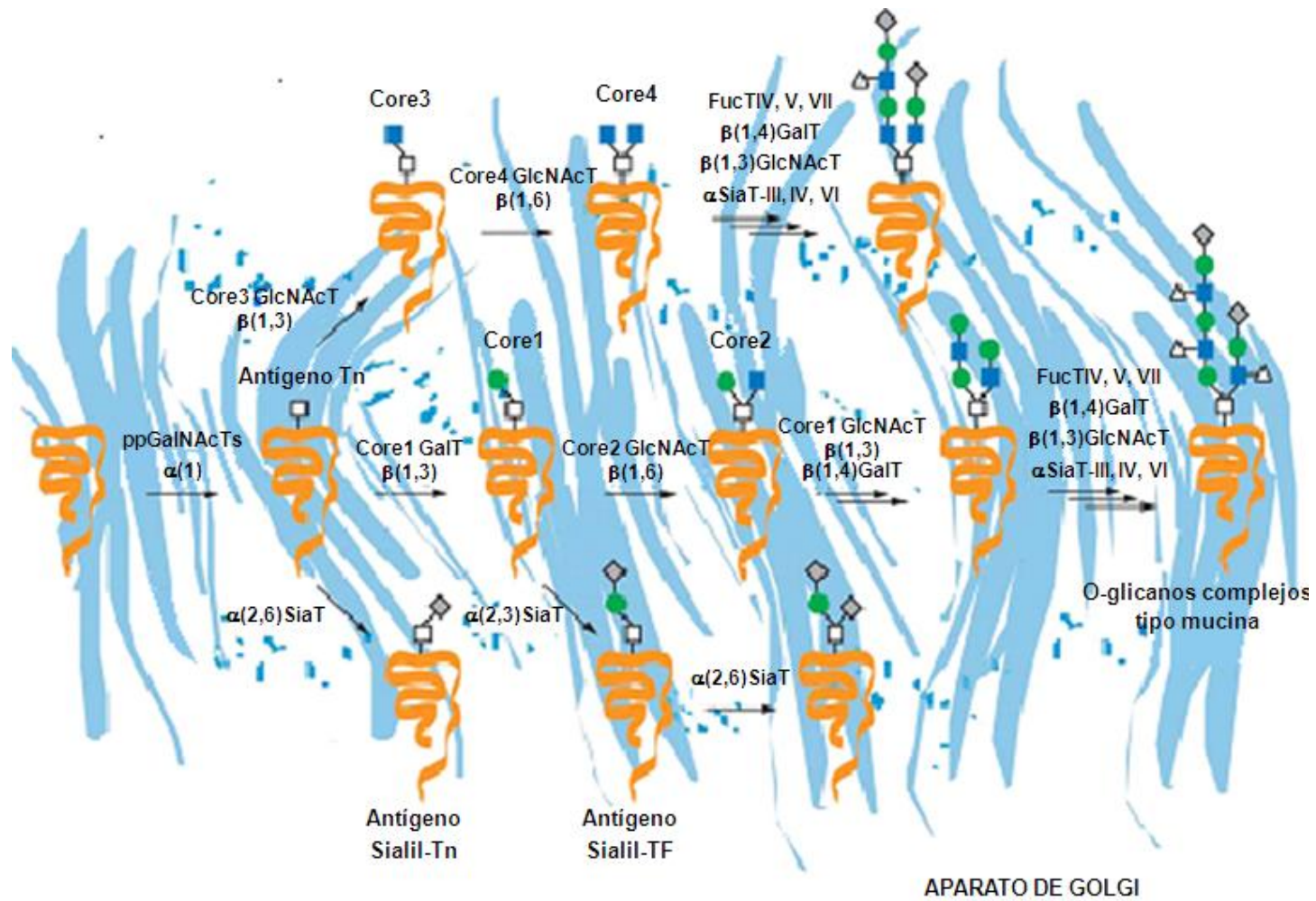
La glicosilación es el proceso enzimático por el cual se adicionan carbohidratos a proteínas o lípidos, es la forma de modificación post-traducciona más común y compleja en proteínas (83), que les confiere diferentes cualidades tanto estructurales como funcionales, por ejemplo, ayuda al correcto patrón de plegamiento de proteínas, les confiere mayor resistencia a las proteasas y mayor estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio, entre otras.

Los carbohidratos cumplen funciones muy importantes en el reconocimiento biológico, participando en el reconocimiento de diferentes moléculas involucradas en interacciones célula-célula y célula-matriz. El patrón de glicosilación de una proteína es dependiente del tipo celular que la produce así como de su estado de maduración y diferenciación, este proceso puede modificarse ante diversas situaciones fisiológicas o ante la presencia de enfermedades (19).

La glicosilación puede clasificarse en tres tipos principales: N-glicosilación, en donde el azúcar se encuentra ligado al grupo amino del aminoácido asparagina (Asn); O-glicosilación, en el que la unión del azúcar se establece con el grupo hidroxilo de la serina (Ser) o treonina (Thr); y C-glicosilación, en el cual el azúcar se une al grupo carboxilo del triptófano (Trp) (83). Los dos primeros tipos de glicosilación son los más estudiados. Se han identificado diferentes tipos de O-glicosilación, la más frecuente se establece entre la unión de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a Ser o Thr presentes en el esqueleto polipeptídico. Este tipo de glicosilación se conoce como glicosilación tipo mucínica y determina la unión de numerosas cadenas oligosacáridicas presentes en las mucinas, glicoproteínas de muy alto peso molecular que recubren la superficie de diferentes tipos celulares (19).

## Estructura y biosíntesis de O-glicanos

Los O-glicanos son ensamblados por una serie de reacciones catalizadas por glicosiltransferasas en el aparato de Golgi (34). El paso inicial de la O-glicosilación es la adición de GalNAc a partir de UDP-GalNAc a residuos de Ser y Thr catalizados por una familia de enzimas conocida como polipéptido-N-acetilgalactosamina transferasa (ppGalNAcT), formando el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) (3, 78). A partir de esta estructura pueden formarse los diferentes núcleos o “cores” de la O-glicosilación, mediante la acción de glicosiltransferasas específicas, que actúan de manera secuencial como se muestra en la figura 2 (3, 83), el antígeno Tn puede ser sialidado para formar el antígeno sialil-Tn (sialil $\alpha$ 2-6GalNAcT) (34). Dependiendo de la disponibilidad y especificidad de las glicosiltransferasas y sulfottransferasas involucradas, los núcleos pueden ser alargados y terminados de muchas maneras, todas las estructuras pueden ser sialidadas, sin embargo, exclusivamente en los núcleos 1-4 y 6 ocurre una extensión, formando O-glicanos complejos, para terminar con la adición de residuos de ácido siálico, fucosa (Fuc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc) y GalNAc (78). Muchas de estas estructuras terminales forman parte de los grupos sanguíneos y antígenos específicos de tejido (9).



■ N-acetilglucosamina (GlcNAc) □ N-acetilgalactosamina (GalNAc) ● Galactosa (Gal) ◆ Ácido siálico (Sia) ▲ Fucosa (Fuc)

Figura 2. Biosíntesis de O-glicoproteínas tipo mucina en el Aparato de Golgi. Hang y cols, 2005.



## **Cambios en la O-glicosilación y cáncer**

La mayoría de las proteínas celulares glicosiladas, tienen diversas funciones incluyendo el reconocimiento célula-célula, regulación del ciclo celular, apoptosis, etc. Si hay alteraciones en la glicosilación se ven afectados muchos aspectos de la biología celular. Cuando la estructura glicosídica contribuye al sitio funcional de la molécula, cualquier modificación estructural de esta porción glicosilada por modificación o supresión de carbohidratos el impacto funcional es relevante (23).

El desarrollo del tumor está asociado con cambios relacionados con la estructura terminal de carbohidratos -glicoproteínas y glicolípidos- presentes en la superficie celular por disfunción de glicosiltransferasas y/o glicosidasas (23). Entre las modificaciones que se observan se encuentran: la síntesis incompleta, modificación de estructuras existentes normalmente, y cambios en la estructura del núcleo que incluye elongación de la cadena de glicolípidos y glicoproteínas, aumento de las ramificaciones de carbohidratos en N-glicoproteínas, y bloqueo en la síntesis de carbohidratos en las O-glicoproteínas tipo mucina (15).

La expresión de antígenos producidos por O-glicosilación incompleta constituye una de las alteraciones moleculares más notorias de las células cancerosas (9). Los principales antígenos asociados a tumor son el antígeno T y su precursor Tn, así como sus formas sializadas (ST y STn) (Figura 2). Los antígenos Tn, Sialil-Tn (STn) y el antígeno Thomsen- Friedenreich (antígeno T ó TF) son carbohidratos simples de tipo mucina en O-glicanos, son acumulados y expresados en varios tumores humanos y raramente se expresan en células adultas normales. En células normales, los carbohidratos simples tipo mucina se enmascaran por sialilación y/o elongación o ramificación, por la adición de otros azúcares o por determinantes de grupos sanguíneos (76).

Los antígenos T y Tn se localizan aproximadamente en el 90% de los carcinomas, estas estructuras están presentes en moléculas de adhesión celular y tisular, esenciales en la invasión y metástasis del carcinoma, que incluyen las fases de adherencia y proliferación (73). Estos antígenos se han identificado en la membrana celular de células malignas de vejiga, colon, páncreas, y tejidos de carcinoma de mama (30). En los carcinomas colorectal y gástrico se ha observado una relación entre la expresión del antígeno STn, con la diferenciación tumoral y la tasa de metástasis. Existen varios informes de la expresión de los antígenos Tn y STn en adenomas, hiperplasias, y displasias en tejido epitelial (75). Los antígenos simples de tipo mucina han sido considerados como marcadores tumorales en diferentes tipos de cáncer, conjuntamente, algunos antígenos de carbohidratos asociados a tumor se han empleados como vacunas anti-cáncer, como es el caso de STn en cáncer de mama (26).

### **Modificaciones de la O-glicosilación en cáncer cervicouterino**

Modificaciones de tipo mucínico simples (como el antígeno T o Tn) y complejas han sido observadas durante la transformación maligna del cuello uterino (71). Hay una mayor expresión del antígeno STn en células cancerígenas que en el epitelio normal de cérvix (35, 59), por lo que puede ser considerado como un antígeno tumoral del carcinoma cervical de células escamosas. También se han encontrado diferencias en el patrón de expresión del antígeno STn entre las lesiones primarias y lesiones metastáticas. Por otro lado, la expresión del antígeno Tn en células de cáncer cervicouterino es más alta en lesiones metastáticas que en tumores primarios (28). Así, la expresión de Tn y STn puede tener una asociación con el potencial invasivo del cáncer de cérvix a los nódulos linfáticos regionales (12, 28, 75). La expresión de estos antígenos demostraron un cambio específico en la progresión de carcinoma *in situ* a carcinoma invasor y del epitelio normal a displasia, respectivamente (59). Cuando se comparó la expresión de los

antígenos Tn, STn, T, ST (sialil-T) y la glicoproteína tipo mucina (gp230) en lesiones NIC 3 con carcinoma invasor, los resultados mostraron que el antígeno T no variaba, y la expresión de gp230 se perdía de NIC 3 a carcinoma invasor. Sin embargo, la expresión de Tn, STn y ST aumentaban de NIC 3 a carcinoma invasor, encontrándose una mayor variación en Tn y ST. La expresión de gp230 puede estar asociada con la transformación maligna a un estado preinvasivo (12). Hay una expresión significativa de antígeno T y Tn en NIC 2 en comparación con el tejido normal (67). Se ha propuesto que los antígenos Tn, STn y ST pueden ser usados como marcadores para la investigación de la transformación biológica en el carcinoma de cérvix de células escamosas. Los antígenos T y Tn son moléculas de adhesión en células y tejidos, esenciales en la invasión y metástasis del carcinoma de cérvix, que incluye las fases de adhesión y proliferación (73). De los antígenos producidos por alteraciones en la O-glicosilación, los más inmunoreactivos son los antígenos T y Tn (72).

### **Lectinas en el análisis de glicoconjugados**

Una forma de identificar glicoformas alteradas, es mediante lectinas. Las lectinas son proteínas y glicoproteínas de origen no inmune que se unen selectivamente a carbohidratos específicos, estas pueden aglutinar células y precipitar polisacáridos o glicoconjugados (glicanos) (60). La capacidad de las lectinas para distinguir ligeras variaciones en la estructura de oligosacáridos se ha utilizado ampliamente. Los patrones de glicosilación de proteínas celulares se afectan por varios cambios fisiológicos, como ocurre en la enfermedad, así, la población de glicoformas alteradas de una glicoproteína dada puede servir para el diagnóstico de la enfermedad (4). Como se ha mencionado previamente, la glicosilación anormal se ha detectado en el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, los cambios en la glicosilación del antígeno específico de próstata durante la transformación maligna han sido considerados relevantes para el diagnóstico en etapas tempranas del

cáncer de próstata. La detección de estructuras glicosiladas basado en el reconocimiento por lectinas es útil para la caracterización de diversos componentes glicosilados y se ha intentado aplicar al conocimiento del papel que juegan esas moléculas en la enfermedad (43) así como en pruebas histoquímicas para localizar y caracterizar residuos específicos de carbohidratos u oligosacáridos en células y tejidos (78). En el presente trabajo se emplearon las lectinas ALL (*Amaranthus leucocarpus*) y PNA (*Arachis hypogaea*), estas lectinas se han utilizado en el diagnóstico de algunos tumores (31, 53, 63, 67) y la caracterización de poblaciones celulares, principalmente en linfocitos (33, 62, 77).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La progresión y la invasión del cáncer cervicouterino se asocia con modificaciones en la O-glicosilación (71). El diagnóstico del cáncer cervicouterino se basa principalmente en el estudio histopatológico. Los marcadores conocidos hasta el momento contribuyen de manera mínima al diagnóstico temprano de la enfermedad (18, 52). Se han propuesto a los antígenos simples tipo mucina (antígeno T y Tn) como posibles marcadores tumorales en el cáncer de cuello uterino (28, 59, 75), sin embargo las herramientas que se encuentran actualmente para su localización son escasas. Las lectinas ALL y PNA fueron empleadas por Mayoral y cols, en el 2008 para estudiar las modificaciones de la O-glicosilación en cáncer de mama. La identificación de una línea celular de cáncer cervicouterino que exprese el antígeno T y Tn y la disponibilidad que se tiene de la lectina de ALL para el reconocimiento de estos antígenos, permitirá avanzar en el estudio de esta patología.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La lectina de *Amaranthus Leucocarpus* (ALL) tiene especificidad por los antígenos T y Tn, por lo cual se puede utilizar como herramienta en la identificación de modificaciones en la O-glicosilación en tejidos y líneas celulares provenientes de cáncer cervicouterino.

#### **V. OBJETIVO**

Identificar modificaciones de la O-glicosilación de tipo mucínico simple en líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki y HeLa, en muestras de cáncer de cérvix invasor y tejido cervical sano por medio de citoquímica e inmunocitoquímica, empleando en ambos casos las lectinas ALL y PNA.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### Líneas celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares; CaSki, HeLa y J774 (Tabla 3), donadas por la Dra. Guadalupe Maldonado Mercado y la Dra. Ma. Concepción Agundis Mata del Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la UNAM.

Línea celular	Origen	VPH
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	18
CaSki	Carcinoma epidermoide (proveniente de intestino delgado)	16
J774	Macrófagos murinos	--

**Tabla 3. Líneas celulares utilizadas.**

### Tejidos

Bajo consentimiento informado, se utilizaron biopsias de tejido cervical embebidas en parafina con diagnóstico de cáncer cervicouterino invasor de tipo epidermoide estadio IIB provenientes del Departamento de Medicina Genómica del Hospital General de México de la Secretaría de Salud. El tejido cervical sin neoplasia (como control) se obtuvo de piezas quirúrgicas de pacientes con histerectomía por causas no neoplásicas provenientes de la Secretaría de Salud. Los tejidos fueron evaluados por dos médicos patólogos de forma independiente para confirmar el diagnóstico.

## Lectinas

Las lectinas utilizadas para citoquímicas e histoquímicas estaban acopladas a biotina. La lectina ALL fue purificada y biotinilada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM. El resto de las lectinas biotiniladas fueron obtenidas comercialmente (EY Labs, EUA). En la Tabla 4 se enlista la especificidad de las lectinas empleadas.

Lectina	No. De catalogo	Abreviatura <sup>a</sup>	Estructuras reconocidas
<i>Arachis hypogaea</i> <i>agglutinin</i>	BA-2301-2	PNA	Gal $\beta$ 1-3GalNAc > Gal $\beta$ 1-4GlcNAc > $\alpha$ y $\beta$ Gal
<i>Amaranthus</i> <i>leucocarpus lectin</i>	—	ALL	Gal $\beta$ 1-3GalNAc > $\alpha$ GalNAc
<i>Limulus</i> <i>polyphemus</i> <i>agglutinin</i>	BA-1501-1	LPA	Neu5Ac (NeuAc)

**Tabla 4.- Lectinas empleadas en la detección de los glicoconjugados. La abreviación está tomada de la página de abreviaciones de lectinas de la Universidad de Copenhagen.**

### Purificación de ALL

La semilla de *Amaranthus leucocarpus* fue obtenida en Tulyehualco, México. La lectina (ALL) fue purificada por cromatografía de afinidad en una columna que contenía estroma de glóbulos rojos humanos tipo O, como lo describe Zenteno y col, 1988. La lectina ALL fue marcada con ester de N-hydroxisuccinimida de



biotina (Sigma, St. Louis Mo., USA, H1759) con una relación marcaje/proteína de 2:1 (68).

### **Mantenimiento de las líneas celulares**

Las líneas celulares fueron cultivadas en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, USA, 3055) en RPMI (Gibco, USA, 1640), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (HyClone, USA, SH30071.03), 100 UI/μl de penicilina, 10 μg/μl de estreptomicina (Sigma, USA, P4333) a 37 °C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Las células fueron observadas por microscopia de campo claro con un microscopio invertido Olympus OMT-4 (Tokio, Japón), con 150, 300 y 600 aumentos. El registro de las imágenes observadas se capturó mediante una cámara digital Olympus E-300 (Tokio, Japón), acoplada al microscopio.

Cuando las células formaban una monocapa celular con una confluencia del 100%, se lavaron con solución balanceada de fosfatos (PBS; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 0.15m, pH 7.4) posteriormente se incubaron con 2 ml de una solución de tripsina-EDTA 0.05% (Gibco, USA, 25300) 5 min. Las células se lavaron por centrifugación en 5 ml de medio RPMI sin suero durante 5 min, 1200 rpm, 4°C, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resembró para mantener el cultivo en botellas de cultivo y para los ensayos de inmunocitoquímica se sembraron en placas de 4 pozos (Nunc, Reino Unido, 176597).

## Inmunocitoquímicas

Se realizó la inmunocitoquímica empleando las líneas celulares, incubándolas con las diferentes lectinas acopladas a biotina, para ello se sembraron 100 000 células por pozo en las placas de 4 pozos con medio suplementado, en las condiciones antes descritas, a las 24 horas se retiró el medio de cultivo de cada pozo, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA, P6148) por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la placa se lavó dos veces con PBS, para permeabilizar las células se incubó con Tritón X-100 (Sigma, USA, T8532) 0.2% en PBS 10 min a temperatura ambiente. Para bloquear los sitios reactivos la placa se incubó con el amortiguador de bloqueo Starting Block (PBS) (Thermo Scientific, USA, 37538) 30 min a temperatura ambiente, posteriormente, se lavaron las placas con PBS-Ca<sup>2+</sup> (CaCl 1mM). Cada pozo se incubó por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda, con 100 µl de cada una de las lectinas biotiniladas diluidas 1:100 en PBS-Ca<sup>++</sup>, se lavaron dos veces con PBS y decantó el sobrenadante. Los pozos se incubaron con extravidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (Sigma, USA, F4274) a una dilución 1:1000, las muestras se protegieron de la exposición a la luz en una cámara húmeda opaca e incubaron por 1 h a 37°C, los pozos se lavaron dos veces con PBS. Para visualizar los núcleos y evitar el fotoblanqueamiento se montaron las placas en oscuridad con medio VectaShield conjugado a 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector laboratorios, USA, H-1200). Se retiraron las divisiones entre los pozos y sellaron con barniz, y observaron en un microscopio Leica DM/SL (Wetzlar, GMBH) con aumentos de 100, 200, 400, 630 y 1000; lámpara de fluorescencia acoplada al microscopio y filtros específicos para los tres canales: rojo, verde y azul. El registro de las imágenes observadas se capturó mediante una cámara digital Leica DFC-300FX (Cambridge, UK) acoplada al microscopio y se proyectaron en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9 (Heerburg, Suiza).

## **Fijado e inclusión de las muestras en parafina**

El tejido obtenido fue fijado en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Las muestras se incluyeron en parafina siguiendo el protocolo establecido por Hall, 2005. Las laminillas sobre las cuales se adhirieron los tejidos fueron tratadas con silano al 3% (Sigma, USA, S4651). Los bloques de tejido se cortaron a 5  $\mu$ m de espesor con un micrótopo Histocout Reichter-Jung (Cambridge, Alemania) siguiendo los procedimientos de rutina (1).

## **Técnica básica de hematoxilina y eosina (HE)**

A los tejidos adheridos a portaobjetos se les eliminó la parafina y se hidrataron con concentraciones decrecientes de solventes orgánicos de xileno hasta etanol al 70%. Se sumergieron en solución de hematoxilina de Gill por 2 min y lavaron con agua destilada en seguida se sumergieron por 20 segundos en solución de eosina. Finalmente se aclararon las muestras y se deshidrataron con concentraciones crecientes de solventes orgánicos hasta xileno y se montaron con resina hidrofóbica Poly-mount (PolyScience, USA, 08381). Posteriormente, los tejidos se observaron en un microscopio de luz de campo claro Leica DM/LS con aumentos de 100, 200 y 400. El registro de las imágenes observadas se capturó mediante una cámara digital Leica DFC-300FX acoplada al microscopio y se proyectaron en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.29 release 9.

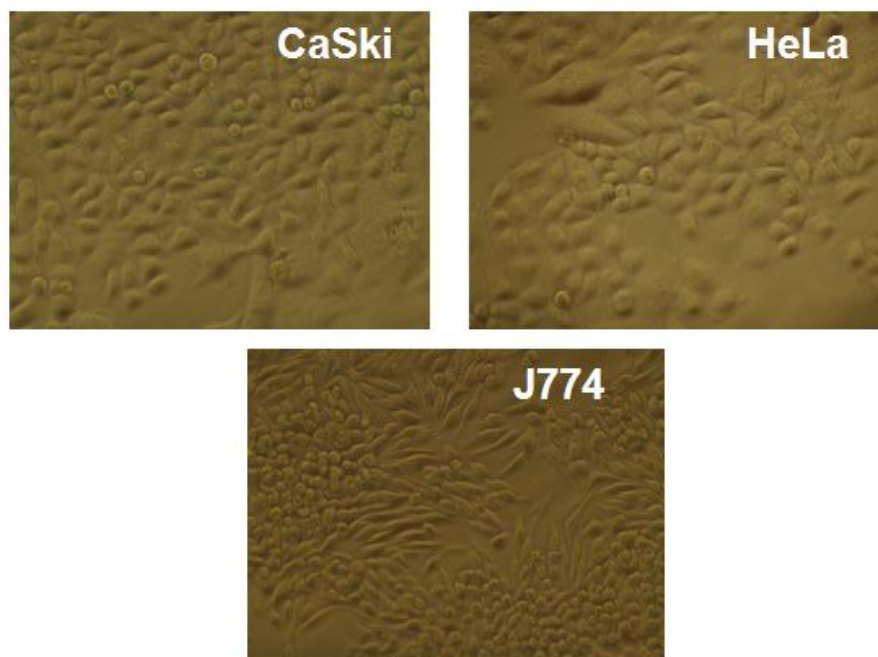
## Inmunohistoquímica

A los tejidos adheridos a portaobjetos se les eliminó la parafina y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de solventes orgánicos desde xileno hasta etanol al 70% se lavaron con PBS 0.1 M pH 7.4, secaron y delimitó la zona tisular con plumón hidrofóbico ImmEdge Pen (Vector Laboratories, UK, H-4000) alrededor de la muestra e incubaron en cámara húmeda con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, USA, A9418) al 2% por 30 min a temperatura ambiente en seguida se incubaron por 10 min con Tritón X-100 al 0.2% en PBS, se lavaron exhaustivamente con PBS Ca (CaCl 1 mM, pH 7.4) e incubaron las muestras con las lectinas biotiniladas a 37°C en cámara húmeda por dos horas. Luego se incubaron las muestras con extravidina-FITC (dilución 1:1000) protegiendo las muestras de la exposición a la luz, en cámara húmeda opaca a 37°C durante una hora. Las preparaciones se montaron con medio VectaShield conjugado con DAPI en oscuridad y sellaron los cubreobjetos con barniz. Finalmente, todas las muestras fueron observadas en un microscopio Leica DM/SL con aumentos de 100, 200, 400, 630 y 1000; lámpara de fluorescencia acoplada al microscopio y filtros específicos para los tres canales: rojo, verde y azul. El registro de las imágenes observadas se capturó mediante una cámara digital Leica DFC-300FX acoplada al microscopio y se proyectaron en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9. La intensidad de la reacción se midió por fluorescencia y cuantificó asignando una cruz (+) a la menor, dos cruces (++) a la moderada, tres cruces (+++) a una intensidad alta.

## VII. RESULTADOS

### Líneas celulares

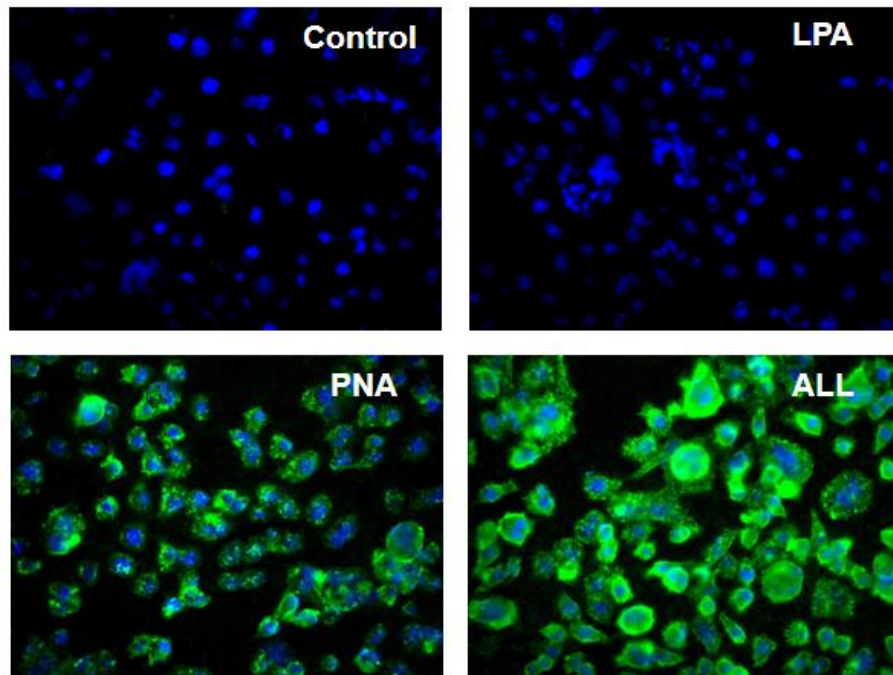
Como se reporta en la Figura 3, las células CaSki, HeLa, observadas por microscopía de campo claro, presentaron una morfología epitelial, con abundante citoplasma y núcleo oval. Las células J774 mostraron una morfología monocítica, son más pequeñas y alargadas en comparación con las células CaSki y HeLa, acorde a lo encontrado en la ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)).



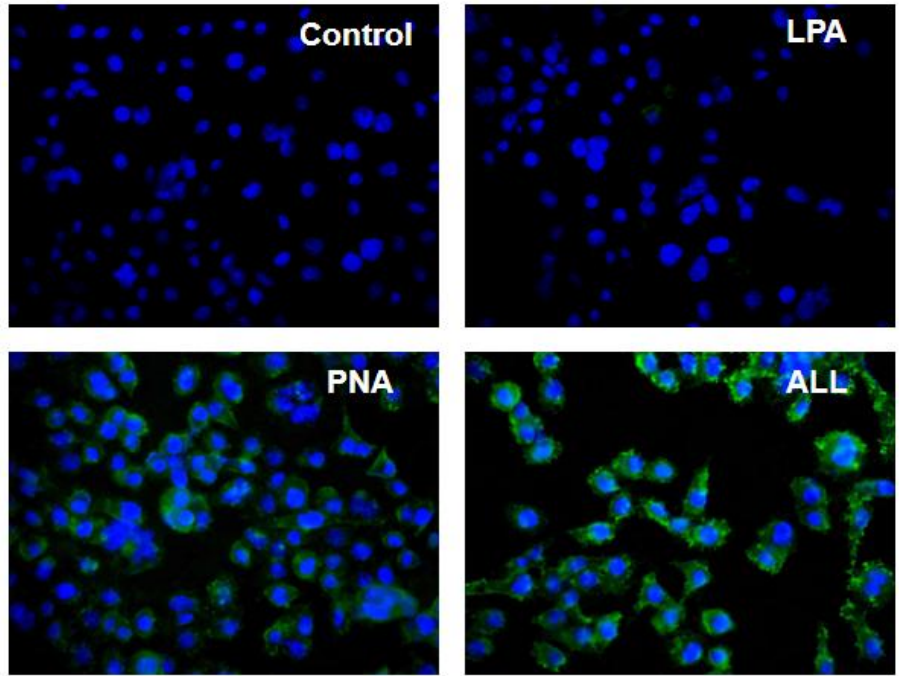
**Figura 3. Morfología celular. Microscopía de campo claro 300x**

En la línea celular CaSki, la lectina de LPA mostró reactividad negativa. La lectina PNA reconoció de forma moderada la membrana plasmática y baja para algunos gránulos del citoplasma. La lectina ALL mostró una reactividad alta, principalmente en la membrana plasmática (Figura 4).

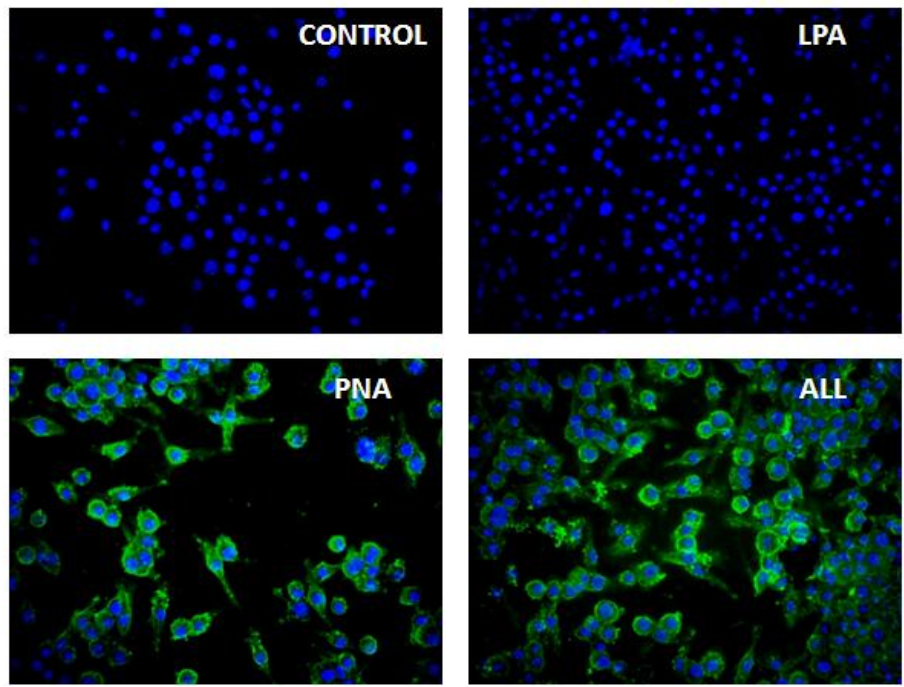
En la línea celular HeLa, la lectina LPA mostró una reactividad negativa, la lectina PNA mostró una reactividad baja hacia la membrana plasmática y a algunos gránulos citoplasmáticos. La lectina ALL mostró una reactividad moderada, localizada principalmente en la membrana plasmática y baja hacia algunos gránulos del citoplasma (Figura 5). En la línea celular J774, la lectina LPA tampoco mostró reactividad hacia membrana plasmática, mientras que las lectinas PNA y ALL mostraron un alto reconocimiento principalmente hacia la membrana plasmática (Figura 6). En la tabla 5 se resume la intensidad de fluorescencia para las diferentes lectinas en las líneas celulares.



**Figura 4.- Citoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, en la línea celular CaSki.  
En el control no se utilizó lectina. Microscopia de fluorescencia. 400x**



**Figura 5.-** Citoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, en la línea celular HeLa. En el control no se utilizó lectina. Microscopia de fluorescencia. 400x



**Figura 6.-** Citoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, en la línea celular J774. En el control no se utilizó lectina. Microscopia de fluorescencia. 400x

Línea celular	LPA	PNA	ALL
CaSki	-	++	+++
HeLa	-	+	++
J774	-	++	++

**Tabla 5. Intensidad de fluorescencia de las lectinas LPA, PNA y ALL en líneas celulares de cáncer cervicouterino**



## **Análisis histoquímico de tejidos**

### **Tejido sano**

El tejido sano fue observado por microscopia de campo claro con la tinción de hematoxilina-eosina (HE), en la figura 7 se puede observar la muestra R-200, y en la figura 8 la muestra R-201, las cuales presentan un epitelio plano estratificado no queratinizado, se observa claramente el límite entre estroma y epitelio, no encontrándose alteraciones celulares en alguno.

En la muestra R-200 la reactividad de la lectina LPA mostró un reconocimiento leve en la membrana plasmática de las células epiteliales del estrato superficial, en los estratos intermedio y basal, como en el estroma hubo un reconocimiento moderado. El reconocimiento por PNA fue leve hacia la membrana plasmática de las células epiteliales del estrato superficial, la lectina no mostró reconocimiento por los estratos intermedio y basal, mostro un reconocimiento moderado hacia el estroma en la adventicia de los vasos sanguíneos. El reconocimiento de ALL fue nulo en las células epiteliales de los estratos intermedio y basal, en la región del estroma ALL mostró un reconocimiento moderado (Figura 7).

En la muestra R-201 la reactividad de la lectina LPA mostró un leve reconocimiento en la membrana plasmática de las células epiteliales del estrato superficial, no hubo reconocimiento en los estratos intermedio y basal ni en el estroma. El reconocimiento por PNA fue moderado hacia la membrana plasmática de las células epiteliales del estrato superficial, la lectina no mostró reconocimiento por los estratos intermedio y basal, ni por el estroma (Figura 8). La lectina ALL mostró un reconocimiento nulo en las células epiteliales de los estratos intermedio y basal, al igual que en la región del estroma. En la tabla 6 se resume la identificación histoquímica de los glicoconjugados por las diferentes lectinas en los tejidos cervicales sanos.

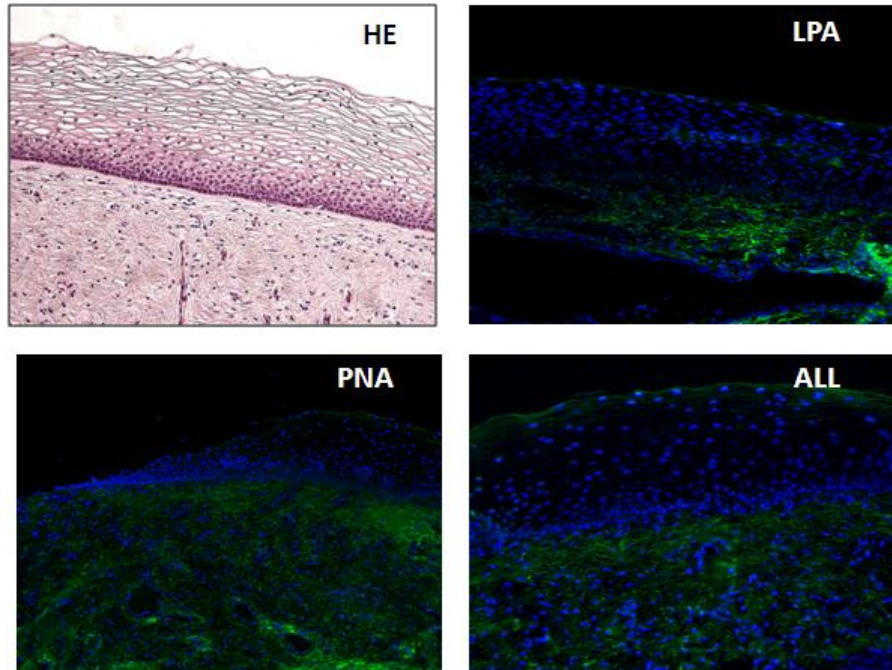


Figura 7.- Histoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, en tejido cervical sano, muestra R-200. Microscopia de fluorescencia y de campo claro. 200x

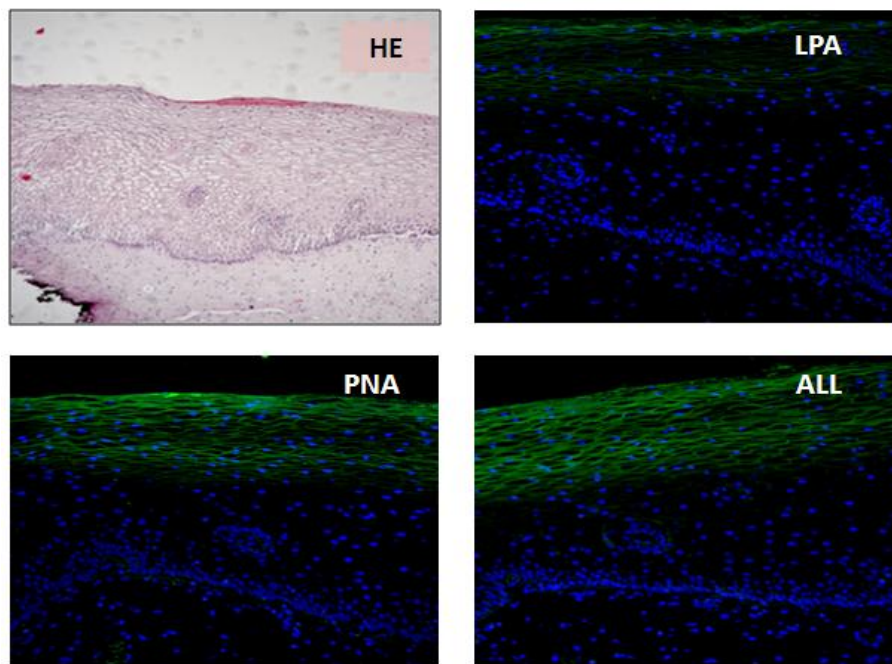


Figura 8.- Histoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, en tejido cervical sano, muestra R-201. Microscopia de fluorescencia y de campo claro. 200x

<b>Caso</b>	<b>LPA</b>	<b>PNA</b>	<b>ALL</b>
R-200	+	++	+
R-201	+	+	+

**Tabla 6.- Identificación histoquímica de los glicoconjugados (reactividad a las lectinas) en tejido cervical sano**

### **Tejido canceroso**

En la Figura 9 se exponen las muestras de cérvix con cáncer cervical epidermoide (R-156, R-206, R-208, R-213, R-226). En las muestras con la tinción de hematoxilina-eosina se aprecia una pérdida de continuidad entre los límites del epitelio y el estroma, con células tumorales pleomórficas, con núcleos grandes, que infiltran el estroma, por otra parte, se encontró un abundante infiltrado inflamatorio con predominio de células linfocíticas y mononucleadas. En los tejidos con cáncer cervicouterino invasor estadio IIB, la lectina LPA mostró reactividad de leve a moderada hacia las células del estroma, la matriz extracelular y las células que infiltran el estroma. Las lectinas ALL y PNA tuvieron una reactividad semejante. La lectina PNA presentó una reactividad intermedia hacia la membrana plasmática del infiltrado celular y algunas células endoteliales de los vasos sanguíneos. La lectina ALL mostró una reactividad de moderada a alta hacia la membrana plasmática de células neoplásicas, en el estroma la reactividad fue moderada hacia el endotelio. En la tabla 7 se resume la identificación histoquímica de los glicoconjugados por las diferentes lectinas en los tejidos cervicales neoplásicos.

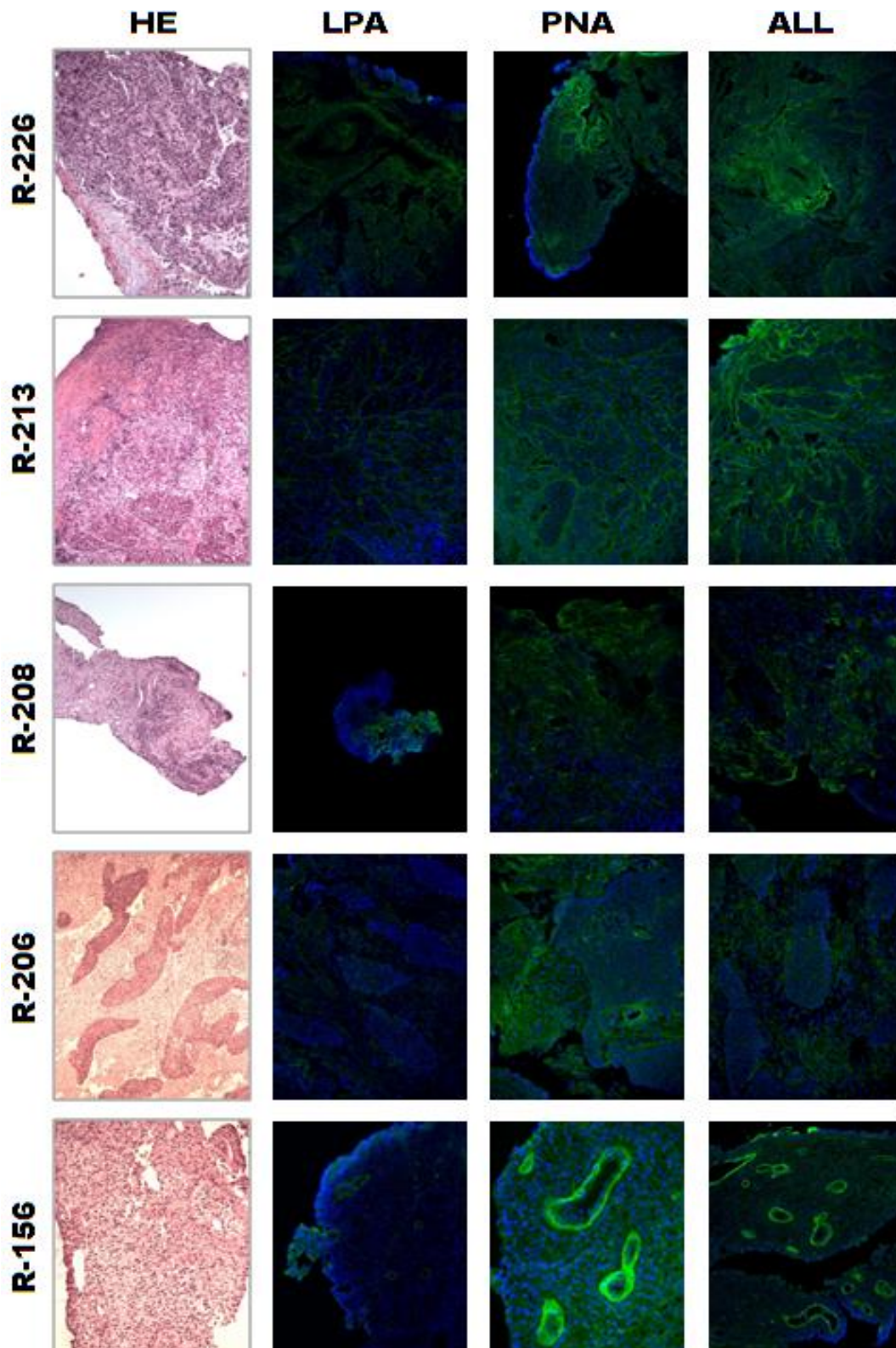


Figura 9.- Histoquímica con las lectinas; LPA, PNA y ALL, tejido cervical con carcinoma invasor estadio IIB. Microscopia de fluorescencia y de campo claro.

200x.

<b>Caso</b>	<b>LPA</b>	<b>PNA</b>	<b>ALL</b>
R-156	+	++	++
R-206	+	++	++
R-208	+	++	++
R-213	+	++	+++
R-226	+	++	+++

**Tabla 7. Identificación histoquímica de los glicoconjugados (reactividad a las lectinas) en tejido cervical con carcinoma invasor estadio IIB.**

## VIII. DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino es un problema de salud, constituye la segunda causa de muerte de mujeres en países en desarrollo (58). Se ha identificado que durante la transformación celular existen alteraciones en la glicosilación de proteínas de membrana y existen diversos trabajos que han sido enfocados a tratar de hacer una correlación de estas alteraciones y la progresión de la enfermedad (56). Las lectinas representan una útil herramienta en el estudio de la diferenciación celular debido a su especificidad por estructuras glicosiladas específicas, permiten evaluar con gran sutiles diferencias en la glicosilación de ciertas moléculas, y han sido de gran utilidad para el análisis de marcadores glicosilados, para el aislamiento de glicoproteínas y de grupos celulares (20).

En el presente trabajo se evaluaron cambios en la O-glicosilación en líneas celulares y tejidos usando lectinas con diferentes especificidades a estructuras de O-glicanos. LPA reconoce ácido siálico (Neu5Ac) (17), ALL reconoce GalNAc en O-glicopéptidos con core 1 que contienen el disacárido Gal  $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1,0-Ser/Thr (antígeno T) o GalNAc $\alpha$ 1,0-Ser/Thr (antígeno Tn) que pueden o no estar sializados (32, 86), PNA reconoce el grupo hidroxilo en el carbono 4 de galactosas terminales presentes en el antígeno T (Gal $\beta$ 1,3GalNAc), en lactosaminas (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), glicoproteínas y glicolípidos, el antígeno T está presente en muchos glicoconjugados; como en glicolípidos, grupos sanguíneos M y N, gangliósidos, y muchas otras glicoproteínas solubles y asociada a la membrana (33, 50).

Los estudios realizados con la línea celular J774 (51), muestran que la línea es positiva para ALL (Figura 6), esta línea fue utilizada como control positivo para esta lectina. Las demás líneas celulares corresponden a carcinoma de cérvix invasor. El reconocimiento observado con las lectinas LPA y PNA no permite sugerir que estas lectinas reconozcan patrones de glicosilación específico en estas líneas celulares, sin embargo, ALL muestra un mayor reconocimiento en las

líneas celulares CaSki y HeLa. LPA es específica para ácido siálico, la expresión de este carbohidrato se ve incrementado por la actividad de sialiltransferasas. Generalmente la presencia de ácido siálico se asocia a la transformación maligna *in vivo*, el ácido siálico favorece la metástasis de las células malignas (48), por lo que se esperaría que en la línea celular proveniente de cáncer invasor con metástasis (CaSki) la reactividad de LPA fuera mayor que en HeLa (adenocarcinoma), pero esto no fueron los resultados obtenidos, lo cual muestra que estas líneas celulares no son un buen modelo de estudio *in vitro* para la sobreexpresión de ácido siálico en carcinoma cervicouterino. Ambas líneas celulares mostraron alta reactividad a ALL que podría reflejar la participación de glicoconjugados en el desarrollo del tumor y metástasis, ante la presencia de los antígenos T y Tn, lo que se comprueba con la reactividad de la lectina PNA. La falta de reactividad hacia LPA y el reconocimiento por PNA indica que los antígenos no están enmascarados por sialilación en las líneas celulares, sin embargo, en biopsias de carcinoma cervicouterino invasor se incrementa la expresión de estos antígenos (12, 28, 30).

Wang y cols, en el 2002 demostraron que en suero y en tejidos cervicales la presencia de ácido siálico se incrementa gradualmente conforme aumenta el grado de malignidad. Si se compara la expresión de ácido siálico reconocido por la lectina LPA en el tejido cervical sano y el tejido con cáncer cervicouterino invasor estadio IIB se hace evidente que el ácido siálico aumenta en las células tumorales y en las células que infiltran el estroma a diferencia del tejido sano donde la expresión de este sacárido se localiza solamente en el estrato superficial y escasamente en el estroma en algunos tejidos. El incremento de ácido siálico se ha asociado con el aumento en la expresión de las ST3Gal I, ST3Gal III, ST3Gal IV y ST6Gal I en el carcinoma de células escamosas, de las cuales la ST3Gal III y ST6Gal I son importantes en la metástasis hacia nódulos linfáticos en el estadio IB1, la sobre-expresión de ST6Gal I se considera un factor pronóstico pobre (82). Las alteraciones en la O- y N- glicosilación de glicoproteínas está asociada al cáncer, lo que influye en la adhesión molecular de las células mediada por carbohidratos (61). La producción de antígenos por O-glicosilación incompleta es

un fenómeno común en el desarrollo del cáncer, unos de los principales antígenos asociados a cáncer son T y Tn (9). En tejido canceroso se identificó la expresión de estos antígenos en células tumorales y en la región del estroma, a diferencia del tejido sano donde su presencia se localiza solamente en el estrato superficial, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Carrilho y cols. (2000). El patrón diferencial en la expresión de los antígenos T y Tn mostrado por las lectinas PNA y ALL en tejido canceroso con respecto al tejido cervical sano puede ser útil en el diagnóstico de la enfermedad.

Estadio	Normal	Neoplasia Intraepitelial Cervical			Carcinoma Invasor (FIGO)			
		1	2	3	Ia	Ib	Ila	Ilb
Antígeno T	x	√	√√	√√√		√√√√		
Antígeno Tn	x	√	√	√√	√√√	√√√√	√√√	√√√√

**Tabla 8. Presencia de los antígenos T y Tn reportados en la literatura durante la transformación maligna del cérvix.**

Al conjuntar los resultados identificados en este trabajo y los datos encontrados en la literatura nos permiten sugerir que la expresión de antígenos glicosilados potencialmente puede ser utilizado para distinguir diversas etapas de la transformación maligna del epitelio escamoso del cérvix (Tabla 8). Muchas lectinas caracterizadas, por su gran especificidad en el reconocimiento a azúcares, se utilizan como herramienta en el estudio de glicoconjugados (84). Las lectinas ALL y PNA empleadas muestran un patrón de reconocimiento diferente a pesar de que las dos reconocen estructuras GalNAc. La habilidad de las lectinas para diferenciar ligeras variaciones en la conformación de las estructuras sacarídicas radica en la variabilidad en el tamaño del dominio de reconocimiento a carbohidratos (CDR por sus siglas en inglés, *carbohydrate recognition domain*) y de su estructura cuaternaria (78), esta habilidad aunada a la estructura que estas proteínas adoptan en el espacio hacen que las lectinas tengan diferencias en el



reconocimiento a sus antígenos. En el 2007 Santaella-Vallejo y cols. analizaron muestras de cérvix humano NIC 1, 2 y 3, encontrando un reconocimiento diferencial por ALL en NIC 2, en el presente estudio se encontró que el reconocimiento por ALL se incrementa en cáncer cervicouterino invasor. En individuos sanos, estos antígenos se asocian con células inmaduras, más aún se ha identificado que poblaciones ALL+ tienen alta resistencia a la apoptosis (2), pudieran estar relacionadas con la protección celular contra el reconocimiento inmunológico, la adhesión y la migración celular, incrementando la resistencia a la muerte celular programada.

Algunas lectinas vegetales han sido propuestas como posibles fármacos anti neoplásicos al provocar muerte celular por apoptosis y autofagia como es el caso de Con A o por ser citotóxica como GS I, que inhibe el crecimiento del tumor, de igual forma se han propuesto como acarreadores de fármacos anti-cancerosos (13, 44, 45). La concentración y el tipo de lectina influyen en el efecto que tienen sobre el desarrollo del tumor (37). El estudio de la actividad antitumoral de las lectinas en líneas celulares provenientes de cáncer juega un papel muy importante como posibles herramientas terapéuticas.

## **IX. CONCLUSIÓN**

En el cáncer cervicouterino se presentan modificaciones en la O-glicosilación a nivel de oligosacáridos simples tipo mucínico como producto de una vía de glicosilación anormal en la célula cancerosa.

Las lectina de ALL y PNA que reconocen algunas de estas modificaciones muestran un patrón de reconocimiento diferente, sin embargo, ALL tiene una mayor interacción con los antígenos T y Tn, tanto en líneas celulares provenientes de CaCu, como en tejidos con carcinoma invasor.

Estos resultados sugieren que ALL puede utilizarse como herramienta en la identificación de modificaciones en la O-glicosilación tanto en la progresión como en la invasión del cáncer cervicouterino.

## **X. PERSPECTIVAS**

- Caracterizar los glicoconjugados reconocidos por las lectinas ALL y PNA en líneas celulares y tejidos tumorales. Deberá estudiarse minuciosamente su correlación en la enfermedad. Estos glicoconjugados pueden ser utilizados como marcadores moleculares.
  
- Establecer los posibles ligandos de estos glicoconjugados, para especular sobre el posible papel que juegan en la progresión y metástasis del tumor.
  
- Identificar si en el suero de pacientes con CaCu expresan glicoproteínas reconocidas por la lectina ALL, esto permitiría identificar un método no invasivo en la detección de los oligosacáridos.
  
- Establecer la expresión diferencial de glicosiltransferasas en tejido normal y canceroso de cérvix que nos permitirá determinar cuáles de estas enzimas están involucradas en la progresión del tumor.

## XI. ANEXO I. ABREVIATURAS

<b>ST</b>	Sialiltransferasa
<b>NeuAc</b>	Ácido neuroamínico o ácido siálico
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GalNAc</b>	N-acetilgalactosamina
<b>ALL</b>	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
<b>PNA</b>	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
<b>LPA</b>	Lectina de <i>Limulus polyphemus</i>
<b>CaCu</b>	Cáncer cervicouterino
<b>VPH</b>	Virus de papiloma humano
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>NIC</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>LSIL</b>	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
<b>LSIH</b>	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
<b>FIGO</b>	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
<b>PSA</b>	Antígeno específico de próstata
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacetato de sodio
<b>PBS</b>	Solución balanceada de fosfatos
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>DAPI</b>	4,6-diamidino-2-fenilindol
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina

## XII. ANEXO II. GLOSARIO

**Apoptosis o muerte celular programada:** Forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario.

**Cáncer o neoplasia maligna:** Crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Las células cancerosas también se denominan células malignas.

**Carcinoma:** Tumor maligno generados por células epiteliales. El prefijo adeno se refiere a epitelio secretor, mientras que escamoso se reserva para los de recubrimiento.

**Captura de híbridos:** Técnica de biología molecular que permite detectar en forma directa el material genético (ADN) de los VPH de alto riesgo, lo detecta aun desde antes de tener alguna lesión visible.

**Condiloma plano:** Placas rugosas de color blanco, que aparecen en el útero.

**Estadificación o estadiaje:** Clasificación de la extensión y gravedad de una enfermedad cancerosa.

**Fosforilación:** Adición de un grupo fosfato inorgánico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) a cualquier otra molécula. La fosforilación de las proteínas y, en especial de las enzimas es uno de los principales mecanismos de regulación de su actividad.

**Glicanos o glicoconjugados:** Biopolímeros que constan de una porción glicana; constituida por carbohidratos y una porción aglicona; porción proteica o lipídica en glicoproteínas y glicolípidos respectivamente.

**Glicofomas:** Variedad de conformaciones en los carbohidratos unidos al glicano.

**Hibridación inversa:** Técnica de biología molecular, en donde el ADN biotinilado, obtenido mediante la técnica de amplificación es sometido a hibridación con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas.

**Neoplasia:** Formación de un tejido anormal en el que la multiplicación de las células no está totalmente controlada por los sistemas reguladores del

organismo y cuyos elementos celulares sustituyen a los de los tejidos normales. Se usa principalmente refiriéndose a los tumores tanto benignos como malignos.

**Marcador tumoral:** Sustancias producidas por las células de tumores o por otras células del cuerpo como respuesta al cáncer o a ciertas afecciones benignas (no cancerosas). Estas sustancias se pueden encontrar en la sangre, orina, tejidos de tumor o en otros tejidos.

**Invasión tumoral:** Movimiento o diseminación de las células cancerosas de un órgano o tejido a otro, por lo general a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático.

**Oligosacáridos:** Polímero de monosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos, con un número de unidades monoméricas entre 2 y 10.

**Polisacáridos:** Biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos, unidas por enlaces glicosídicos.

**Proteínas supresoras de tumor:** Proteínas que normalmente inhiben la proliferación celular excesiva. Una mutación o una delección de un gen supresor tumoral que codifica para dicha proteína aumentarán la probabilidad de que se produzca un tumor, al perder su función.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular, partiendo de un mínimo.

**Sialilación:** Proceso que se lleva a cabo por la acción de enzimas llamadas sialiltransferasas (ST), las cuales unen ácido neuroamínico (NeuAc) a la porción de los glicanos de proteínas y lípidos.

**Tamizaje:** Evaluación masiva de sujetos asintomáticos respecto de una patología específica y antes de que ellos consulten espontáneamente.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Achestetter VA. Microtomía, en: Métodos histotecnológicos. AFIP (1995). C8: 47-54.
2. Álvarez G, Lascurain R, Hernandez-Cruz P, Yeyaert D, Degand P, Gorocica P, Espinoza B, Zenteno E, Chavez R. (2006). Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1760: 1235-1240.
3. Agervig MT, Clausen H. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. (2008). *Biochimica et Biophysica Acta* 1780; 546–56.
4. Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem*. 7; 1593-1608.
5. Anschau F, Schmitt VM, Lambert AP, Gonçalves MA, Machado DC. (2009) Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: role of p16 INK4a expression in progression and in recurrence. *Exp Mol Pathol*. 86; 46-50.
6. Bog-Hansen T. Thorkild's lectin page. University of Copenhagen. <http://plab.ku.dk/tcbh/lectin-links>.
7. Bratcher J, Palefsky J. (2008). Anogenital Human Papillomavirus Coinfection and Associated Neoplasia in HIV-positive Men and Women. *The PRN Notebook* 13.
8. Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. (2007). HPV detection methods. *Dis markers*. 23: 273-81.
9. Brockhausen I. (1997). Pathways of O-Glycan biosynthesis in cancer cell. *Biochim Biophys Acta* 1473; 67-95.
10. Brooks SA, Carter TM, Royle L, Harvey DJ, Fry SA, Kinch C, Dwek RA, Rudd PM. (2008). Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the

potential for new anti-tumor strategies. *Anticancer Agents Med Chem.* 8: 2-21.

11. Byrne P, Williams A, Rollason T. (1989). Studies of lectin binding to the human cervix uteri: II. Cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous carcinoma. *Histochem J.* 21:323-36.
12. Carrilho C, Cantel M, Gouveia P, David L. (2000). Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn, T y sialosyl-T) and gp 230 mucin-like glycoprotein are candidate markers for neoplastic transformation of the human cervix. *Virchows Arch.* 437; 173-179.
13. Chen YF, Boland CR, Kraus ER, Goldstein IJ. (1994). The lectin *Griffonia simplicifolia* I-A4 (GSI-A4) specifically recognizes terminal alpha-linked N-acetylgalactosaminyl groups and is cytotoxic to the human colon cancer cell lines LSII74 and SW1116. *Int J Cancer,* 57: 561-567.
14. Ching CK, Black R, Helliwell T, Savage A, Barr H, Rhodes JM. (1988). Use of lectin histochemistry in pancreatic cancer. *J Clin Pathol.* 41: 324-328.
15. Dabelsteen E. (1996). Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J pathol.* 179: 358-369.
16. Dube DH, Bertozzi CR. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 477-488.
17. Fischer E, Brossmer R. (1995). Sialic acid-binding lectins: submolecular specificity and interaction with sialoglycoproteins and tumour cells. *Glycoconj J.* 12: 707-713.
18. Franceschi S. (2005). The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res.* 166; 277-297.



19. Freire T, Robello C, Casaravilla C, Álvarez DE, Medeiros A, Carmona C, Osinaga E. (2002). Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Acta Fisiología*, 8:89-107.
20. Gallegos-Velazco IB, Coutiño R, Martínez G, Hernández-Cruz P (2008). *REB* 27: 52-59
21. Ganguly C, Das S. (1994). Plant lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response. *Chemotherapy*. 40: 272-278.
22. Grce M (2009). Review: Primary and secondary prevention of cervical cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 9: 851-857.
23. Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. (2004). Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. *Bull Cancer*. 91: 141-158.
25. Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57: 905-914.
26. Hakamori S (2001). Review: Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol*. 491:369-402.
27. Hall J. Inclusión de tejidos, en: *Métodos histotecnológicos*. AFIP (1995). C8: 47-54.
28. Hamada S, Furumoto H, Kamada M, Hirao T, Aono T. (1993). High expression rate of Tn antigen in metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Cancer Lett*. 74: 167-173.
29. Hang HC, Bertozzi CR. (2005). The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem* 13: 5021-5034.

30. Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada S, Aono T. (1997). Tn Antigen, a Marker of Potential for Metastasis of Uterine Cervix Cancer Cells. *Cancer*. 72: 154-157.
31. Heimburg-Molinaro J, Almogren A, Morey S, Glinskii OV, Roy R, Wilding GE, Cheng RP, Glinsky VV, Rittenhouse-Olson K. (2009). Development, characterization, and immunotherapeutic use of peptide mimics of the Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen. *Neoplasia*. 11: 780-92.
32. Hernández P, Bacilio M, Porras F, Juarez S, Debray H, Zenteno E, Ortiz B. (1999). A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotechnol*. 29: 219-234.
33. Hernández J, Garfias Y, Reyes-Leyva J, Chávez R, Lascurain R, Vargas J, Zenteno E. (2002). Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 84: 71-82.
34. Howard C, Hanga C, Bertozzia R. (2005). Review: The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic and Medical Chemistry* 13; 5021-5034.
35. Inoue M, Ogawa H, Tanizawa O, Kobayashi Y, Tsujimoto M, Tsujimura T. (1991). Immunodetection of sialyl-Tn antigen in normal, hyperplastic and cancerous tissues of the uterine endometrium. *Virchows Arch A Pathol Anal Histopathol*. 418: 157-162.
36. Jordan LB, Monaghan H. (2004). Pathology of the Cervix: Recent Developments. *Clinical Oncology* 16: 248–254.
37. Kiss R, Camby I, Duckworth D, De-Decker R, Salmon I. (1997). In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, *Concanavalin A*,

wheat germ and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo and SW 837 human colorectal cancer cell growth. *Gut*. 40: 253-261.

38. Klein PJ, Newman RA, Müller P, Uhlenbruck G, Citoler P, Schaefer HE, Lennartz KJ, Fischer R. (1979). The presence and significance of the Thomsen-Friedenreich antigen in mammary gland. II. Its topochemistry in normal, hyperplastic and carcinoma tissue of the breast. *J Cancer Res Clin Oncol*. 93: 205-214.
39. Lanari C, Molinolo AA. (2003). Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental. *Revista Química Viva*, 3: 2.
40. Lascurain R, Porrás F, Báez R, Chávez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, Zenteno E. (1997). *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol Invest*. 26: 579-87.
41. Lazcano-Ponce EC, Rojas-Martínez R, López-Acuña MP, López-Carrillo L, Hernández-Ávila M. (1993). Reproductive risk factors and cervicouterine cancer in Mexico City. *Salud Publica Mex*. 35:65-73.
42. Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejía LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz E. (2008). Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of papanicolaou coverage, birth rate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2808–2817.
43. Lebrilla CB, An HJ. (2009). The prospects of glycan biomarkers for the diagnosis of diseases. *Mol Biosyst*. 5; 17–20.
44. Li CY, Xu HL, Liu B, Bao JK. (2010). Concanavalin A, from an Old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug. *Curr Mol Pharmacol*. 3: 123-128
45. Li L, Liu W, Wang J, Tu Q, Liu R, Wang J. (2010). Lectin-aided separation of circulating tumor cells and assay of their response to an anticancer drug in an integrated microfluidic device. *Electrophoresis*. 31: 3159-3166.

46. Lis H, Sharon N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem.* 55: 35-67.
47. London J, Berrih S, Bach JF (1978). Peanut Agglutinin. I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. *J Immunol.* 121: 438-443.
48. López-Morales D, Velázquez-Márquez N, Valenzuela O, Santo-López G, Reyes-Leyva J, Vallejo-Ruiz V. (2009). Enhancing sialyltransferase transcription in cervical intraepithelial neoplasia. *Invest Clin* 50: 45-53.
49. López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M. (2008). Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive. *Infect Agent Cancer* 3: 3.
50. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. (1975). The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem.* 250: 8518-8523.
51. Maldonado G, Gorocica P, Agundis C, Pérez A, Molina J, Zenteno E (1998). Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconj J.* 15: 615-622.
52. Markowska J. (2007). Tumor markers in cervical cancer. *Ginekol Pol.* 78: 715-718.
53. Mayoral MA, Mayoral C, Meneses A, Villalvazo L, Guzman A, Espinosa B, Ochoa JL, Zenteno E, Guevara J. (2008). Identification of galectin-3 and mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Invest.* 26: 615-623.
54. Muñoz-Soto R. (2007). Prevención del cáncer cervicouterino. *Boletín de Práctica Médica Efectiva, SSA.*
55. Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS. (2002). *Medical Microbiology*, 4<sup>th</sup> edición. Saint Louis, Missouri. 301-345.

56. Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T, Kitajima, M. (1995). Expression of Sialyl Lewis as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer*. 75: 2051–2056.
57. Narisawa-Saito M, Kiyono T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98: 1505–1511.
58. Neto J, Nascimento CM. (2001). Cervical cancer in Latin America. *Sem. Oncol.* 28, 188–197.
59. Ogawa H, Inoue M, Tanizawa O, Miyamoto M, Sakurai M. (1992). Altered expression of sialyl-Tn. Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Histochemistry*. 97; 311-317.
60. Oliveira C, Teixeira JA, Schmitt F, Domínguez L. (2009). A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC Biotechnol* 9:78.
61. Orntoft TF, Vestergaard EM. (1999). Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis*. 20: 362-371.
62. Ortíz B, Porrás F, Jiménez-Martínez MC, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Lascurain R, Zenteno E. (2002). Differential expression of a 70 KDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell Immunol*. 218: 34-45.
63. Petrossian K, Banner LR, Oppenheimer SB. (2007). Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta Histochem*. 109: 491-500.
64. Premaratne P, Welén K, Damber JE, Hansson GC, Bäckström M. (2010). O-glycosylation of MUC1 mucin in prostate cancer and the effects of its

expression on tumor growth in a prostate cancer xenograft model. *Tumour Biol.* Sep 26.

65. Reddi AL, Sankaranarayanan K, Arulraj HS, Devaraj N, Devaraj H. (2000). Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patients with SCC of the uterine cervix. *Cancer Lett.* 149: 207-211.
66. Reisner Y, Linker-Israeli M, Sharon N. (1976). Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol.* 25: 129-34.
67. Santaella-Verdejo A, Gallegos B, Pérez E, Zenteno E, Hernández P. (2007). Use of *Amaranthus leucocarpus* Lectin to Differentiate Cervical Dysplasia (CIN) *Prep Biochem Biotechnol* 37: 219-228.
68. Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. (1992). *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, pp. 25-42.
69. Sellors JW, Sankaranarayanan R. (2003). *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner's Manual*. International Agency for Research on Cancer Lyon 4.
70. Sobral AP, Rego MJ, Cavalcanti CL, Carvalho LB Jr, Beltrão EI. (2010). Con A and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Sci.* 52:49-54.
71. Solórzano C, Agundis C, Suarez S, Pereyra A, Angeles C, Montante D, Guzmán A, Chávez R. (2007). Over expression of complex Mucin-Type Glycans in Invasive Cervical Cancer. Meeting of the Society for Glycobiology. *Glycobiology* 17: 1226.
72. Springer GF, Desai PR. (1985). Tn epitopes, immunoreactive with ordinary anti-Tn antibodies, on normal, desialylated human erythrocytes and on

- Thomsen-Friedenreich antigen isolated therefrom. *Mol Immunol.* 22: 1303-1310.
73. Springer GF. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med.* 75: 594-602.
74. Secretaria de Salud SSA (2006). Capítulos que conforman la edición Salud: México 2001-2005. *Gaceta de Comunicación Interna de la Secretaria de Salud.* 50.
75. Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T. (1996). Expression of Tn and Sialyl-Tn Antigens in the Neoplastic Transformation of Uterine Cervical Epithelial Cells. *Cancer Res.* 56; 2229-2232.
76. Therkildsen MH, Andersen LJ, Chistensen M, Hansen HS, Schiodt T, Dabelsteen E. (1998). Salivary gland carcinomas: prognostic significance of simple mucin-type carbohydrate antigens. *Oral Oncol* 34; 44-51.
77. Usinger WR, Splitter GA. (1980). A simple method for specific depletion of B lymphocytes from bovine peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Commun.* 9: 693-703.
78. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart G, Etzler M. (2009), *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2<sup>a</sup> edición USA, pp 101-110.
79. Vázquez-Ortiz G, García JA, Ciudad CJ, Noé V, Peñuelas S, López-Romero R, Mendoza-Lorenzo P, Piña-Sánchez P, Salcedo M. (2007). Differentially expressed genes between high-risk human papillomavirus types in human cervical cancer cells. *Int J Gynecol Cancer.* 17: 484-491.
80. Vera R, Prujá E, Marcos M, Albistur JJ, Tejedor M, Valerdi JJ. (2001). Prognostic factors in tumors of gynecological origin. *ANALES Sis San Navarra* 24: 121-132.

81. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999). Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12–19.
82. Wang PH, Li YF, Juang CM, Lee YR, Chao HT, Ng HT, Tsai YC, Yuan CC. (2002) Expression of sialyltransferase family members in cervix squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol.* 86: 45-52.
83. Wopereis S, Lefeber DJ, Morava E, Wevers RA. (2006). Mechanism in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A review. *Clinical Chem* 52: 574-600.
84. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J.* 26: 899-913.
85. Wu W, Punt JA, Granger L, Sharrow SO, Kearse KP. (1997). Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology.* 7: 349-56.
86. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. (1992) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J.* 9: 204-208.
87. Zenteno E, Ochoa JL. (1988) Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry*, 27; 213-317.